

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06256

研究課題名(和文) プロラクチンの中枢神経系への新規作用：神経新生を介した生殖活動への寄与

研究課題名(英文) Novel function of prolactin on the urodele amphibian brain

研究代表者

蓮沼 至 (Hasunuma, Itaru)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：40434261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：有尾両生類アカハライモリの間脳視索前野で神経新生が生じていることを証明した。PRLがイモリ間脳視索前野の細胞増殖を促す機構については、本研究によりイモリ第三脳室脈絡叢-副生体複合体にはPRL受容体とIGF-1, IIが発現していること、さらに、間脳視索前野の増殖細胞はPRL受容体とIGF-1受容体を発現することを明らかにした。よって、血液中のPRLが第三脳室脈絡叢-副生体複合体のPRLを介して血液から脳脊髄液中に移送され、そのPRLが直接細胞増殖を促す可能性とPRLが第三脳室脈絡叢-副生体複合体のIGF-1, IIの発現を促し、IGF-1, IIが細胞増殖を促す可能性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

齧歯目動物でPRLが神経前駆細胞の増殖を促すとの報告があるが、PRLが直接細胞増殖を促す確たる証明はまだない。本研究では有尾両生類のイモリでもPRLが神経前駆細胞の増殖を促すことを示し、またPRLが直接神経前駆細胞に作用する直接作用の可能性とPRLが第三脳室脈絡叢-副生体複合体に発現するIGF-1, IIの合成を促し、IGF-1, IIが細胞増殖に関わる間接作用の可能性を示すことができた。PRLやIGF-1, IIが実際にイモリ神経前駆細胞の増殖を促すかをin vitroで証明するなど必要ではあるが、PRLの脳に対する新たな作用機序の可能性を示す成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that prolactin (PRL) stimulated the proliferation of neural stem cells in the preoptic area of an adult newt. In this study, we demonstrated that the PRL receptor (PRLR) and IGF-1 and II were expressed in the complex of the choroid plexus-paraphysis, and PRLR and IGF-1 receptor were expressed in the neural stem cells of the newt. One possible mechanism underlying the regulation of the proliferation of cells by PRL is that PRL transported from the blood to the cerebrospinal fluid via the PRLR expressed in the complex of choroid plexus-paraphysis directly stimulates the proliferation of the cells. Another possible mechanism is that PRL stimulates the expression of IGF-1 and II in the complex of choroid plexus-paraphysis, and IGF-1 and II enhance the proliferation of the cells. In the future, neurosphere assay should be performed to possibly provide evidence to whether PRL directly or indirectly stimulates the proliferation of the neural stem cells of newt.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：神経新生 プロラクチン 間脳 視索前野 有尾両生類 アカハライモリ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類ではかつては成体では新たな神経細胞は作られないとされていたが、現在ではヒトを含む哺乳類の成体でも神経新生が生じることが明らかにされている。しかし、神経新生が生じる脳の領域は限られており、大きく2箇所がよく知られている。一つ目は大脳の大脳海馬歯状回の顆粒細胞下帯であり、ここで新生された神経細胞は学習や記憶形成に関与するとされる。二つ目は大脳側脳室近傍の脳室下帯であり、ここで増殖した神経前駆細胞は神経細胞へと分化しながら嗅球へと移動し、最終的に抑制性介在神経細胞へと分化し、嗅覚やフェロモン情報の伝達制御に関わる可能性が指摘されている(文献1)。脳室下帯での神経新生に関しては下垂体前葉ホルモンであるプロラクチン(PRL)の関与が指摘されている。齧歯目を用いた研究により、妊娠後期に血液中のPRL濃度が上昇するが、それに伴い、脳室下帯での増殖細胞数が増加し、神経新生が増強されるとの報告がある。これは授乳期に匂いやフェロモンにより仔を認識するために新たな嗅覚、フェロモン受容の仕組みを脳内で構築している可能性が指摘されている(文献2)。また、近年、哺乳類でも大脳ほど盛んではないものの間脳視床下部でも神経新生が生じていることが報告され、これら神経新生がエネルギー代謝関与するとの議論がなされている(文献3)。

