

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15961

研究課題名（和文）哺乳類の生殖を制御するGnRHの分泌リズム形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of secretory rhythm generation of GnRH that regulates mammalian reproduction.

研究代表者

村田 健（Murata, Ken）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：30749643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の生殖内分泌系はGnRHの分泌リズムによって制御され、そのリズムは、視床下部弓状核キスペプチン神経が司ると考えられる。そこで、神経回路に基づくパルス発生/変調のメカニズムを探索するため、単シナプス逆行性トレーシングと脳の透明化手法を用いて、キスペプチン神経への入力を網羅的に調べた。その結果、主に視床下部から、さらに、前脳および脳幹全体の多くの神経核から入力を受けていることがわかり、わずかながら雌雄差も認められた。これらの結果は、今後、GnRHのパルス形成や制御のメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の生殖を制御するGnRHの分泌メカニズムは、生殖生物学における重要な課題である。近年、その分泌リズムを制御する視床下部弓状核キスペプチン神経が見つかり、この神経を活性化、抑制するペプチドなども見つかってきたが、神経回路レベルでの理解は進んでいない。この神経への入力を網羅的に調べた本研究はその足がかりとなると考えられる。また、この理解が進むことにより、不妊治療や生殖制御技術の開発にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The mammalian reproductive endocrine system is regulated by the secretory rhythm of GnRH, which is thought to be regulated by kisspeptin neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. To investigate the mechanism of pulse generation/modulation based on neural circuits, we comprehensively investigated the input to the kisspeptin neurons using mono-trans-synaptic retrograde tracing and brain transparency techniques. We found that input was received primarily from the hypothalamus, but also from a number of neuronal nuclei throughout the forebrain and brainstem, with some slight sexual dimorphism. These results will contribute to the future elucidation of the mechanisms of GnRH pulse generation and regulation.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：GnRH キスペプチン 生殖制御 神経トレーシング

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖は【視床下部(性腺刺激ホルモン放出ホルモン: GnRH) 下垂体(黄体形成ホルモン: LH) 性腺】の軸により制御される。GnRH/LH の分泌様式には、性周期により1時間から数時間の頻度で変動するパルス状分泌と排卵を誘起する長時間持続するサージ状分泌がある。それぞれを制御する神経群を、GnRH パルスジェネレーター、GnRH サージジェネレーターと呼ぶ。これらの実体はごく最近明らかになりつつあり、GnRH の分泌を強力に促進する神経ペプチド、キスペプチン(*Kiss1* 遺伝子にコードされる)を産生する視床下部弓状核(ARC)、前腹側脳室周囲核(AVPV)のキスペプチン神経群が、それぞれパルスジェネレーター、サージジェネレーターの有力な候補である。GnRH 神経の細胞体は内側中隔、視索前野に散在し、正中隆起へと軸索を伸ばしており、ARC キスペプチン神経が GnRH 神経の軸索末端からの GnRH のパルス状放出を制御し、AVPV のキスペプチン神経が GnRH 神経の細胞体や樹状突起に作用して GnRH のサージ状放出を惹起するのだと考えられている。この仮説を確かめるためには、GnRH 神経とキスペプチン神経の *in vivo* における同時記録が望ましい。

急性スライス標本のキスペプチン神経は自発的にパルス状、サージ状リズムの神経活動を示さないことから、離れた脳領域の神経群との接続がリズムの形成に必要であると考えられるが、この回路についてはほぼ未解明である。

2. 研究の目的

GnRH パルスジェネレーター/サージジェネレーターの実態が、それぞれ ARC、AVPV キスペプチン神経群であるかを調べるため、GnRH 神経の軸索末端、ARC および AVPV キスペプチン神経群の *in vivo* Ca^{2+} イメージングにより、それぞれの活動を同時記録し、各神経群が GnRH 分泌のパルス状分泌、サージ状分泌を制御するかどうかを検証する。

パルス/サージ状の神経活動はどのような神経回路機構によって形成されるのかを調べるため、ARC および AVPV キスペプチン神経のシナプス前神経を同定する。その上で、シナプス前後の神経群の同時イメージングと薬理遺伝学的手法によるシナプス前神経の操作により、パルス、およびサージリズムを形成するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

Kiss1-Cre、*GnRH-Cre* マウスと Cre 依存的にカルシウムセンサータンパク質の GCaMP を発現する AAV を用いて、各種神経に GCaMP の発現を試みた。しかし、AVPV キスペプチン神経群に対しては、AAV のセロタイプの問題か、特異的かつ効率的に GCaMP を発現させることができなかった。また、GnRH 神経の細胞体は非常にスパースに分布していることから、正中隆起から逆行性の AAV で感染させることを試みたが、うまくいかなかった。種々の AAV セロタイプを所属ラボで作製、精製する系を立ち上げたが、本研究の期間中には成果に結びつかなかった。その代わりに、ARC キスペプチン神経群への入力を精査することに注力した。

近年開発が進んでいる、脳の透明化技術 CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis) と逆行性の狂犬病ウイルスを用いたトランスシナプス標識を組み合わせることで、ARC キスペプチン神経への入力を、全脳で網羅的に調べ、雌雄での比較も行った。

4. 研究成果

Kiss1-Cre マウスにおいて Cre 依存的に狂犬病ウイルスでトランスシナプス標識し、CUBIC 試薬で脳を透明化し、CUBIC パイプラインで解析を行った。その結果、ARC キスペプチン神経への入力神経は、主に視床下部(内側視索前野、視床下部前核、室傍核、背内側核、腹内側核)に認められた。それに加えて、外側中隔、分界条床核、視床室傍核、海馬台、中脳網様核、水道周囲灰白質、傍小脳脚核などの前脳および脳幹全体の多くの神経核にも入力細胞が認められた。このことは、哺乳類の生殖が、多様な制御を受けていることを示している。また、特筆すべきは、1つの領域あたり数十個という極めてまばらな細胞集団が再現性よく同定され、これらの疎な集団は、過去の文献では報告されていなかった。切片ベースの解析方法では、このような集団は見落とされることが多いと考えられ、透明化技術を用いた強みが表れている。今後は、同定された種々の脳領域が ARC キスペプチン神経をどのように制御するかを調べることで、これまで知られていなかった生殖制御機構が明らかになると考えられる。

また、雌雄において、外側中隔、内側視索前野、前腹側脳室周囲核からの入力細胞数にわずかながら差が認められた。雌には性周期がある一方で、雄にはないことから、入力細胞にも大きな違いがあると想定していたため、意外な結果であった。性周期ごとに変化するパルスの頻度は、入力神経よりも、ARC キスペプチン神経自身が発現する、性ホルモン受容体による制御の方が強く影響する可能性が考えられる。あるいは、狂犬病ウイルスを用いた方法では、シナプスの強度までは反映されず、顕著な雌雄差が検出されなかった可能性も考えられる。

次に、ARC キスペプチン神経への入力する神経の細胞種の解析を、特に入力細胞が多く認め

られた室傍核で行った。アルギニンバソプレシン (AVP)、オキシトシン、ダイノルフィン、コルチコトロピン放出ホルモンをコードする遺伝子の発現を *in situ* hybridization により可視化し、これとトランスシナプス標識とを組み合わせることで、入力神経の細胞種を調べた。その結果、入力神経は主に AVP を発現する神経であることが明らかになった。今後は、室傍核の AVP 発現神経が、ARC キスペプチン神経のパルス形成に寄与するかを検証していく。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Fu O, Iwai Y, Narukawa M, Ishikawa AW, Ishii KK, Murata K, Yoshimura Y, Touhara K, Misaka T, Minokoshi Y, Nakajima KI.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypothalamic Neuronal Circuits Regulating Hunger-Induced Taste Modification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-12478-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Horio N, Murata K, Yoshikawa K, Yoshihara Y, Touhara K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Contribution of Individual Olfactory Receptors to Odor-Induced Attractive or Aversive Behavior in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-07940-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村田健
2. 発表標題 雄マウスプライマーフェロモンの探索
3. 学会等名 Chemosensation and Behavior Workshop 2020
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken Murata, Sayoko Ihara, Kazunari Miyamichi, Kazushige Touhara
2. 発表標題 Analysis of primer pheromone in mice: ligand to the central action
3. 学会等名 The 48th Naito Conference（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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------