

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19010

研究課題名(和文)生殖機能中枢キスペプチンニューロンを制御する神経ネットワークの解明

研究課題名(英文)Identification of neural populations projecting kisspeptin neurons in rat brain

研究代表者

託見 健 (Takumi, Ken)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：40553269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の生殖機能に必須の神経ペプチド、キスペプチンを産生するキスペプチンニューロンへ投射している神経細胞集団を同定することを目的とした。WGAの弓状核への注入により、視床下部のいくつかの細胞集団が標識されたが、注入部位でのトレーサーの拡散範囲が広く、正確な投射元の集団を同定は困難であった。免疫組織化学によりVGAT、およびVGlut2陽性の点状構造がキスペプチンニューロンへ近接していることが確認されたことから、GABA作動性ニューロンとグルタミン酸作動性ニューロンがキスペプチンニューロンへ神経線維を投射している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify the neuronal populations projecting kisspeptin neurons which regulate reproductive functions in mammals. Although injection of WGA to the arcuate nucleus resulted in labeling neurons in several contralateral nuclei, it is difficult to identify the neuronal populations since injection site was not limited. Dual-immunohistochemistry revealed that VGAT immunopositive puncta and VGlut2 immunopositive puncta were closely apposed to kisspeptin neurons. This suggests that GABAergic and Glutamatergic neurons are a part of neuronal populations which project and regulate kisspeptin neurons.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：キスペプチン 視床下部 神経回路

1. 研究開始当初の背景

キスペプチンは性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を促進する神経ペプチドであり、哺乳類の生殖機能には必須を分子である。視床下部においてキスペプチンを産生するキスペプチンニューロンは前腹側室周囲核 (AVPV) と弓状核に主に局在し、エストロゲンなどの性ステロイドホルモンによるネガティブフィードバック、ポジティブ・フィードバックを受け、精子形成、卵胞発育、排卵に重要な働きを持つことが明らかとなっている。

これまでキスペプチンニューロンには性ステロイドホルモンの他に、栄養状態、ストレスなど様々な因子が作用することが判明し、キスペプチンニューロンは生体内外からの様々な情報を統合し、生殖機能の調節が実現に貢献していると考えられる。しかしながら、脳内の他の神経細胞からキスペプチンニューロンへの神経性入力についての報告はほとんどなく、どの神経伝達物質をもつ入力があるのか、またそれらはどの神経核からの投射であるのかなど不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

生殖機能の制御システムについての知見を与えるためには、現在まで明らかとされてきたキスペプチンニューロンへ影響を及ぼす液性因子に加え、キスペプチンニューロンを制御する神経ネットワークを明らかにすることが重要である。本研究では、組織学的手法を用いて、キスペプチンニューロンへ投射している神経細胞集団の同定、それらの機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) アデノ随伴ウイルスを用いた逆行性トレーサー遺伝子導入

キスペプチンニューロン特異的に逆行性トレーサーを発現させるため、キスペプチン遺伝子 (Kiss1) のプロモーター下でテタヌス毒素 C フラグメント (TTC) と GFP のフュージョンタンパク質 (GFP-TTC) を発現させるアデノ随伴ウイルスの作製し、キスペプチンニューロンの局在する AVPV と弓状核に注入する。組織学的解析により GFP で標識された神経核を同定する。

(2) 逆行性神経トレーサーを用いた解析

前項 (1) のウイルス作製が困難になったため、逆行性神経トレーサーを用いる実験を計画した。卵巣摘除し、低濃度エストロゲンを溶いたオイルを充填したシリコンチューブを皮下にインプラントした成体メスラットを用いた。脳固定装置とハミルトンシリンジを用いて、キスペプチンニューロンの存在する弓状核に Alexa Fluor594 で標識された WGA を微量注入した。WGA 注入から 24 から 48 時間後に 4%パラホルムアルデヒドを含む固

定液を灌流、固定し、凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で検鏡した。

(3) 蛍光二重免疫染色による投射元神経細胞の同定

卵巣摘除後に灌流固定したメスラットの凍結脳切片を用いた。キスペプチンに対する抗体と GABA 作動性神経終末マーカーである小胞性 GABA トランスポーター (VGAT) もしくはグルタミン酸作動性神経終末マーカーである小胞性グルタミン酸トランスポーター 2 (VGlut2) に対する抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡により画像を取得した。

4. 研究成果

(1) キスペプチンニューロン特異的に遺伝子を発現させるアデノ随伴ウイルスの作製を試みた。

ウイルス作製の第 1 段階として、ラットキスペプチン遺伝子 (rKiss1) の上流領域に続いて EGFP 遺伝子を含むコンストラクトを作製した。しかしながら、ウイルスの作製段階でコンストラクトに不都合があることが判明したため、すでに確立していた GnRH 遺伝子プロモーターと EGFP 遺伝子を含む発現ベクターを利用して作製し直すことにした。しかしながら、コロニー PCR によるセレクションでポジティブなクローンが得られず、ウイルス作製は叶わなかった。

(2) WGA を注入した反対側の弓状核、扁桃体に Alexa Fluor594 の蛍光シグナルをもつ細胞がみとめられた。しかしながら、注入部位周辺での色素の拡散範囲が大きく、弓状核以外の脳部位へ投射している神経細胞も同時に標識されてしまっている可能性が高い。そのため、より限定的に試薬注入ができる機器を用いて再試行する必要がある。また、逆行性トレーサーを候補の神経核に注入し、投射が存在することを確認する必要がある。

(3) 弓状核のキスペプチン免疫陽性細胞の周辺に多数の VGAT、VGlut2 免疫陽性の点状構造が観察された。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた撮影により、VGAT 陽性構造、VGlut2 陽性構造どちらもキスペプチンニューロンに近接していることが明らかとなった (図 1 および図 2)。この結果から、少なくとも GABA 作動性神経とグルタミン酸作動性神経が神経線維をキスペプチンニューロンへ投射している可能性が示唆された。しかしながら、これらの神経投射がどの神経核に由来するものであるかは不明のままであり、今後トレーシング実験との組み合わせにより解明していく必要がある。

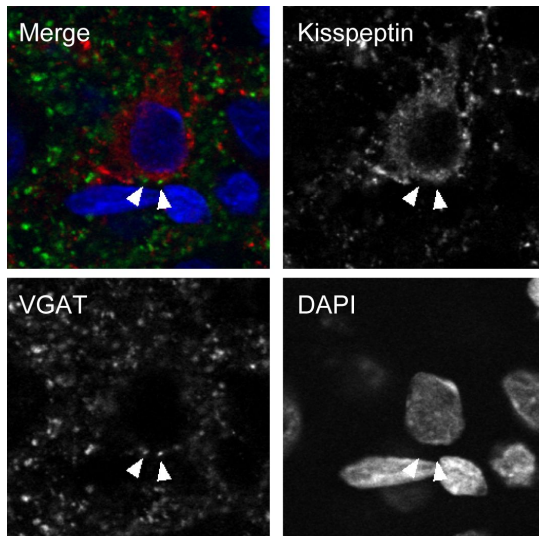


図 1

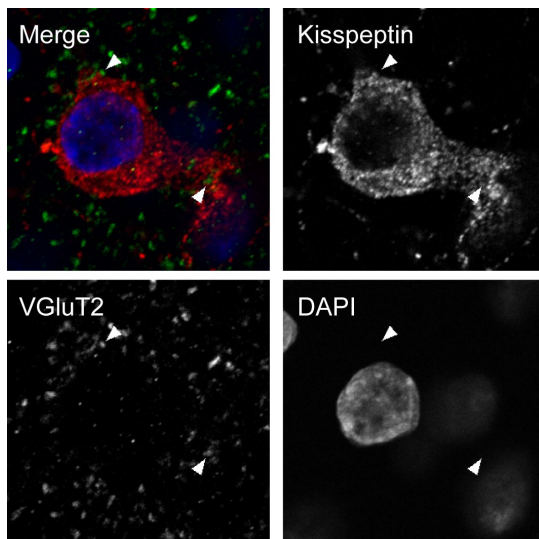


図 2

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 3件)

1. Tomori Y, Iijima N, Hinuma S, Ishii H, Takumi K, Takai S, Ozawa H. "Morphological analysis of trafficking and processing of anionic and cationic liposomes in cultured cells." *Acta Histochemica et Cytochemica*. 2018 51: 81-92. doi: 10.1267/ahc.17021. 査読あり
2. Iijima N, Miyamoto S, Matsumoto K, Takumi K, Ueta Y, Ozawa H. "Development of an imaging system for in vivo real-time monitoring of neuronal activity in deep brain of free-moving rats." *Histochemistry*

and Cell Biology. 2017 148: 289-298. doi: 10.1007/s00418-017-1576-2. 査読あり

3. Tomori Y, Takumi K, Iijima N, Takai S, Ozawa H. "Kisspeptin expressions in decreased in the arcuate nucleus of hypothyroid female rats with irregular estrus cycles." *Neuroscience Research*. 2017 117: 35-41. doi: 10.1016/j.neures.2016.11.005. 査読あり

[学会発表](計 4件)

1. 託見健, 金谷萌子, 佐越祥子, 永田和代, 小川園子, 小澤一史. "エストロゲン受容体サブタイプ(,)のキスペプチン発現調節における役割の解明" 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月
2. 楊春英, 託見健, 小澤一史. "性成熟に伴う正中隆起の星状グリア細胞の形態変化及び GnRH ニューロン軸索終末との連関" 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月
3. 友利裕二, 託見健, 飯島典生, 小澤一史. "甲状腺機能低下が視床下部におけるキスペプチン発現に及ぼす影響" 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月
4. 飯島典生, 託見健, 石井寛高, 岩田衣世, 楊春英, 肥後心平, 小澤一史. "日本医科大学における実習手順 全体のデザイン、モチベーション、評価" 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月

[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

託見 健 (TAKUMI Ken)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：40553269

(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

()