

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09420

研究課題名(和文)代謝型グルタミン酸受容体を介した射精調節の神経回路

研究課題名(英文) Regulation of neural circuit of ejaculation via metabotropic glutamate receptors.

研究代表者

時田 美和子(馬杉美和子)(Miwako, Masugi-Tokita)

滋賀医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：10420712

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)：我々はmGluR7遺伝子欠損マウス(KO)が性的モチベーションを持つにもかかわらず射精障害を示すこと、mGluR7が腰仙髄の神経回路の興奮性を増強することによって射精を制御していることを示した。本研究では脊髄切断により脳の影響を遮断した状態で解析を行った。予想に反して、脊髄切断後のmGluR7 KOの性的反応は野生型マウスの性的反応よりも強くなった。mGluR7は副交感神経系だけでなく交感神経系にも発現しており、マルチモーダルなメカニズムにより射精を制御していると考えられた。我々の研究は射精のメカニズムだけでなく、射精障害の治療戦略を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、不妊外来において射精障害の男性が増加している。しかしながら、アモキサピンなどの三環系抗うつ薬が逆行性射精を改善させる例を除き、射精障害に有効な薬物療法はない。射精のメカニズムは不明な点が多い。mGluR7が射精調節に関与する神経回路を明らかにするために、免疫組織化学的解析を行い、その調節機構について考察した。mGluR7はシナプス前膜の伝達物質放出部位近傍に存在し、グルタミン酸放出の調節をしていると考えられている。今後、早漏や膣内射精障害を含めた遅漏などの射精障害の薬物ターゲットとしてのmGluR7の可能性を探索したい。

研究成果の概要(英文)：Metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGluR7) is a member of the group III mGluRs, which localize to presynaptic active zones. We previously reported that mGluR7 knockout (KO) mice exhibit ejaculatory disorders, although they have normal sexual motivation. We hypothesized that mGluR7 regulates ejaculation by potentiating the excitability of the neural circuit in the lumbosacral spinal cord. In the present study, to elucidate the mechanism of impaired ejaculation in mGluR7 KO mice, we eliminated the influence of the brain by spinal transection. Unexpectedly, sexual responses of mGluR7 KO mice were stronger than those of wild-type mice after spinal transection. Histological examination indicated that mGluR7 controls sympathetic neurons as well as parasympathetic neurons. mGluR7 might control ejaculation by multi-level and multi-modal mechanisms. Our study provides insight into the mechanism of ejaculation as well as a strategy for future therapies to treat ejaculatory disorders.

研究分野：神経科学

キーワード：mGluR7 射精 性行動 シナプス グルタミン酸受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

男性性機能をコントロールしている神経ネットワークは、脳と脊髄の多くの部位から構成される。ヒトの胸髄レベルの脊髄損傷では反射性射精は保持されることから、腰・仙髄に射精に深く関わる重要な領域が存在することが知られていたが、その詳細については不明な点が多かった。2002年に腰髄に存在する lumbar spinothalamic (LSt) cells が射精中枢の本体であると報告された (Truitt et al., Science, 2002)。この発見により LSt 細胞の投射先など射精制御の主要な神経経路や一部の調節分子は同定されたものの、射精を調節する神経回路や射精の調節メカニズムは殆どわかっていない。

一方、mGluR7 は中枢神経系に広く発現しシナプス前膜に局在する。複数の軸索を持つ神経細胞では特定の細胞に投射する軸索終末のみに mGluR7 が発現する標的細胞特異的発現が観察される (Shigemoto et al., Nature, 1996)。また、mGluR7 は伝達物質放出の抑制の他に、長期増強 (LTP) や長期抑制 (LTD) といった可塑性の方向性を決めるスイッチとして機能する (Pelkey et al., Neuron, 2005, 2007) という興味深い報告があるが、それらの生理的意義は不明である。mGluR7 は重要な役割を担うことが示唆されているが、生体内における機能発現のメカニズムは未だ解明されていない。

研究代表者はこれまでに mGluR7 遺伝子欠損マウス (mGluR7 KO) において恐怖反応 (すくみ反応) の低下、及び味覚嫌悪学習の障害という二つの異なる扁桃体依存性行動の異常を見いだした (Masugi et al., J Neurosci. 1999)。また、このマウスにおいて攻撃対象となる雄のにおいの情報処理が障害されているため攻撃行動が低下していること (Masugi-Tokita et al., Neuropsychopharmacology. 2016; Masugi-Tokita et al., Neuroendocrinol. 2018)、さらに、このマウスは性的モチベーションを持つにもかかわらず射精障害を示すことを報告している (Masugi-Tokita et al., Mol Neurobiol. 2020)。

2. 研究の目的

本研究の目的は mGluR7 がどのようなメカニズムで射精を調節しているのかを解明することである。射精調節に関与する神経回路は不明な点が多く、射精障害の治療方法も進んでいない。本研究の成果は射精障害の治療薬の開発、ひいては少子化の緩和に貢献することが期待できる。また、射精という具体的な生理機能に関与した mGluR7 のシナプスの調節機構を明らかにすることは脳機能の深い理解にもつながる。

3. 研究の方法

(1) 動物

10-19 週齢の野性型マウスおよび mGluR7 KO の雄を使用した。

(2) 脊髄切断

イソフルランによる麻酔下で、第 9 胸椎と第 10 胸椎の間で脊髄を完全に切断した。脊髄切断マウスは自力で排尿することができないため、1 日 3 回腹部を圧迫することで用手的に排尿させた。脊髄の完全な切断は後肢の弛緩の観察、および実験後組織学的手法により確認した。

(3) 用手排尿時の陰茎反応

朝 (膀胱が満杯の時) の用手排尿時に、陰茎の反応を以下の 2 つのカテゴリーに従って定義し 90 秒間観察した。

フリップ：陰茎体をのばすような陰茎の背屈。

カップ：亀頭の膨張を伴う勃起。

さらに精液の放出の有無も記録した。

(4) 陰茎反射テスト

脊髄切断 1 日目 (脊髄切断 6 時間後) および 2 日目に、陰茎反射テストを行った。マウスを仰向けにし、粘着テープで拘束し、陰茎亀頭を露出し、フリップとカップの回数を記録した。

脊髄切断の前に、マウスを 50ml のコニカルチューブと粘着テープで拘束し、陰茎亀頭を露出して陰茎の反射の有無を確認した。切断前には mGluR7 KO マウスでも野生型マウスでも、フリップやカップは観察されなかった。

(5) クロニジン誘発射精

クロニジン投与 (2.5mg/kg, i.p.) の効果を脊髄切断後 5 日目に観察した。薬物投与の 3 時間前に用手的に排尿させて膀胱を空にし、テスト直前に凝固した精液 (マウスの精液は射出されると凝固する) が陰茎の内側や外側に付着していないことを確認した。クロニジン投与後 30 分間、10

分ごとに観察した。射出されて凝固した精液を採取し、ろ紙上で乾燥させ、重量を測定した。

(6) 形態学的解析

マウスの腰・仙髄における、mGluR7 と射精に関連する分子の免疫標識を行った。

4. 研究成果

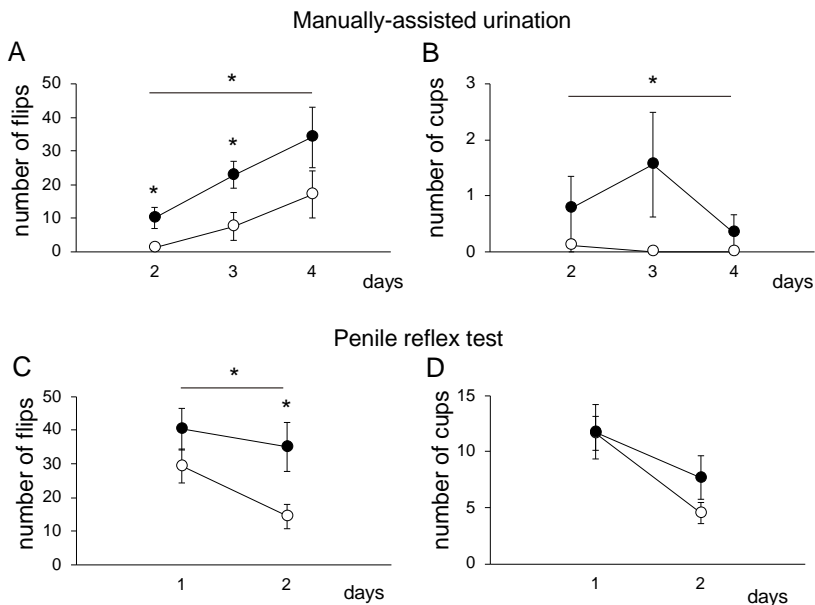
(1) 脊髄切断すると mGluR7 KO マウスの陰茎の反応は亢進する

mGluR7 による射精調節が行われている部位を同定することを目的に、胸髄レベルで脊髄を切断し脳からの入力を遮断した。脊髄切断マウスは自力で排尿することができないため用手的に排尿させたところ、脊髄切断した mGluR7 KO マウスでは排尿時の陰茎反射が明らかに亢進していた。一方で野生型マウスでの陰茎反射は微弱であった。この現象は予想外のものではあったが、新たな知見を見いだす可能性があると

図 1. 脊髄切断 mGluR7 KO マウスの性的反応

n = 9. *p < 0.05 vs wild-type. Error bars indicate SEM.

Independent days were analyzed by unpaired t test.



○ Wild-type
● mGluR7^{-/-}

と考え、定量的に解析するために陰茎反応のテストを行った。

脊髄切断したマウスを用手的に排尿させた際のペニスの反応を観察した。ペニスの背屈をフリップ、亀頭の膨張を伴う勃起をカップと定義した。

手術 2 日目から 4 日目の朝の用手排尿時におけるフリップの回数(図 1A)とカップの回数(図 1B)は、反復測定分散分析で評価したところ、mGluR7 KO マウスの方が、野生型マウスよりも有意に多かった。また、mGluR7 KO マウスでは 9 匹中 4 匹が、野生型マウスでは 9 匹中 1 匹だけが、用手的排尿中に射出した。このうち 1 匹の mGluR7 KO マウスでは、実験の間に 3 回の射出が観察された。

次に陰茎反射テストを行った。陰茎を露出すると、フリップやカップなどの定型反射が誘発される。手術 1 日目および 2 日目の陰茎反射を反復測定分散分析で評価したところ、脊髄切断 mGluR7 KO マウスのフリップの回数は野生型マウスよりも有意に多かったが(図 1C)、カップの回数には有意差は認められなかった(図 1D)。これらの結果は、脊髄切断すると陰茎反射は増強するが、増強の程度が mGluR7 KO マウスでは野生型マウスよりも強かったことを示している。また、脊髄切断をしていない正常マウスでは mGluR7 は陰茎の反応を促進する方向に働いているが、脊髄切断すると陰茎の反応を抑制する働きをするように変化したことを示唆している。

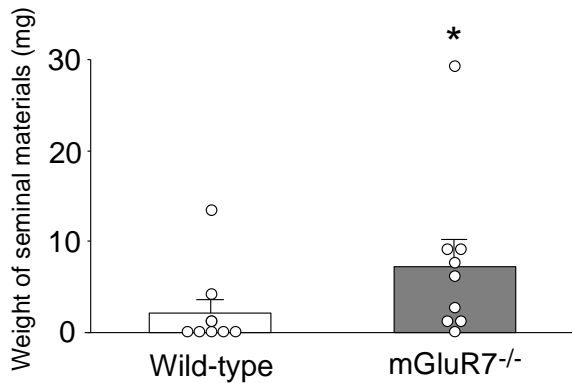


図 2. クロニジン投与後に放出された精液の重量
n = 9. *p < 0.05 vs wild-type analyzed by unpaired t test. Error bars indicate SEM.

(2) 脊髄切断すると mGluR7 KO マウスの射精反応は亢進する

陰茎反射テストは陰茎の動きを目視で観察するだけなので、mGluR7 KO の射精機能をより直接的に解析するために、クロニジン誘発射精モデルを用いた。クロニジンはアドレナリン作動薬であり、脊髄切断マウスに対して射出を誘発する。クロニジン投与後に射出された精液の量は、野生型よりも mGluR7 KO の方が多かった(図 2)。陰茎反射テストの結果と同様に、これらの結果は、mGluR7 KO マウスでは脊髄切断によって引き起こされる薬物誘発射精の増強の程度が、野生型マウスよりも大きかったことを示している。

(3) mGluR7 は、交感神経節前ニューロンとシナプスを形成する軸索終末に発現している

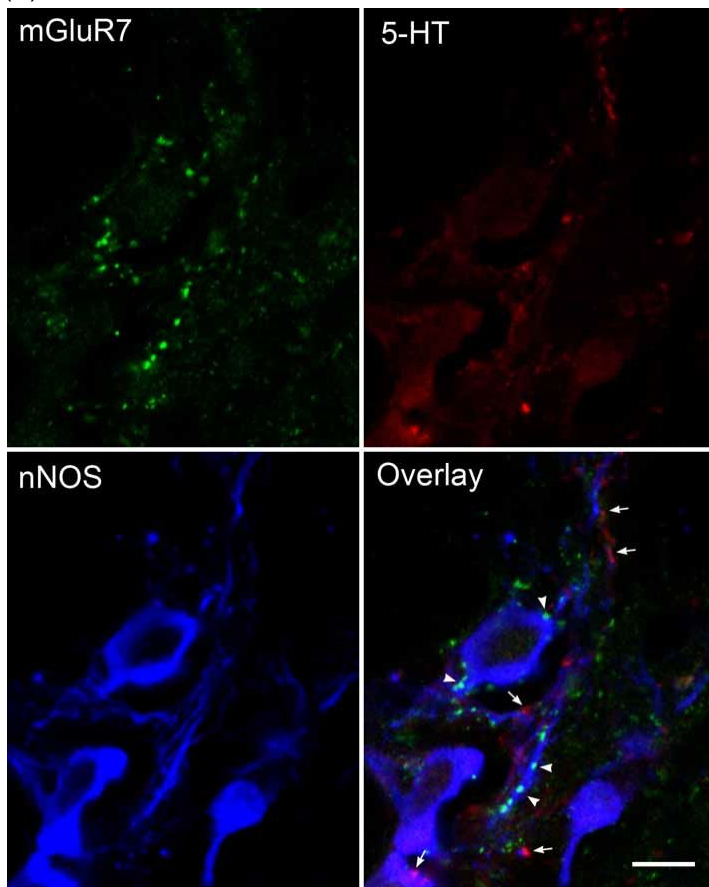


図 3. 腰髄交感神経核付近の形態学的解析

緑, mGluR7; 赤, 5-HT; 青, nNOS
 矢頭, mGluR7-LI 陽性軸索終末;
 矢印, 5-HT-LI 陽性瘤状線維.
 Scale bar = 10 μ m

脊髄は脳から強い下行性の 5-HT 神経支配を受けており、この経路から放出される 5-HT は性的反応に対して抑制作用を示す。したがって、脊髄切断によって脳からの抑制が遮断されると、性的反応の閾値が下がる。そこで 5-HT の支配を受けている射精調節領域に注目した。第 13 胸髄-第 2 腰髄 (T13-L2) の脊髄中間外側核 (IML) 周辺に 5-HT 様の免疫反応 (-LI) が観察された。高倍率で観察したところ、mGluR7-LI 陽性の軸索終末が、nNOS-LI 陽性の交感神経節前ニューロンの細胞体や樹状突起に接していることが明らかになった (矢頭; 図 3)。この発現様式は、我々が副交感神経系に見出した発現様式と類似していた (Masugi-Tokita et al., Mol Neurobiol. 2020)。また、5-HT-LI

陽性の瘤状線維が、神経節前ニューロンの樹状突起と接していることも観察された (矢印; 図 3)。しかし、これらの mGluR7-LI と 5-HT-LI は共局在しなかった。

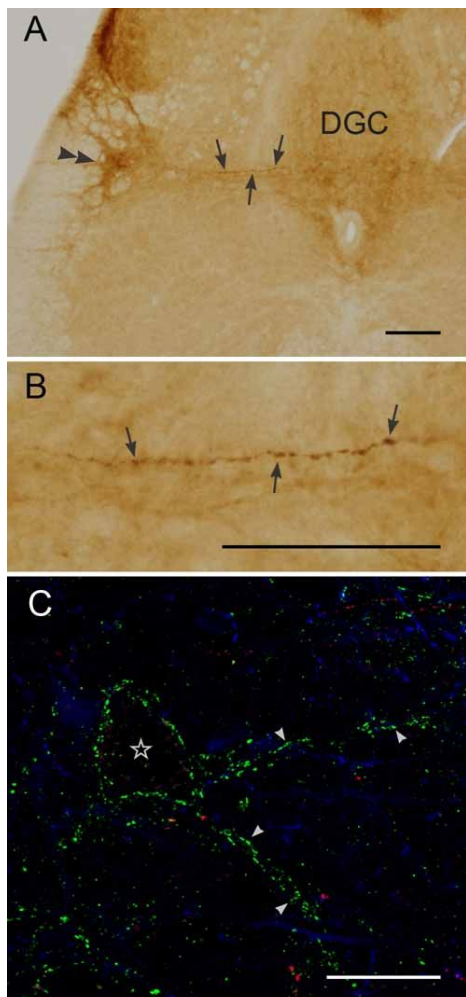


図 4. 第 6 腰髄 (L6) における mGluR7-LI の分布

(A) 仙髄副交感神経核 (SPN; 二重矢頭)、背側灰白交連 (DGC) および SPN から DGC へ伸びる樹状突起の周囲 (矢印) に強い mGluR7-LI が観察される。

(B) (A) に示した mGluR7-LI で縁取りされた樹状突起の拡大。

(C) 緑, mGluR7; 赤, Galanin; 青, nNOS
 矢頭, mGluR7-LI で縁取りされた樹状突起; 星印, mGluR7-LI で縁取りされた細胞体. Scale bars = 200 μ m in (A, B); 20 μ m in (C); DGC, dorsal gray commissure.

