

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 27 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871109

研究課題名(和文) GnRHパルスジェネレーターに対するニューロキニンの生理作用の解析

研究課題名(英文) Effect of Neurokinin B on the activity of the GnRH pulse generator

研究代表者

若林 嘉浩 (Wakabayashi, Yoshihiro)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・主任研究員

研究者番号：00510695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：弓状核キスペプチンニューロンに発現するneurokinin B (NKB)は、卵胞発育に必要なパルス状性腺刺激ホルモン分泌を制御すると考えられているが、その作用機構は不明である。本研究では、NKBの生理機能を解明するため、ヤギ弓状核キスペプチンニューロン局在部位近傍に薬剤投与用カニューラと神経活動記録電極を留置し、NKB局所投与時の神経活動変化と血中LH濃度を解析した。その結果、NKB投与によって、直ちに神経活動上昇とそれに伴うLH分泌が観察された。弓状核キスペプチンニューロンに発現するNKBは、パルス状LH分泌を誘起するために、ニューロン群の同期発火を引き起こす作用を持つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neurokinin B (NKB) in the arcuate nucleus (ARC) kisspeptin neurons might regulate the pulsatile secretion of GnRH/luteinizing hormone (LH) in mammals, however physiological function of NKB still remains unclear. To verify the physiological function of NKB, goats bearing the guide cannula with recording electrodes in the ARC, where kisspeptin neurons are located, were received micro injection of NKB. The local injection of NKB evoked bursts of the ARC kisspeptin neurons and following secretion of LH. These findings suggest that NKB in the ARC kisspeptin neurons stimulates the neural activity of the ARC kisspeptin neurons to burst simultaneously. This burst might be neural source of the pulsatile secretion of GnRH/LH.

研究分野：農学

キーワード：キスペプチン neurokinin B 弓状核

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の繁殖機能制御において、脳内における最上位中枢は Gonadotropin releasing hormone (GnRH)ニューロンであると考えられてきた。GnRH/黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) 分泌には、排卵を誘起するサージ状分泌と、卵胞発育に必要なパルス状分泌の2つの分泌形態が存在し、後者は視床下部に存在する GnRH パルスジェネレーターによって制御される。この概念は広く受け入れられてきたが、この神経機構の存在部位や、神経構成については不明であった。一方、近年の研究から、弓状核に密集して存在するキスペプチンニューロン群が、パルス状 GnRH/LH 分泌に関与することが示唆されている。申請者は、この弓状核キスペプチン神経系が、GnRH パルスジェネレーターの一部であると想定し、以下の研究を行ってきた。すなわち、シバヤギを用いて、弓状核キスペプチンニューロン局在部位に記録電極を留置し、その神経活動を多ニューロン発火活動 (Multiple-Unit Activity; MUA) として、覚醒下で記録するシステムを確立した。この手法を用いて、この部位の神経活動が、周期的 (卵巣除去個体では約 30 分毎) かつ一過性に上昇 (MUA ボレー) すること、また MUA ボレーはパルス状 LH 分泌を誘起することが示唆された。MUA は、留置電極近傍に位置する複数のニューロンから得られる活動記録であり、“ボレー”として確認される現象は、複数のニューロンの同期発火を反映している。しかし、どのようにしてニューロン群がこのような周期的な同期発火活動を営んでいるのか、その制御機構は不明である。近年、多くの哺乳類の弓状核キスペプチンニューロンは、neurokinin B (NKB) とその受容体 (NK3R) を共発現していること、更に、NKB または NK3R に変異を持つヒトでは、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を呈することが報告され、NKB は繁殖機能制御にとって重要な役割を持つことが明らかとなっている。しかし、その生理機能については不明であった。これまでに申請者は、ヤギを用い、NKB または senktide (NK3R 特異的アゴニスト) の脳室投与および末梢投与が、MUA ボレー/パルス状 LH 分泌を直ちに誘起することを明らかにした。また、マウス弓状核切片を用いた電気生理学の実験から、NKB が弓状核キスペプチンニューロン自身の発火を促進することが報告されている。これらの結果から、我々は弓状核キスペプチンニューロンから分泌された NKB が近傍に存在する複数のキスペプチンニューロンを次々に発火させることで多くのニューロンの同期発火を誘起し、一過性神経活動上昇 (= MUA ボレー) が形成されるというモデルを提唱した。外部から投与した NKB は直ちに MUA ボレーとそれに追従したパルス状 LH 分泌を引き起こすため、見かけ上は直接、弓状核キスペプチンニューロンに

作用する様に見える。しかし NKB 受容体である NK3R は生体内では様々な末梢器官に発現が見られる。中枢においても、弓状核キスペプチンニューロン以外にも様々な脳部位に発現することが知られている。このため、実験的に投与された NKB の作用部位は特定されていない。動物個体を用いて、弓状核キスペプチンニューロン自身への NKB 局所投与を行った際の神経活動を解析する手法が存在しないため、生体内での NKB の弓状核キスペプチンニューロンに対する生理作用は未だ不明瞭な点が多い。

2. 研究の目的

これまでの様々な研究から、NKB は哺乳類の繁殖制御にとって重要な役割を持っており、LH 分泌を促進する作用があることが示されている。しかし、視床下部において、その作用機構は未だ明らかとなっていない。そこで、NKB の繁殖中枢における作用機構を明らかにするために必要な実験手法として、反芻家畜のモデルであるシバヤギの弓状核キスペプチンニューロン局在部位への薬剤の局所投与と、投与部位近傍における神経活動変化をリアルタイムにモニターする実験手法を確立することにした。次に、この実験手法を用いて、実際に NKB を局所投与した際の弓状核キスペプチンニューロン神経活動解析と血中 LH 濃度を解析することによって、NKB の作用機構解明と、パルス状 GnRH/LH 分泌を制御するための神経機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NKB の弓状核キスペプチンニューロンに対する生理作用を解析する目的で、卵巣除去シバヤギを用いて、左右両側に存在する弓状核キスペプチンニューロン群のうち、左側には薬剤投与用カニューラおよびその近傍に記録電極を留置した。同時に、反対側には、複数の記録電極を留置するための脳定位固定手術を行った。一定の回復期間を置いた後、留置した記録電極より周期的に起こる MUA ボレーが確認できた個体を、以降の実験に用いることとした。

(2) 覚醒下のヤギより MUA 記録を行いつつ、弓状核キスペプチンニューロン局在部位へ薬剤局所投与用カニューラを介して、100 pmol あるいは 300 pmol の NKB、vehicle (対照) を、100nl/分の流速で1分間局所投与を行った。また、局所投与前後に6分毎に、径静脈に装着したカテーテルを介して頻回採血を行い、ラジオイムノアッセイを用いて血中 LH 濃度を測定し、神経活動変化と比較した。

(3) 投与部位を確認するために、実験に供試した局所投与用カニューラ/記録電極留置ヤギに、5% FITC 標識デキストラミンを

微量投与した。投与終了後、直ちに 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。弓状核を含む視床下部を採材し、クライオスタットを用いて 14 μ m の凍結切片を作製した。アルカリフォスファターゼ標識抗 FITC 抗体および抗キスペプチン抗体を用いた二重免疫組織化学染色を行い、投与色素を NBT/BCIP により、一方、キスペプチンを DAB で可視化することによって同一切片上で両者の局在を観察した。

4. 研究成果

(1) 上述の研究手法に即した神経活動記録実験手法の改良を行うことで、従来の弓状核キスペプチンニューロン近傍からの神経活動記録に加え、記録電極と薬剤投与用カニューラを同一部位に留置した動物を作出することができた。計 11 頭の卵巣除去シバヤギを用いてカニューラ/記録電極留置手術を行ったところ、6 頭において、投与用カニューラ近傍より神経活動を解析することが可能であった。また、このうち 4 頭では、左右両側より神経活動解析を行うことが出来た。これらの個体では、左右に留置された電極によって記録される MUA ボレーの頻度とタイミングは完全に同期していた。このことから、左右両側に存在する弓状核キスペプチンニューロン群の神経活動は完全に同期しているものと考えられた。

(2) 上記のヤギを用いて、NKB を局所投与した際の神経活動の変化をリアルタイムに観察した。その結果、NKB の局所投与によって、直ちに投与部位近傍の神経活動の上昇が観察された。更に、投与前後における血中 LH 濃度を測定した結果、神経活動上昇と同期した血中 LH 濃度の上昇が観察された(図 1 左上・折線)。左右両側の神経活動記録が可能で、同様の NKB 局所投与実験を行ったところ、投与部位近傍の神経活動だけでなく、反対側の神経活動が同期して上昇することが明らかとなった(図 1 左下)。Vehicle を投与した場合(対照)では、投与側および反対側共に神経活動は全く変化しなかった(図 1 右)。陰性対照として、投与カニューラ近傍より神経活動が記録出来ない個体(=留置したカニューラ/記録電極が弓状核キスペプチンニューロン局在部位に存在しない)を用いて、同様の NKB 局所投与を行ったところ、これらの個体においては、反対側の神経活動上昇および血中 LH 濃度の変化は観察されなかった。

