

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18984

研究課題名(和文) 脳内炎症時におけるGnRHニューロンの新規調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigating the regulation of GnRH neurons in the neuroinflammation

研究代表者

大谷 佐知(桑原佐知)(Kawahara-Otani, Sachi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40412001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では炎症性サイトカインと神経内分泌細胞の関係性に着目し、IL-18受容体鎖(IL-18R)とIL-18発現細胞の同定を行った。IL-18RはGnRHニューロンの約60%、IL-18は全てのGnRHニューロンに発現することが明らかになった。次にGnRH産生細胞株であるGT1-7細胞においてIL-18とIL-18Rの発現を確認した。またGT1-7細胞においてはTNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6とその受容体の発現についても認められた。以上の結果から、上記の炎症性サイトカインはオートクラインあるいはパラクラインによりGnRHニューロンの機能を直接調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on the relationship between inflammatory cytokines and neuroendocrine cells, and identified IL-18R $\alpha$ -expressing and IL-18-expressing cells in the male mouse and rat forebrain. IL-18R $\alpha$  was expressed in approximately 60% of GnRH-immunopositive perikarya, and IL-18 was distributed in all GnRH-immunopositive perikarya. We next confirmed the expression of IL-18 and its receptor in GT1-7 cells, a GnRH-producing cell line. We also detected the expression of other inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6, and their receptors in GT1-7 cells. Our observations indicate that these inflammatory cytokines may exert direct effects upon GnRH neurons via their specific receptors. There is a possibility that these cytokines regulate the function of GnRH neurons in an autocrine or paracrine manner.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：GnRHニューロン 炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の生殖機能は視床下部 - 下垂体 - 性腺軸 (HPG 軸) により制御されている。視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は下垂体前葉のゴナドトロフの機能の調節に直接関わる重要なホルモンである。GnRH を分泌する神経内分泌細胞、すなわち GnRH ニューロンの細胞体は視床下部視索前野を中心に存在し、同じく視床下部の正中隆起にその軸索終末を伸ばし、ホルモンを分泌する。したがって視床下部に局在する GnRH ニューロンの機能調節メカニズムを明らかにすることは、生殖機能の向上や中枢に起因する生殖機能障害の病態解明、さらには新しい治療法の開発につながると思われる。

ストレスは生殖機能の低下を引き起こす大きな要因となっている。これはストレスが GnRH のパルス状分泌を抑制し、下垂体から黄体刺激ホルモンの分泌を抑えるためである (Li *et al.*, 2010)。ストレスにより引き起こされる GnRH の分泌低下は、主に副腎から分泌されるグルココルチコイドに起因すると考えられている (Calogero *et al.*, 1999) が、詳細な機序について不明な点が多く、ストレス下における GnRH の分泌抑制に関してはさらなる解明が必要である。近年、ストレスにより脳内炎症が引き起こされることが報告されており (Bartfai *et al.*, 2007、Nakatomi *et al.*, 2014) 末梢グルココルチコイド以外にもストレスにより脳内で産生される炎症性サイトカインが GnRH ニューロンに直接作用してストレス応答を引き起こす可能性が示唆される。

インターロイキン (IL) -18 はインターフェロン- $\gamma$  を誘導する因子として発見された炎症性サイトカインである (Okamura *et al.*, 1995)。IL-18 は免疫系の細胞だけでなく、脳においても恒常的に発現し、脳損傷やストレスによって増加することが報告されている (Sugama *et al.*, 2007)。また IL-18 ノックアウトマウスの解析により、IL-18 には中枢神経系を介した食欲抑制作用があり (Netea *et al.*, 2006) IL-18 は脳において記憶や長期増強に関係することが分かっている (Cumiskey *et al.*, 2007)。以上のことから IL-18 は神経細胞に直接作用し、その機能を調節するはたらきがあると考えられる。

一方、IL-18 受容体は脳に広範に分布することが報告されている (Alboni *et al.*, 2009, 2011)。しかし、これらの報告は IL-18 受容体が脳においてどの細胞タイプに発現するかなど詳細な同定には至っておらず、視床下部における神経内分泌細胞との関連については未だ分かっていない。また IL-18 以外の IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインについても同様であり、GnRH ニューロンの機能に対するそれらの炎症性サイトカインの作用は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、視床下部における IL-18 とその受容体の発現細胞を明らかにすることを目的とする。また、マウス由来 GnRH ニューロンの不死化細胞株として樹立された GT1-7 細胞における炎症性サイトカインとその受容体の発現を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 視床下部における IL-18 とその受容体の発現細胞の同定

マウスおよびラットの脳の組織切片を用いて、*in situ* hybridization 法ならびに免疫組織化学法を行い、視床下部における IL-18 受容体 鎖 (IL-18R $\alpha$ ) および IL-18 の mRNA、タンパク質の発現を観察した。さらにニューロンやグリアのマーカーとの蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察することにより、IL-18R $\alpha$  発現細胞ならびに IL-18 産生細胞の同定を試みた。

(2) GT1-7 細胞における炎症性サイトカインとその受容体の発現

マウス由来 GnRH ニューロンの不死化細胞株として樹立された GT1-7 細胞 (Mellon *et al.*, 1990) を用いて以下の実験をおこなった。GT1-7 細胞を培養後、細胞を回収し、TRIzol を用いて total RNA を抽出した。その後、逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、主要な炎症性サイトカイン (IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) とその受容体に対するプライマーを用いて PCR を行い、mRNA の発現の有無を検討した。また IL-18 と IL-18R $\alpha$  に対しては、(1) の実験で用いた抗体を使用し、Western blot 法を行い、タンパク質の検出を試みた。