LSt 細胞は射精中枢の本体であり、マウスでは第 3 腰髄-第 4 腰髄 (L3-4) に存在する (Truitt and Coolen, Science, 2002)。LSt 細胞は交感神経、副交感神経、体性神経のすべてに投射して射精を制御する。我々は以前の報告で、このうち副交感神経領域において LSt 細胞のマーカである Galanin-LI と mGluR7-LI が類似していることを見いだした (Masugi-Tokita et al., Mol Neurobiol. 2020)。この結果は、mGluR7 が射精経路の副交感神経枝を調節することにより、射精をひきおこす働きを持つ副交感神経節前ニューロンを増強している可能性を示している。

本研究では、射精経路の交感神経枝において、副交感神経系における発現よりは少ないものの、交感神経節前ニューロンに入力する軸索終末に mGluR7-LI を認めた。次に mGluR7 の副交感神経領域での発現についてより詳細な解析を行った。mGluR7-LI は、すでに報告したように (Masugi-Tokita et al., Mol Neurobiol. 2020)、第 6 腰髄-第 1 仙髄 (L6-S1) の仙髄副交感神経

核 (SPN ; 二重矢印 ; 図 4A) 背側灰白交連 (DGC) および SPN から DGC へと内側に伸びる樹状突起 (矢印 ; 図 4A, B) の領域で強いことがわかった。拡大図では、mGluR7-LI が数珠状を呈していることがわかる (図 4B)。mGluR7-LI で縁取りされた細胞体 (星印 ; 図 4C) と樹状突起 (矢頭 ; 図 4C) が SPN 近傍に見られた。

(4) まとめ

LSt 細胞とその求心性神経は射精中枢および主となる射精経路として同定されているが射精を制御するメカニズムは複雑であり、遅漏の一種である腔内射精障害に見られるように、習慣的な強い刺激によって射精の閾値が上がるだけでなく、ストレスによっても射精が障害されることがある。しかしながら、射精障害の治療薬は限られており、早漏に対しては選択的セロトニン再取り込み阻害薬、逆行性射精に対しては三環系抗うつ薬のアモキサピンなど、限られたカテゴリーの射精障害のものしか見つかっていない。射精の生理の基礎知識が不足しているため、薬剤開発が遅れている。mGluR7 のユニークな特性は、射精の複雑な制御メカニズムに関与している可能性があり、我々の知見に基づく今後の研究が、射精障害の治療につながるかもしれない。

<引用文献>

Masugi M, Yokoi M, Shigemoto R, Muguruma K, Watanabe Y, Sansig G, van der Putten H, Nakanishi S (1999) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J Neurosci* 19(3):955-963.

Masugi-Tokita M, Flor PJ, Kawata M (2016) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 in the bed nucleus of the stria terminalis is essential for intermale aggression. *Neuropsychopharmacology* 41(3):726-735.

Masugi-Tokita M, Yoshida T, Kageyama S, Kawata M, Kawauchi A (2018) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 has critical roles in regulation of the endocrine system and social behaviours. *J Neuroendocrinol.* 30(3):e12575.

Masugi-Tokita M, Tomita K, Kobayashi K, Yoshida T, Kageyama S, Sakamoto H, Kawauchi A (2020) Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 Is Essential for Ejaculation. *Mol Neurobiol.*57(12):5208-5218.

Masugi-Tokita M, Kubota S, Kobayashi K, Yoshida T, Kageyama S, Sakamoto H, Kawauchi A (2023) Spinal Transection Switches the Effect of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 from the Facilitation to Inhibition of Ejaculation. *Neuroscience.* 509:10-19.

Pelkey KA, Lavezzari G, Racca C, Roche KW, McBain CJ (2005) mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition. *Neuron* 46(1):89-102.

Pelkey KA, Yuan X, Lavezzari G, Roche KW, McBain CJ (2007) mGluR7 undergoes rapid internalization in response to activation by the allosteric agonist AMN082. *Neuropharmacology* 52(1):108-117.

Shigemoto R, Kulik A, Roberts JD, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381(6582):523-525.

Truitt WA, Coolen LM (2002) Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* 297(5586):1566-1569.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Miwako Masugi-Tokita, Shigehisa Kubota, Kenichi Kobayashi, Tetsuya Yoshida, Susumu Kageyama, Hiroataka Sakamoto, Akihiro Kawauchi	4. 巻 509
2. 論文標題 Spinal Transection Switches the Effect of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 from the Facilitation to Inhibition of Ejaculation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 10-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2022.11.012	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------