

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03931

研究課題名(和文) 極微小蛍光顕微鏡を利用した脳内プロスタグランジンによるGnRH分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) in vivo fluorescence imaging research on the possible role of prostaglandins in modulation of GnRH secretion

研究代表者

松脇 貴志 (Matsuwaki, Takashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20447361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳内のプロスタグランジン(PGs)は、雌動物の排卵誘起に必須であるGnRH/LHサージの発生に重要と考えられる。本研究では、GnRHニューロンの局在する視索前野においてPGsの合成酵素COX1およびCOX2の発現量がサージ発生の数時間前に著しく低下することを明らかにした。さらに、主要なPGsの一つであるPGE2の合成酵素mPGES-1の遺伝子欠損ラットを作製した。一方、GnRHニューロン特異的にGFPを発現するラットの視索前野に刺入した光ファイバーから得られた像を蛍光顕微鏡と高解像度のカメラで解析することで、生きた動物の脳内でのGnRHニューロンを観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、COX-1は発現量の変動がない構成型、COX-2は炎症刺激で発現量が増加する誘導型として知られていた。しかし本研究で、雌の発情周期に依存して両酵素の脳内発現量の変動するという新しい知見が得られた。この事実は、これまで不明だったPGsによるGnRH/LH分泌制御機構の解明のための大きな一助となる。また、本研究で確立したin vivo 蛍光観察法は、実験動物を生かしたまま脳深部を観察することが出来るため、GnRHニューロンに限らず様々な神経細胞活動の解析に広く活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：- Using the transgenic rats with GFP expression in GnRH neurons, we have established a novel in vivo fluorescence imaging system for observation of the living GnRH neurons in the deep part of brain. The cell bodies were clearly distinguishable as a single-cell level.
- In wild-type cycling female rats, the expression levels of both COX-1 and COX-2 dropped in the noon of proestrus stage.
- We have generated mPGES-1 KO rats, using CRISPR/Cas12a-gene editing method. The rats lacks splice acceptor site in exon2.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：GnRHmニューロン 神経興奮 in vivo 脳内蛍光顕微鏡 プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸 (HPG 軸) により制御されている。視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) と、それに分泌誘起される下垂体からの黄体形成ホルモン (LH) は、雌雄に共通のパルス状と雌にのみ存在し排卵を誘起するサージ状という二つの特徴的な分泌パターンを有する。我々の研究室ではこれまで、これらの GnRH/LH 分泌すなわち生殖機能の内分泌学的な制御機構において重要な働きを持つ因子の一つとしてプロスタグランジン類 (prostaglandins, PGs) に着目し、研究を進めてきた。その過程で、PGs 合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX) の働きを阻害すると LH サージが消失することや、PGs のサブタイプの一つである PGE₂ の脳内投与により LH の一過性大量分泌が誘起されることを見出した (Matsuwaki *et al.*, *J Neuroendocrinol.* 2017)。これらの結果は、GnRH/LH のサージ状分泌に PGs が強く関わることを示唆するものである。

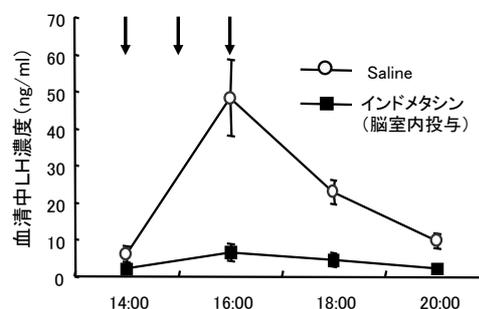


図1. インドメタシンの脳内投与によるLHサージ抑制

2. 研究の目的

PGs はアラキドン酸から COX の働きで共通の前駆体である PGH₂ に変換され、その後個々の酵素によって PGE₂ や PGD₂、PGF_{2α} などの各種 PG が合成される。COX は構成型の COX-1 と誘導型の COX-2 という二種類のサブタイプをもつ。そこで本研究では、実験 1 で GnRH/LH サージ形成時の脳内の COX-1、COX-2 および各 PG の最終合成酵素群の発現量を測定し、サージ形成における PGs の役割についてより詳細な検討を試みた。実験 2 では、GnRH サージの新たな解析法の確立を試みた。GnRH ニューロンの興奮状態の評価法はこれまでパッチクランプ法や多ニューロン発火活動 (MUA) 記録法など手技が困難なものが主流であった。加えて GnRH ニューロンは一個体あたりの数が少なく空間的に分散しており、他のニューロンによる機能の修飾が強く予想されることから、生体に近い条件下での解析が重要である。そこで本研究ではより簡便に GnRH 系の解析を行うため、*in vivo* 蛍光内視鏡と GnRH ニューロン特異的に緑色蛍光蛋白質 GFP を発現する遺伝子改変ラット (GnRH-GFP ラット) を用いることで、生体内における GnRH ニューロンの興奮状態を観測可能な系の立上げを目指した。さらに実験 3 として、主要な PGs の一つである PGE₂ の誘導型合成酵素 microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) の遺伝子を欠損するラットの作出を行なった。