(3) TNF- $\alpha$  による GT1-7 細胞への影響の検討

(2) の結果から、mRNA の発現量が比較的高かった TNF- $\alpha$  受容体に着目して実験を行った。GT1-7 細胞を 3 日間培養後、リコンビナント TNF- $\alpha$  を 0, 10, 20, 40ng/ml の濃度でそれぞれ培養液中に添加し、30 分後、4% パラフォルムアルデヒドで細胞を固定した。その後、転写因子である NF- $\kappa$ B p65 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、NF- $\kappa$ B p65 の細胞内の局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察した。

## 4. 研究成果

(1) 視床下部における IL-18 とその受容体の発現細胞の同定

*in situ* hybridization 法ならびに免疫組織化学法の結果より、視床下部において、IL-18 および IL-18R $\alpha$  の mRNA、とタンパク質の発現が観察された。IL-18R $\alpha$  と GnRH の抗体を用いた二重染色の結果より、IL-18R $\alpha$  は約 60% の GnRH ニューロンに発現することが

分かった。一方、IL-18 に関してはこれまでの報告により、脳では主に Iba-1 陽性のミクログリアに発現し、損傷やストレスにより発現が増強することが分かっている (Sugama *et al.*, 2007)。今回の研究において IL-18 はミクログリアだけでなく GnRH ニューロンにも発現することが明らかになった。また本実験で用いた正常動物ではミクログリアにおける IL-18 タンパク質の発現は微弱であったが、GnRH ニューロンにおいては全ての細胞で IL-18 陽性反応が認められ、その反応性はミクログリアに比べ、非常に強かった。このことから、GnRH ニューロンは、非炎症下においても IL-18 をタンパク質レベルで高発現し、オートクラインあるいはパラクラインにより、GnRH ニューロンに作用する可能性が示唆された。

今後はストレス負荷時に GnRH ニューロンに発現する IL-18 がどのような変化を示すのかを検討する予定である。また IL-18 以外の炎症性サイトカインについても視床下部における受容体の発現を組織化学的に検討する予定である。

#### (2) GT1-7 細胞における炎症性サイトカインとその受容体の発現

IL-18, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  に対する各受容体の mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した結果、GT1-7 細胞において検討を行ったすべての受容体の発現が確認された。また IL-18R に関しては、Western blot 法によって、タンパク質レベルでの発現が確認できた。以上の結果から、上記の炎症性サイトカインは GT1-7 細胞に直接作用する可能性が考えられた。

一方、GT1-7 細胞において各炎症性サイトカインの発現についても RT-PCR 法により検討を行ったところ、IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  は微弱ながら mRNA の発現が確認できた。なかでも IL-18 mRNA は他の炎症性サイトカインに比べその発現が極めて高く、Western Blot 法によりタンパク質の発現も確認できた。この結果は (1) の *in vivo* における結果を反映しており、GnRH ニューロンにおける IL-18 の機能を解析する上で GT1-7 細胞はよいモデル細胞になり得ると考えられる。

#### (3) TNF- $\alpha$ による GT1-7 細胞への影響の検討

(2) の結果から、mRNA の発現量が比較的高かった TNF- $\alpha$  受容体に着目して TNF- $\alpha$  の添加実験を行った。GT1-7 細胞において、転写因子である NF- $\kappa$ B p65 に対する抗体を用いて免疫染色を行った結果、NF- $\kappa$ B p65 は TNF- $\alpha$  を添加していない状態では細胞質に局在することが分かった。TNF- $\alpha$  の添加により、検討を行ったいずれの濃度においても NF- $\kappa$ B p65 の発現は核内に局在することが明らかになった。この結果は、TNF- $\alpha$  に

よって NF- $\kappa$ B p65 が細胞質から核内へ移行したことを示している。TNF- $\alpha$  は GT1-7 細胞に直接作用し、様々な遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が考えられた。

今後は TNF- $\alpha$  添加による GnRH の合成や分泌への影響を検討するとともに、他の炎症性サイトカインについても同様の実験を行っていく予定である。

#### 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 1 件)

Kuwahara-Otani S, Maeda S, Kobayashi K, Minato Y, Tanaka K, Yamanishi K, Hata M, Li W, Hayakawa T, Noguchi K, Okamura H, Yagi H. Interleukin-18 and its receptor are expressed in gonadotropin-releasing hormone neurons of mouse and rat forebrain. *Neurosci. Lett.* 650 33-37, 2017 査読有

DOI: 10.1016/j.neulet.2017.03.051

[学会発表](計 2 件)

大穂雄太、大谷佐知、湊雄介、前田誠司、八木秀司. GT1-7 細胞におけるサイトカイン受容体の発現について. 第 123 回日本解剖学会・全国学術集会 2018 年 3 月 28 日 東京都武蔵野市・日本医科大学武蔵境校舎

大谷佐知、湊雄介、前田誠司、田中宏一、早川徹、岡村春樹、八木秀司. GnRH ニューロンにおける IL-18 関連遺伝子の発現について. 第 59 回日本神経化学大会 2016 年 9 月 8 日 福岡県福岡市・福岡国際会議場

[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

大谷 佐知 (KUWAHARA-OTANI,  
Sachi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40412001

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )