

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780292

研究課題名(和文) 交尾排卵動物モデル・スunksを用いた排卵の神経メカニズムの解明

研究課題名(英文) Neural mechanism mediating the mating-induced ovulation in the musk shrew, a reflex ovulator

研究代表者

井上 直子 (Inoue, Naoko)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90377789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により交尾排卵動物のスunksでは、交尾刺激が視索前野のキスペプチンニューロンを活性化し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の放出を介して排卵を引き起こしていることが明らかになった。交尾刺激が視索前野のキスペプチンニューロンに入力する神経経路として、一般体性感覚を伝達する知覚性の脊髄神経が終末する延髄の薄束核を介する経路、および一般臓性感覚を伝達する知覚性の迷走神経が終末する延髄の孤束核を介する経路が存在する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study suggests that the mating stimulus activates kisspeptin neurons in the preoptic area (POA), and then stimulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release to induce ovulation in the musk shrew, a reflex ovulator. The gracile nucleus, the sensory spinal nerve terminal, and the solitary nucleus, the sensory vagus nerve terminal, may mediate the mating stimulus to the POA kisspeptin neurons in the musk shrew.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：スunks 交尾排卵 交尾刺激 キスペプチン 性腺刺激ホルモン放出ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

脳視床下部キスペプチンニューロンから分泌されるキスペプチンは、2001年に発見された *Kiss1* 遺伝子にコードされる神経ペプチド (Ohtaki et al., Nature, 2001) であり、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) を誘導する強力な生殖生理作用を示す。キスペプチンは、種を越えて GnRH 分泌を促進し、生殖を制御している神経ペプチドであると考えられているが詳細は不明である。

スunksは、交尾刺激により排卵を人為的にコントロールでき、排卵を制御する神経メカニズムを明らかにするために有用な実験動物である。研究代表者らのこれまでの研究により、スunksにおいてキスペプチンは GnRH 分泌を制御し、排卵を調節していることが明らかになっている。スunks脳においてキスペプチンニューロンは、視床下部に局在し、スunksにキスペプチンを単回皮下投与したところ、排卵を誘起し、GnRH 受容体のアンタゴニストを同時に投与すると、排卵を完全に抑制した。マウスやラットでもキスペプチンニューロンは GnRH 分泌を介し、排卵をコントロールしていると考えられているが、キスペプチンニューロンがどのようなメカニズムで活性化されているかは全くわかっていない。そこで交尾排卵動物のスunksを用いれば、人為的に排卵を誘起できるため、キスペプチンニューロンへ入力する神経シグナルとそのシグナル伝達経路を明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

本研究は、排卵を人為的にコントロールできる交尾排卵動物のスunksを用い、(1) キスペプチンニューロンへ入力する上位神経機構、(2) キスペプチンニューロンを介した性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌機構を明らかにすることにより排卵制御の神経メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) キスペプチンニューロンへ入力する上位神経機構の解析

交尾刺激を脳に伝達する神経経路

逆行性神経標識法を用い、交尾刺激を受容する脛に投射する脊髄神経を探索した。

実験には、8週齢以上の性成熟に達した雌スunks (KAT 系統) を用い、ソムノペンチルによって麻酔した雌スunksの脛壁に、マイクロシリンジを用いて3種類のトレーサー物質、西洋ワサビ過酸化酵素 (HRP)、コムギ胚芽凝集素結合 HRP (WGA-HRP) およびコレラトキシンサブユニット B 結合 HRP (CTb-HRP) の混合液を注入した。注入から 48 時間後に 1% パラフォルムアルデヒド、1.25% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液にて灌流固定を行い、延髄、脊髄および脊髄神経節を採取した。常法に従い凍結切片を作製

し、HRP 酵素反応によりトレーサー物質を可視化し、顕微鏡下にて観察を行った。

### 脳の視索前野に投射する神経経路

本研究(2)における研究により、スunksの視索前野に存在するキスペプチンニューロンが排卵に関与することが明らかになったため、逆行性神経標識法により視索前野に投射する神経を探索し、交尾刺激をキスペプチンニューロンへ伝達する脳内の神経経路を推定した。

実験には、8週齢以上の性成熟に達した雌スunks (KAT 系統) を用い、4% パラフォルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液により灌流固定した雌スunks脳の視索前野に、カルボシアニン蛍光色素 (DiI) の結晶を埋め込んだ。その後脳を固定液に浸漬し、38で1-2ヶ月インキュベートした後、マイクロスライサーにより脳切片を作製し、蛍光顕微鏡下にて蛍光標識された神経の細胞体が存在する脳領域を探索した。

### (2) キスペプチンニューロンを介した GnRH 分泌機構の解析

雌スunks脳における *Kiss1* 発現細胞の局在を *in situ* hybridization によって解析した。実験には、8週齢以上の性成熟に達した雌スunks (KAT 系統) を用い、*Kiss1* 発現に対するエストロジェンの効果を検討するため、未処置群、卵巣除去群、卵巣除去+エストロジェン代償投与群における *Kiss1* 発現細胞数を比較した。さらに、交尾刺激によって誘起される排卵にキスペプチンニューロンが関与しているかどうかを検討するため、未交尾群と交尾群 (交尾後 1h) を用いて、*in situ* hybridization により *Kiss1* mRNA を、免疫組織化学により神経細胞の活性の指標となる c-Fos を二重標識し、*Kiss1* 発現細胞における c-Fos 発現を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) キスペプチンニューロンへ入力する上位神経機構の解析

交尾刺激を脳に伝達する神経経路

逆行性トレーサーを用いた軸索内輸送標識法により、スunksの脛には第 5 胸神経 (T5) から第 4 仙骨神経 (S4) の脊髄神経節においてトレーサーに標識された細胞体が観察された。これらのことより、スunksの脛には T5 から S4 の知覚性の脊髄神経が投射していることが明らかになった。T5 から S4 の知覚性の脊髄神経のうち、S2、S3 の脊髄神経節に標識細胞が最も多く存在していたため、S2、S3 の脊髄神経が主体となって交尾刺激 (触覚や圧覚) を受容するのではないかと考えられる。

一般に、下半身から触覚や圧覚などの一般体性感覚性の情報を伝える脊髄神経は、脊髄神経節に細胞体を有し、脊髄背角に投射して次の神経細胞に連絡する経路と脊髄の背角

に投射する前に分枝し、同側の脊髄背索（薄束）を通して延髄薄束核に投射する経路が存在する。そのため、本研究においてもスunksの脊髄背角または延髄薄束核の2つの領域でトレーサーによって標識された神経終末が観察されるのではないかと予想していたが、いずれの領域でも終末は確認できず、スunksの交尾刺激が脳に伝わる神経経路は明らかにできなかった。

研究代表者らがこれまでに行った交尾排卵動物のウサギを用いた同様の研究においては、S2とS3髄節背角にトレーサーによって標識された神経終末が観察されており、ウサギでは脊髄背角の2次知覚神経細胞が脳に投射すると考えられる。トレーサーの種類やトレーサーの輸送期間によって神経終末が標識されやすくなることがあるため、今後スunksにおいても条件をさらに検討し、再度解析する必要がある。

#### 脳の視索前野に投射する神経経路

Dilによって標識された神経細胞体は、外側中隔核や三角中隔核、扁桃核、オリブ核、傍小脳脚核、孤束核、薄束核と推定される脳領域に局在がみとめられた。また、分界条と推定される領域において、Dilによって標識された神経線維の束が観察された。

で述べたように、今回の研究ではスunksにおいて腔に投射している脊髄神経が終末する脊髄や脳領域が特定できなかったため、交尾刺激が脳に伝達される神経経路は未だ不明である。しかしながら、本研究においてDilによって標識された細胞体が延髄薄束核にみとめられたことより、一般性感覚性の情報を伝える脊髄神経の経路がスunksにも存在すると仮定すれば、スunksの交尾刺激を視索前野へ伝える神経経路の候補として、知覚性の脊髄神経が終末する延髄の薄束核を介した経路が考えられる。また、ラットやヒトでは迷走神経が交尾刺激の伝達に参与する可能性が示唆されている（Cueva-Rolon et al., 1996, Komisaruk et al., 2004）。本研究において、知覚性の迷走神経が終末する延髄の孤束核にDilに標識された細胞体がみとめられたことより、一般性感覚性を伝達する迷走神経が終末する延髄の孤束核を介してスunksの交尾刺激が伝達される経路が存在する可能性が考えられた。

#### (2) キスペプチンニューロンを介した性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)分泌機構の解析

雌スunks脳における *Kiss1* 発現細胞は、視床下部の視索前野ならびに弓状核の2つの領域に局在がみとめられた。未処置群、卵巣除去群、卵巣除去+エストロゲン代償投与群における *Kiss1* 発現細胞数を比較したところ、視索前野における *Kiss1* 発現細胞数は卵巣除去群において有意に減少した。また、

弓状核における *Kiss1* 発現細胞数は卵巣除去群において有意に増加した(図1)。これらのことより、視索前野における *Kiss1* 発現はエストロゲンによって促進的に制御され、弓状核における *Kiss1* 発現は抑制的に制御されていることが明らかになった。スunksにおいてキスペプチンニューロンは、エストロジェンのポジティブまたはネガティブフィードバック機構に参与している可能性が考えられた。

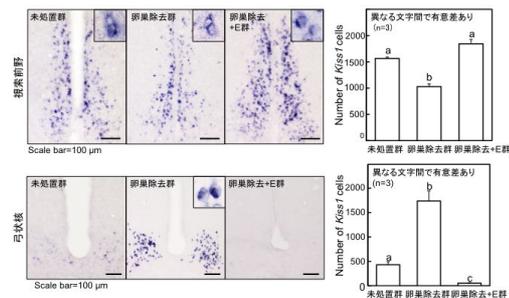


図1. スunks視索前野および弓状核における *Kiss1* 発現

c-Fos を指標とした交尾後のキスペプチンニューロンの活動を組織学的に検討したところ、視索前野の *Kiss1* 発現細胞に c-Fos が発現しているのがみとめられた(図2)。このことより、スunksにおいては交尾刺激が視索前野のキスペプチンニューロンを活性化することが明らかになった。

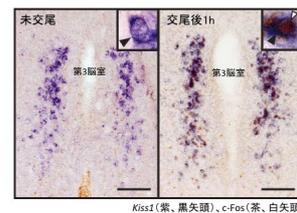


図2. スunks視索前野における *Kiss1*ならびにc-Fos発現

研究代表者らはこれまでに、スunks *Kiss1* 遺伝子をクローニングし、推定アミノ酸配列より合成したスunksキスペプチンを雌のスunksに単回皮下投与すると、交尾刺激がなくても排卵を引き起こすこと、ならびに GnRH の拮抗薬を合成キスペプチンと同時に投与すると、キスペプチン投与による排卵が阻害されることを明らかにしている(日本繁殖生物学会第101、103回大会)。本研究の結果とあわせて考察すると、スunksでは交尾刺激が視索前野のキスペプチンニューロンを活性化し、GnRHの放出を介して排卵を引き起こしていることが明らかになった。

本研究(2)の成果は、雑誌論文 Inoue N et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 17527-17532 (2011)に掲載され、当論文は Faculty of 1000 (医学生物学分野での特に優れた論文が推薦される評価システム)に選

ばれた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

. Tomikawa J, Uenoyama Y, Ozawa M, Fukanuma T, Takase K, Goto T, Abe H, Ieda N, Minabe S, Deura C, Inoue N, Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Tanaka S, Imamura T, Okamura H, Maeda K, Tsukamura H. Epigenetic regulation of *Kiss1* gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E1294-1301, (2012). 査読有

. 井上直子, 束村博子, 前多敬一郎. キスペプチンと生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌, *Clinical Neuroscience*, 30 巻: 220-222 頁, (2012). 査読無

. 井上直子, 上野山賀久, 大蔵聡, 束村博子, 前多敬一郎. 卵胞発育の中枢制御機構, *Hormone Frontier in Gynecology*, 18 巻: 391-394 頁, (2011). 査読無

. Inoue N, Sasagawa K, Ikai K, Sasaki Y, Tomikawa J, Oishi S, Fujii N, Uenoyama Y, Ohmori Y, Yamamoto N, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H. Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17527-17532, (2011). 査読有

〔学会発表〕(計10件)

. 井上直子, スンクスにおける交尾排卵制御機構, 第8回スンクス研究会, 自治医科大学, 2014.3.26

. 堀田章徳, 山本彩子, 後藤哲平, 平林真澄, 前多敬一郎, 大森保成, 本道栄一, 井上直子, 遺伝子改変スンクス作製に向けた胚移植法の確立, 日本繁殖生物学会第106回大会, 東京農工大学, 2013.9.12-14

. 大久保紫織, 大森保成, 山本直之, 本道栄一, 井上直子, 交尾刺激を伝達する神経回路の解明, 日本繁殖生物学会第106回大会, 東京農工大学, 2013.9.12-14

. 井上直子, スンクスにおける生殖制御機構, スンクスを用いた脳-末梢関連研究, 埼玉大学, 2013.2.16

. Hotta A, Hondo E, Ohmori Y, Inoue N. Analysis of promoter region of gonadotropin-releasing hormone 2 gene in the musk shrew (*Suncus murinus*), The 4th Congress of Asian Association of

Veterinary Anatomists, Thailand, Phuket, 2012.10.24-26

. Ohkubo S, Hondo E, Ohmori Y, Inoue N. Elucidation of neuronal circuits that transmit the mating stimulus in the musk shrew (*Suncus murinus*), The 4th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists, Thailand, Phuket, 2012.10.24-26

. Inoue N, Sasagawa K, Uenoyama Y, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H. Involvement of kisspeptin neurons in reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*), The 2nd World Congress on Reproductive Biology (WCRB), Australia, Cairns, 2011.10.11

. 猪飼耕太郎, 長谷川喜久, 山本直之, 大森保成, 本道栄一, 井上直子, スンクスにおける GnRH2 ニューロンの免疫組織化学的解析, 日本繁殖生物学会第104回大会, 盛岡, 2011.9.15-17

. 笹川佳倫, 猪飼耕太郎, 上野山賀久, 本道栄一, 前多敬一郎, 束村博子, 井上直子, スンクスの交尾排卵制御機構におけるキスペプチンニューロンの関与, 日本繁殖生物学会第104回大会, 盛岡, 2011.9.15-17

. 猪飼耕太郎, 大森保成, 本道栄一, 井上直子, スンクスの脳における GnRH2 ニューロンの局在, 東海実験動物研究会, 名古屋市立大学, 2011.7.23

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 直子 (INOUE, Naoko)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号: 90377789