3. 研究の方法

実験には午前 5 時点灯の明期 14 時間周期で飼育された Wistar-Imamichi 系雌ラットを用いた。尾静脈からの経時的な採血により血中 LH 濃度を測定した結果、過去の報告と同様に、発情前期の 16 時をピークとする LH サージが観察された。実験 1 ではこの結果に基づき発情前期の正午と夕方に、GnRH 神経細胞の細胞体が局在している領域である視索前野を採取し、Real Time-PCR により各酵素の mRNA 発現量を評価した。実験 2 では初めに、LH サージを抑制しない注射麻酔薬を検討するため、3 種混合麻酔薬もしくは α -クロラロースを発情前期の 15 時に腹腔内投与し、LH 濃度を測定した。その結果、3 種混合麻酔薬投与群のみで LH サージが抑制され、 α -クロラロース投与群では通常の LH サージが観察された。そこで、本実験では α -クロラロース麻酔を採用した。麻酔下で GnRH-GFP ラットを脳定位固定装置に固定後、頭蓋骨にドリルを用いて穿孔した。この孔に蛍光観察用プローブを挿入し、イメージングソフトウェア VisiView を用いて観察を行った。実験 3 では *mptes-1* 遺伝子の *exon2* 内に存在する配列を標的として、CRISPR/Cas12a 法によるゲノム編集技術を用いて遺伝子欠損ラットの作出を試みた。受精卵への遺伝子導入法としては、卵管内に直接ゲノム編集用試薬の注入と電気穿孔処置を行う GONAD 法を用いた。

4. 研究成果

実験1 各 PG 合成酵素はいずれも LH サージ前後で mRNA レベルの変化は生じなかったが、COX-1 と COX-2 の mRNA は発情前期正午での発現量が有意に少なかった。LH サージの起こらない発情休止期ではこのような日内変動は観察されなかった。発情前期の正午は血中エストロゲン濃度が最も高い時間帯であることから、エストロゲンが COX の発現量を変化させた可能性を検討するため、卵巣を摘出した雌ラットにエストロゲンを血中濃度が発情前期と同程度になるように処置し、投与 5 時間後の COX

mRNA 発現量を測定した。その結果、COX-1 については有意な差は見られなかったが、COX-2 ならびに COX-2 の発現誘導に参与する核因子- κ B (NF- κ B) の mRNA 発現量はエストロゲン処置群で低い傾向を示した。さらに、COX を発現していると考えられるミクログリアの局在と活性化を検討するため、ミクログリアの汎マーカーの Iba1 もしくは活性化マーカーである CD68 抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったが、その数や局在は変化していなかった。

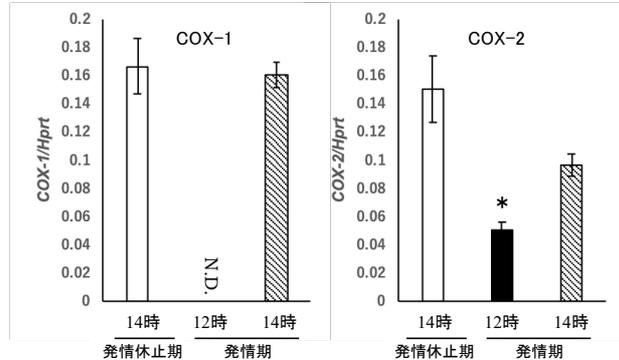


図2. GnRHニューロン細胞体周辺部位におけるPG合成酵素の発現量

実験2 麻酔下にある GnRH-GFP ラットの視索前野において、GnRH ニューロンの細胞体由来と推定される強い蛍光を観測することが出来た。同実験系のラットに、GnRH プロモーター活性を抑制するリポポリサッカライド (LPS) と、活性化させるキスペプチン製剤 (kisspeptin-10) をそれぞれ 1 mg/kg および 35 nmol/匹の用量で腹腔内投与し蛍光輝度の変化を観測した結果、LPS 投与群は対照群と同様に一定の値で推移していたが、kisspeptin-10 を投与した個体では輝度の緩やかな上昇傾向が見られた。

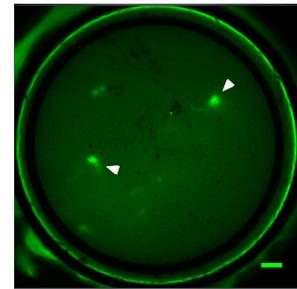


図3. 麻酔下のGnRH-GFPラットにおける深部脳観察像
矢頭で示す蛍光がGnRHニューロン由来と考えられる。scale bar = 500 μ m

実験3 受精卵へのゲノム編集処置後産まれた仔の中で、exon2 のスプライスアクセプター領域の欠損 (Δ SA) を含む数種の変異を mPGES-1 遺伝子内にもつ個体 (F0) を得た。その後 F0 と野生型ラットとの交配で得られた個体の中から上記 Δ SA を有する個体 (F1) を選別した。このラットに LPS を投与して 3 時間後の脳内での RNA 発現を reverse transcription PCR と電気泳動で確認したところ、野生型のものに比べて exon2 の全長分短くなったと予想される長さの、分子量の小さな cDNA が確認された。現在この F1 世代の雌雄を交配して系統化を行なっている。今後この動物を用いて GnRH/LH のサージ状およびパルス状分泌の制御機構における PGE₂ の役割について検討する予定である。また、実験2 で用いた GnRH-GFP ラットに代えて、神経興奮の状態をカルシウム濃度依存的に蛍光観察可能な GCaMP を GnRH ニューロン特異的に発現するラットの作製を進めている。本実験で成功した CRISPR/Cas 法および GONAD 法を用いる予定である。

本研究により、COX-1 ならびに COX-2 が GnRH/LH サージ前に発現抑制されていることが明らかになった。そのうち COX-2 の発現抑制は、濃度が上昇した血中エストロゲンが関与している可能性が示された。また実験2 では、ラットの GnRH 神経細胞活動を生体内で観察することに成功した。LPS による GnRH プロモーター活性抑制は蛍光輝度に大きな変化を生じなかったが、これは GFP が 24 時間以上の半減期を持つことが原因であると考えられる。今後は半減期が短く神経興奮状態をより鋭敏に反映できる Ca 濃度応答性蛍光蛋白質を用いることで、より詳細な輝度変化の観測を目指す。本実験系が、PGs が GnRH ニューロンに及ぼす影響の解明を始めとして、様々な神経細胞活動の解析に広く活用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuwaki Takashi, Shionoya Kiseko, Ihnatko Robert, Eskilsson Anna, Kakuta Shigeru, Dufour Sylvie, Schwaninger Markus, Waisman Ari, Müller Werner, Pinteaux Emmanuel, Engblom David, Blomqvist Anders	4. 巻 66
2. 論文標題 Involvement of interleukin-1 type 1 receptors in lipopolysaccharide-induced sickness responses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 165 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2017.06.013	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 該当する
1. 著者名 Eskilsson Anna*, Matsuwaki Takashi*, Shionoya Kiseko*, Mirrasekhian Elahe, Zajdel Joanna, Schwaninger Markus, Engblom David, Blomqvist Anders (*, equal contribution)	4. 巻 37
2. 論文標題 Immune-Induced Fever Is Dependent on Local But Not Generalized Prostaglandin E2 Synthesis in the Brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5035 ~ 5044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.3846-16.2017	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 該当する
1. 著者名 Matsuwaki Takashi (corresponding), Komatsuda Mugiko, Fujisawa Ayano, Doke Mio, Yamanouchi Keitaro, Nishihara Masugi	4. 巻 29
2. 論文標題 Molecular species of prostaglandins involved in modulating luteinising hormone pulses of female rats under infectious stress conditions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12490	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 -
1. 著者名 Kuroda Machi, Matsuwaki Takashi (corresponding), Tanaka Yoshinori, Yamanouchi Keitaro, Nishihara Masugi	4. 巻 31
2. 論文標題 Convulsive responses to seizure-inducible drugs are exacerbated in progranulin-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 478 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001425	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Matsuwaki T, Shionoya K, Ihnatko R, Eskilsson A, Kakuta S, Dufour S, Schwaninger M, Waisman A, Muller W, Pinteaux E, Engblom D, Blomqvist A.
2. 発表標題 The role of the IL-1 receptor in the centrally-elicited sickness response to lipopolysaccharide
3. 学会等名 International Cytokine & Interferon Society 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuroda M, Oshima T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Chang FC, Nishihara M
2. 発表標題 IL-1-signalling is involved in astrogliosis in pentylenetetrazol-induced epilepsy
3. 学会等名 The 8th Joint Symposium of Veterinary research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsuwaki T, Shionoya K, Ihnatko R, Eskilsson A, Kakuta S, Dufour S, Schwaninger M, Waisman A, Muller W, Pinteaux E, Engblom D, Blomqvist A
2. 発表標題 Involvement of interleukin-1 receptors in sickness responses to lipopolysaccharide
3. 学会等名 The 11th FENS(Federation of European Neuroscience Society) Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田万智、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 神経細胞の興奮性調節に対するプログラニューリン及びIL-1の関与
3. 学会等名 第3回プログラニューリン研究会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山藤あかり、角田 茂、松脇貴志、大塚正人、久和 茂
2. 発表標題 i-GONAD法を用いた簡便な遺伝子欠損マウスおよびラット作出の試み
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 2.Akari Sando, Shigeru Kakuta, Takashi Matsuwaki, Yu-Wei Chang, Tetsuhiro Ogawa, Masato Ohtsuka, Shigeru Kyuwa
2. 発表標題 Generation of gene-modified mice and rats by i-GONAD method
3. 学会等名 1st ToBeST symposium, Seoul (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担者	角田 茂 (Kakuta Shigeru) (80345032)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	