(2) 一方で、両生類における成体神経新生に関する知見は少ない。我々はPRLが生殖活動制御に関わるアカハライモリに着目した。成体アカハライモリでは大脳側脳室周囲と間脳視索前野が主な細胞増殖の場であること、下垂体前葉を除去するとこれら増殖細胞数が減少し、PRLの投与により回復することを突き止めた。さらに予備的な研究により、間脳視索前野の増殖細胞の一部がアルギニンバソトシン(AVT)を産生する神経細胞に分化することを突き止めた。AVTはアカハライモリの求愛行動を制御するホルモンの一つであり、これまでの研究により、PRLはAVT産生神経細胞に働きかけて求愛行動を制御する仕組みがあるのではと考えられてきた(文献4)。よって、PRLが間脳視索前野の細胞増殖を促すことから、PRLがAVT産生神経細胞への分化を促し、生殖活動の制御に関わるのではないかと考えた。我々の研究は、PRLがAVT産生神経細胞への分化を促し、生殖活動の制御に関わるのではないかと考えた。

(3) 我々はPRLが間脳視索前野における細胞の増殖活性を増強する経路として二つの可能性を検討した。一つ目はPRLが増殖細胞に直接働きかけて細胞の増殖を促す可能性(PRLの直接作用)、二つ目はPRLが脳内で何らかの細胞増殖因子の放出を促し、その細胞増殖因子が増殖活性を増強する可能性(PRLの間接作用)である。哺乳類ではPRLは脈絡叢に発現するPRL受容体を介して血液中から脳脊髄液中に移送される可能性が指摘されている(文献5)。我々はイモリの第三脳室脈絡叢にPRL受容体が高レベルで発現していることを見出しており、哺乳類同様に血液中から脳脊髄液中に移送する可能性があると考えている(文献6)。よって、間脳視索前野の増殖細胞にPRL受容体が発現していることを見出せることができれば、PRLが直接的に増殖を促す仕組み、つまりPRLの直接作用があると言える。また、両生類では第三脳室脈絡叢の背側に副生体と呼ばれる脈絡叢に類似した器官があり、現在のところ機能不明であった。我々は副生体にもPRL受容体が発現していること、さらに第三脳室脈絡叢-副生体複合体にインスリン様成長因子(IGF)-I, IIが発現していることを見出した。哺乳類ではIGF-I, IIは神経幹細胞の増殖作用や神経新生に関与するとの報告もあり、もしPRLが第三脳室脈絡叢-副生体複合体におけるIGF-I, IIの発現を増強することになれば、PRLがIGF-I, IIを介した間接作用により間脳視索前野の細胞増殖を増強する仕組みが存在する可能性がある。我々の研究は、PRLがIGF-I, IIを介した間接作用により間脳視索前野の細胞増殖を増強する仕組みが存在する可能性がある。我々の研究は、PRLがIGF-I, IIを介した間接作用により間脳視索前野の細胞増殖を増強する仕組みが存在する可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 雄の成体アカハライモリを用い、間脳視索前野で神経新生が生じているか、また生じているとすればどのような神経細胞に分化するのかを明らかにすることを一つ目の目的とした。また、PRLにより間脳視索前野の増殖細胞数が維持・増強される可能性があることから、どのようなメカニズムでPRLが視索前野の増殖細胞に作用するかを明らかにすることを二つ目の目的とした。

3. 研究の方法

(1) アカハライモリ間脳視索前野における神経新生の解析

雄の成体アカハライモリを3例5群にわけ、5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)を投与した。それぞれEdU投与後24時間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月後に4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定後に脳を採取し、その後ブアン固定液に浸漬固定したのち、定法に則りパラフィン包埋した。切片を作製し、核内のDNAに取り込まれたEdUはクリック反応を応用して蛍光標識し、神経幹細胞マーカーであるSox2または成熟神経細胞マーカーであるNeuNにそれぞれ特異的な抗体を用いた蛍光二重染色を実施し、EdU陽性反応とSox2免疫陽性反応の共局在率、EdU陽性反応とNeuN免疫陽性反応の共局在率を算出した。さらにホルモンを産生する神経細胞に分化するかを検証するため、EdU陽性反応と視床下部ホルモンであるアルギニンバソトシン(AVT)、メソトシン(MT)を特異的に認識する抗体を用いた蛍光免疫染色、またはEdU陽

性反応と甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) mRNA に相補的なプローブを用いた in situ hybridization (ISH) により、EdU と各視床下部ホルモン産生細胞との共局在率を算出した。

(2) アカハライモリ間脳視索前野の増殖細胞の性質の解析

雄の成体アカハライモリに EdU を投与し、24 時間後に上述と同様に脳をサンプリングした。EdU の蛍光染色と神経前駆細胞 / タニサイトマーカーであるグリア線維酸性タンパク質 (GFAP) または Vimentin に特異的な抗体を用いて蛍光二重染色を実施し、EdU 陽性反応と GFAP 免疫陽性反応の共局在率、EdU 陽性反応と NeuN 免疫陽性反応の共局在率を算出した。

(3) 第三脳室脈絡叢-副生体複合体におけるインスリン様成長因子 (IGF) -I, II 発現におよぼす PRL の影響

雄の成体アカハライモリを 5 例 4 群に分け、それぞれを偽手術-生理食塩水投与群、下垂体前葉除去-生理食塩水投与群、下垂体前葉除去-PRL (3 µg) 投与群、下垂体除去-PRL (30 µg) 投与群とした。1 日おきに 4 回生理食塩水または PRL を投与し、第三脳室脈絡叢-副生体複合体をサンプリングした。なお、PRL はヒツジ PRL (Sigma) を用いた。これら組織から全 RNA を抽出したのち、逆転写し cDNA を合成した。これら cDNA を用いてリアルタイム PCR により、IGF-I, IGF-II 遺伝子の発現レベルを定量した。なお、肝臓の IGF-I, II は下垂体前葉ホルモンの PRL は成長ホルモンの影響を受け、これらホルモンによって発現が高まる可能性があるため、コントロールとして肝臓も採取し、リアルタイム PCR により IGF-I, II の発現レベルを定量した。

(4) アカハライモリ間脳視索前野の増殖細胞における PRL 受容体および IGF-I 受容体発現解析
雄の成体アカハライモリに EdU を投与し、24 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定後に脳を採取し、その後同固定液に浸漬固定したのち、定法に則り凍結包埋した。凍結切片を作製し、EdU 蛍光染色と in situ hybridization chain reaction (isHCR) を組み合わせ、EdU 陽性細胞に PRL 受容体や IGF-I 受容体が発現しているかを検証した。

4. 研究成果

(1) アカハライモリ間脳視索前野における神経新生の解析

EdU 投与後 24 時間では EdU 陽性細胞は第三脳室のごく近傍に存在し、約 90% が Sox2 免疫陽性であった。EdU 投与後時間が経過するにつれて EdU 陽性細胞は第三脳室から体側方向に移動する様子がわかった。また、EdU 投与後 2 週間では EdU 陽性細胞の約 45%、1 ヶ月では約 30%、2 ヶ月以降では 10-20% 程度が Sox2 免疫陽性であり、EdU 投与後時間が経過するにつれて EdU 陽性反応と Sox2 免疫陽性反応の共局在率は低下した。一方で、EdU 投与後 24 時間では約 10% の EdU 陽性細胞が NeuN 免疫陽性であったが、EdU 投与後の時間が経過するにつれ共局在率は上昇し、3 ヶ月後には約 60% の EdU 陽性細胞が NeuN 免疫陽性であった。これらより、EdU 投与後 24 時間では約 90% の増殖細胞は神経幹細胞様の性質をもっていること、時間経過とともに第三脳室周囲から体側方向に移動しながら神経細胞に分化することがわかった。さらに増殖細胞の AVT, MT, TRH 産生神経細胞への分化を検証したところ、いずれも EdU 投与後 1 ヶ月程度で EdU 陽性細胞の数%が AVT, MT 免疫陽性反応や TRH mRNA 陽性反応と共局在を示したが、さらに時間を経過したサンプルでも必ずしも共局在率は増加せず、EdU 陽性細胞の中でも少数の細胞がこれら視床下部ホルモンを産生する神経細胞に分化することがわかった。

(2) アカハライモリ間脳視索前野の増殖細胞の性質の解析

EdU 投与後 24 時間における EdU 陽性反応と神経前駆細胞/タニサイトマーカーである GFAP および Vimentin 免疫陽性反応を比較したところ、EdU 陽性細胞のうち約 50% は GFAP および Vimentin 免疫陰性で、約 37% が GFAP および Vimentin 免疫陽性であった。また、約 13% が GFAP 免疫陽性かつ Vimentin 免疫陰性であり、さらに 1% 未満で GFAP 免疫陰性かつ Vimentin 免疫陽性の細胞も存在した。

(3) 第三脳室脈絡叢-副生体複合体におけるインスリン様成長因子 (IGF) -I, II 発現におよぼす PRL の影響

まず肝臓における IGF-I, II の発現レベルを定量した。下垂体除去-生理食塩水投与群は IGF-I, II とともに偽手術群と比較し、発現レベルが低下傾向または低下した。一方、PRL を投与した個体群については、PRL の濃度依存的に IGF-I, II の発現が高まることわかった。これにより、肝臓の IGF-I, II の発現は下垂体前葉の影響下にあること、PRL は肝臓での IGF-I, II の発現を高める作用があることがわかった。第三脳室脈絡叢-副生体複合体の IGF-I, II の発現を解析すると、肝臓とは異なり、偽手術群と下垂体除去-生理食塩水投与群で IGF-I, II の発現に明瞭な差は見出されなかった。一方で、下垂体除去群に PRL を投与した場合、濃度依存的に IGF-I, II の発現が高まる、または高まる傾向を示すことがわかった。

(4) アカハライモリ間脳視索前野の増殖細胞における PRL 受容体および IGF-I 受容体発現解析
EdU 投与後 24 時間の個体の間脳視索前野の増殖細胞に PRL 受容体または IGF-I 受容体が発現しているかどうかを isHCR で検証した。すると、EdU 陽性細胞に PRL 受容体 mRNA のみならず

IGF-I 受容体 mRNA も検出された。これらより、間脳視索前野の増殖細胞には PRL 受容体と IGF-I 受容体の双方が発現していると考えられる。

(5) 研究成果の総括

本研究により、有尾両生類アカハライモリ成体脳の間脳視索前野で神経新生が生じていることを証明することができた。また、間脳視床下部または間脳視索前野の増殖細胞（神経前駆細胞）の性質について哺乳類と魚類と比較することができた。哺乳類では視床下部での神経新生を生じる細胞は 2 タニサイトと呼ばれる細胞であり、この細胞は GFAP と Vimentin を発現しているという特徴を有する（文献 7）。一方で、魚類で高い細胞増殖活性を有し、神経新生が生じる細胞は GFAP も Vimentin も発現しないということが報告されている。今回、我々はイモリにおいて、増殖細胞には約半数は GFAP と Vimentin を発現しないが、約 4 割の増殖細胞は GFAP も Vimentin も発現し、わずかに GFAP のみ、Vimentin のみ発現する細胞も観察された。これら結果は、両生類の間脳視索前野における神経前駆細胞の性質は哺乳類と魚類の中間的な位置付けにあると言える。

一方で、イモリ間脳視索前野で神経新生が生じることが示されたものの、繁殖に AVT 産生神経細胞やその他、MT や TRH を産生する神経細胞にはごく稀にしか分化しないことがわかった。現状では多くの増殖細胞がどのような神経細胞に最も多く分化するかなど、これらの解析は今後の課題である。EdU 投与 1 ヶ月または 2 ヶ月後に EdU 陽性細胞をフローサイトメーターで分離し、細胞を一つ一つ採取し、RNA-seq 等の解析により各細胞の発現遺伝子を網羅的に解析することでより詳細な分化後の細胞の性状が明らかになると考えられる。

PRL のイモリ間脳視索前野の細胞増殖を促す機構については、これら細胞に PRL 受容体と IGF-I 受容体を発現していることがわかったことから、上述の直接作用と間接作用の両方の可能性が考えられる。つまり、PRL が第三脳室脈絡叢または副生体の PRL 受容体を介して血液中から脳脊髄液中に移送され、その PRL が増殖細胞に作用する可能性、および PRL が第三脳室脈絡叢-副生体複合体に発現する IGF-I, II 産生を促し、IGF-I, II が増殖細胞に作用する可能性、である。しかし、これをさらに証明するためには *in vitro* で間脳視索前野の神経幹細胞を単離し、PRL または IGF-I, II を曝露した時に細胞増殖が促されるかを検証する必要がある。そのために、ニューロスフェア法を活用する方法が有効と考えられる。

引用文献

- 1: Ming, G. L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.001
- 2: Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J. C., & Weiss, S. (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, 299(5603), 117–120. doi:10.1126/science.1076647299/5603/117
- 3: Cheng, M. F. (2013). Hypothalamic neurogenesis in the adult brain. *Front Neuroendocrinol*, 3, 167–178. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.05.001
- 4: Kikuyama, S., Okada, R., Hasunuma, I., & Nakada, T. (2019). Some aspects of the hypothalamic and pituitary development, metamorphosis, and reproductive behavior as studied in amphibians. *Gen Comp Endocrinol*, 113212. doi:10.1016/j.ygcen.2019.113212
- 5: Walsh, R. J., Slaby, F. J., Posner, B. I. (1987). A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology*, 120(5), 1846–1850. doi:10.1210/endo-120-5-1846
- 6: Hasunuma, I., Toyoda, F., Yamamoto, K., Yamashita, M., Kikuyama, S. (2005). Localization of prolactin receptor in the newt brain. *Cell Tissue Res*, 320(3), 477–485. doi: 10.1007/s00441-004-1041-0
- 7: Ceriani, R., Whitlock, K. E. (2021). Gonadotropin Releasing Hormone (Gnrh) Triggers Neurogenesis in the Hypothalamus of Adult Zebrafish. *Int J Mol Sci*, 22(11), 5926. Doi: 10.3390/ijms22115926

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasunuma, I.	4. 巻 341
2. 論文標題 Central regulation of reproduction in amphibians	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Exp Zool A Ecol Integr Physiol	6. 最初と最後の頁 219-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.2769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasa, A., Hanaoka, N., Ohwada, K., Iwamuro, S., Toyoda, F., Kikuyama, S., Hasunuma, I.	4. 巻 64
2. 論文標題 Cell proliferation and neurogenesis in the adult telencephalon of the newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 474-485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢形華乃、岩室祥一、蓮沼至
2. 発表標題 動物行動解析アプリケーションの開発と自発運動量解析への応用
3. 学会等名 日本動物学会第76回関東支部大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 花岡尚輝、井村基、岩佐亜美、大和田孝祐、岩室祥一、豊田ふみよ、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 アカハライモリ間脳視索前野における神経ペプチド産生ニューロンの新生
3. 学会等名 第47回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三笠佳樹、北田萌華、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 アカハライモリ副生体におけるプロラクチンのインスリン様成長因子I、II発現におよぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会第94回山形大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 蓮沼至、伏島春花、岩室祥一、菊山榮
2. 発表標題 有尾両生類下垂体で発現するホルモンに関する新発見
3. 学会等名 日本下垂体研究会第37回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花岡尚輝、井村基、岩佐亜美、大和田孝祐、岩室祥一、豊田ふみよ、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体アカハライモリ間脳視索前野における増殖細胞の特性
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板尾桃果、池田卓聡、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体アカハライモリの下垂体前葉におけるプロラクチン（PRL）1B遺伝子の発現レベル
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花岡尚輝、井村基、岩佐亜美、大和田孝祐、岩室祥一、豊田ふみよ、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体アカハライモリ間脳視索前野における神経新生
3. 学会等名 日本動物学会 第92回 米子大会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田卓聡、松野将大、岡田令子、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体イモリ下垂体前葉のプロラクチン（PRL）1B遺伝子の発現
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東邦大学 理学部 生物学科 生体調節学研究室 https://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/regl/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	豊田 ふみよ (Toyoda Fumiyo)	奈良県立医科大学・医学部 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------