(3) 局所投与実験/神経活動解析実験が終了した後に、局所投与用カニューラより色素(5% FITC 標識デキストランアミン)を微量注入し、弓状核を含む領域の脳切片を作製した。投与した色素が拡散した範囲を可視化した結果、局所投与カニューラ近傍の記録電極によって MUA ボレーが観察された個体については、色素が弓状核キスペプチンニューロンの分布領域まで到達していることが明らか

となった。一方、局所投与カニューラ近傍の記録電極より MUA ボレーが観察出来なかった個体では、カニューラおよび電極は、弓状核キスペプチンニューロン局在部位から離れた場所に位置しており、弓状核キスペプチンニューロンは投与色素の拡散の範囲外に分

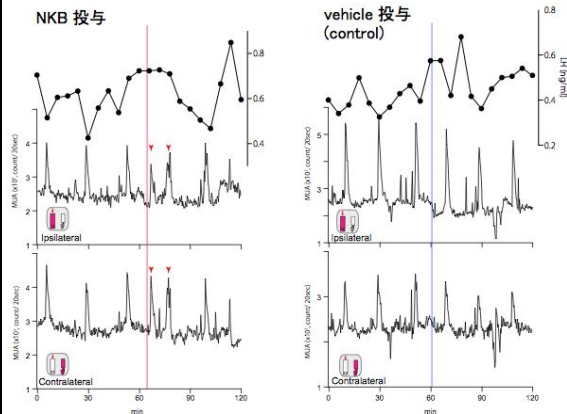


図1 弓状核キスペプチンニューロン局在部位近傍へ NKB (左) あるいは vehicle (右) を局所投与した際の神経活動変化。

NKB の投与によって、投与部位近傍の神経活動が直ちに上昇した(左上図、赤矢印)。また、投与部位とは反対側の弓状核においても、MUA ボレーが観察された(左下図)。この反応と同期した血中の LH 濃度上昇が観察された。一方、vehicle 投与(右図)では、投与側および反対側の神経活動は全く変化しなかった。

布していることが明らかとなった。

本研究の結果から、外因性に投与された NKB は、弓状核キスペプチンニューロンに直接作用することによって、その神経活動上昇を引き起こすものと考えられた。この神経活動の一過性の上昇が、GnRH 分泌を介して、最終的に LH 分泌を誘起するものと考えられた。更に、左右両側性に存在するキスペプチンニューロン群は、互いに神経線維によるネットワークを形成することが明らかになっており、この神経連絡を用いて、左右の神経活動を同期させる機能をもっていることが示唆された。これらのことから、弓状核キスペプチンニューロンに内因性に発現している NKB は、近傍に分泌され、自身が発現する NK3R によって受容されることによって、複数のキスペプチンニューロンを同期発火させる働きを持つと考えられる。本研究における研究成果をもとに、NKB の作用の模式図を図 2 に示す。

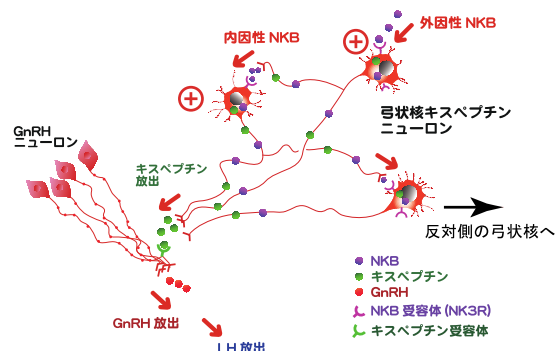


図2 本研究から想定される弓状核キスペプチンニューロン群における NKB の機能と神経回路による情報伝達経路(模式図)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

若林嘉浩、山村崇、大蔵聡、岡村裕昭 .
シバヤギキスペプチンニューロン分布領域への Neurokinin B 局所投与が GnRH パルス産生におよぼす影響 第 107 回 日本繁殖生物学会大会 平成 26 年

若林嘉浩、山村崇、大蔵聡、岡村裕昭 .
弓状核への Neurokinin B 局所投与により誘起された神経活動上昇は反対側の弓状核キスペプチンニューロン群へ伝達される 第 108 回 日本繁殖生物学会大会 平成 27 年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

若林 嘉浩 (WAKABAYASHI YOSHIHIRO)

国立研究開発法人農業生物資源研究所

動物生産生理機能研究ユニット

主任研究員

研究者番号: 00510695

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: