

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16270

研究課題名(和文) レプチンシグナルによる性成熟開始の神経回路基盤

研究課題名(英文) Neural circuit basis for the onset of puberty by leptin signaling

研究代表者

後藤 哲平 (Goto, Teppei)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：20772049

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)：体の成長にともなって性成熟を迎える。モデル動物のマウス性成熟期における制限給餌は性成熟不全を誘発する。制限給餌を解除して自由摂食とすると急激に体重が増加し、それに伴って性成熟が到来した。生殖中枢キスペプチンニューロンから生体内カルシウムイメージングによって、自由摂食が生殖中枢の活動を亢進することがわかった。制限給餌中にレプチンを代償投与したが、性成熟を誘導するには至らなかった。以上、性成熟時における十分量の食事は生殖中枢の活動を亢進させるが、その責任因子の実体については依然として研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

10代女性のアスリートや極端な食事制限等による急激な体重減少を原因とした思春期の女性における無月経が社会的問題となっている。本研究で確立した制限給餌による性成熟不全モデルはこの思春期女性の無月経を模していると考えられる。性成熟期の制限給餌が脳内キスペプチンニューロン活動を抑制するという知見は、思春期女性の無月経の発生機序の理解に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The onset of puberty occurs as the body grows. Feeding restriction during the peripubertal period in mice induces failure of puberty onset. When the mice were given free access to food from feeding restriction, body weight increased rapidly, and the mice reached puberty. In vivo calcium imaging from kisspeptin neurons, reproductive center revealed that ad libitum feeding increased the activity of kisspeptin neurons. Supplementation of leptin during feeding restriction had no effect on puberty onset. Thus, a sufficient diet during the peripubertal period enhances the neural activity of kisspeptin neurons. However, the responsible substances for the onset of puberty still need to be studied.

研究分野：神経内分泌

キーワード：性成熟 キスペプチン 制限給餌

1. 研究開始当初の背景

社会的に 10 代女性のアスリートや極端な食事制限等による急激な体重減少を原因とした思春期女性における無月経が社会的問題となっている。哺乳類メス個体の生殖は妊娠・出産・授乳に伴う多大なコストを要する。このため、良好な栄養状態に到達した個体のみが性成熟を迎え、生殖機能を維持できる。良好な栄養状態は主に脂肪細胞から分泌されるレプチンに読み替えられ、そのレプチンが視床下部の生殖中枢を駆動し性成熟に至ると考えられている。実際、レプチンが遺伝的に機能不全のヒト・マウスは性成熟に至らずに不妊だが、レプチンの代償投与によって性成熟に達し妊孕性を獲得する。脳特異的なレプチン受容体ノックアウトマウスも性成熟に至らずに不妊となることから、レプチンは脳内で受容され、性成熟を誘引すると考えられる。

性成熟後の生殖機能は視床下部のキスペプチンニューロンから分泌されるキスペプチンを頂点とする内分泌システムによって制御される。キスペプチンが遺伝的に機能不全のヒト・マウスは性成熟に至らずに不妊となる。しかし、キスペプチンニューロンにレプチン受容体はほとんど発現しておらず、これらのニューロン特異的にレプチン受容体を欠損させても性成熟に影響は出ない。

しかし、性成熟時において、レプチンが脳内のどの領域で受容され、どのような神経回路が駆動され、最終的に生殖中枢キスペプチンニューロンを活性化するのが、については不明であった。

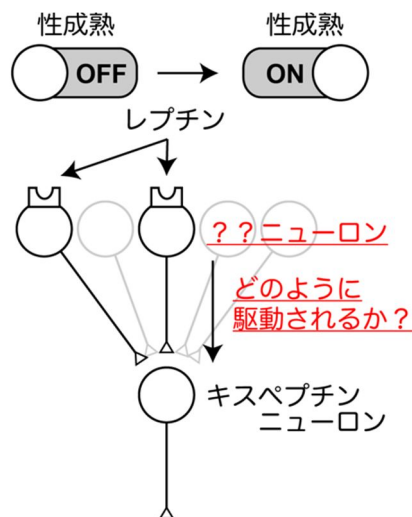


図1. 性成熟開始スイッチとしてのレプチン。レプチン受容ニューロンの正体とキスペプチンニューロンを駆動するメカニズムが未解明の課題である。

2. 研究の目的

モデル動物としてメスマウスを用いて性成熟開始時のレプチン受容ニューロンの同定と生殖中枢キスペプチンニューロンに至る神経回路の同定および性成熟開始時の生殖中枢キスペプチンニューロンの活動動態の解明を目的とする (図1)。

3. 研究の方法

ラットでの先行研究をもとに、野生型マウスの性成熟期に制限給餌を行い、「性成熟不全モデル」を確立する。さらに、制限給餌中にレプチンを代償投与することで人為的に性成熟が誘導可能ないわゆる「性成熟誘導モデルマウス」を確立する。キスペプチンニューロンに Cre 組換え酵素を発現する Kiss1-Cre マウス性成熟期にアデノ随伴ウイルスを用いて Cre 依存的に Ca インドキケター-GCaMP を発現させ、そののちに制限給餌を行って性成熟不全・誘導モデルとする。これらの性成熟不全・誘導モデルマウスの生殖中枢キスペプチンニューロンから生体内 Ca^{2+} イメージングを実施する。さらに同様に Kiss1-Cre マウスを性成熟不全・誘導モデルの生殖中枢キスペプチンニューロンを起点とした逆行性トランスシナプス標識を行い、レプチン受容ニューロンの同定と生殖中枢キスペプチンニューロンに至る神経回路の同定を試みる。

4. 研究成果

性成熟期に制限給餌を行うことで、体重増加が抑えられ、性成熟の指標の一つである初回発情に至らなかったことから、制限給餌による「性成熟不全モデル」を確立できた。一方、制限給餌中に未梢からレプチンを代償投与しても人為的に性成熟を誘導することができなかった。そこで、制限給餌を解除して自由摂食に戻したところ、数日で性成熟が誘導することに成功し、これを代替の「性成熟誘導モデル」とした (図2)。Cre/loxP システムを用いて生殖中枢キスペプチンニューロン特異的に Cre を発現する Kiss1-Cre マウスに対してアデノ随伴ウイルスを用いて Cre 依存的に Ca インドキケター-GCaMP を発現させた。このマウスに測定用の光ファイバーを留置し、この光ファイバー経由で生体内キスペプチンニューロンの Ca^{2+} イメージングの実験系を確立した。これらの結果を踏まえ、性成熟期の Kiss1-Cre マウスに対してアデノ随伴ウイルスを用いて Cre 依存的に Ca^{2+} インドキケター-GCaMP を発現させ、その後、制限給餌を行った性成熟不全・誘導モデルに対して生体内 Ca^{2+} イメージング実施した。制限給餌下ではキスペプチンニューロンの活動が抑制されている様子が観察された。一方、制限給餌を解除して自由摂食に戻すと

キスペプチンニューロンの活動亢進が見られた。よって、性成熟時における十分量の食事は生殖中枢の活動を亢進させることが分かった。一方、制限給餌による性成熟不全モデルマウスに対するレプチンの代償投与によって性成熟を誘起することができなかったことから、性成熟を促進させる責任因子の実体については依然として研究が必要である。

なお、当初計画していた生殖中枢キスペプチンニューロンを起点とした逆行性トランスシナプス標識は研究期間中に開始し、標識ニューロンを得ることに成功している。しかし、新型コロナウイルス感染症にかかる緊急事態宣言により、Kiss1-Cre マウスのコロニー縮小などにより、当初計画していた性成熟不全・誘導モデルの定量的な比較まで至らなかった。

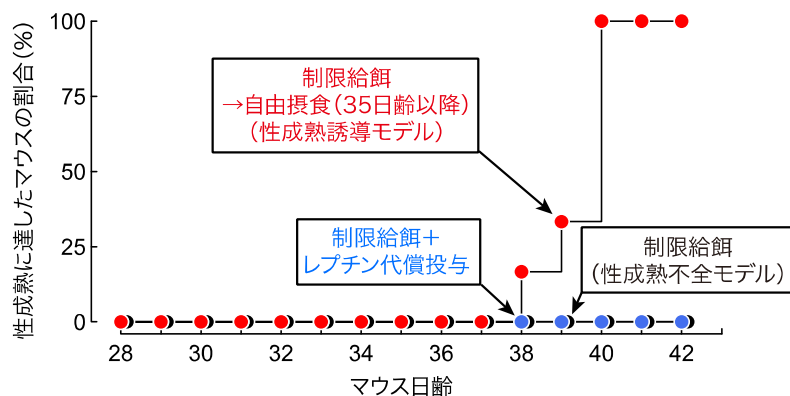


図2. 制限給餌による栄養不足で性成熟に達しない。レプチン代償投与では性成熟不全を解消できず、自由摂食に切り替えると性成熟が到来する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Toshihiro, Goto Teppei, Oikawa Mami, Sanbo Makoto, Yoshida Fumika, Terada Reiko, Niizeki Naoko, Kajitani Naoyo, Kazuki Kanako, Kazuki Yasuhiro, Hochi Shinichi, Nakauchi Hiromitsu, Surani M. Azim, Hirabayashi Masumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Blastocyst complementation using Prdm14-deficient rats enables efficient germline transmission and generation of functional mouse spermatids in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-21557-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 Nagae Mayuko, Uenoyama Yoshihisa, Okamoto Saki, Tsuchida Hitomi, Ikegami Kana, Goto Teppei, Majarune Sutisa, Nakamura Sho, Sanbo Makoto, Hirabayashi Masumi, Kobayashi Kenta, Inoue Naoko, Tsukamura Hiroko	4. 巻 118
2. 論文標題 Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2009156118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2009156118	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 Goto Teppei, Hirabayashi Masumi, Watanabe Youki, Sanbo Makoto, Tomita Koichi, Inoue Naoko, Tsukamura Hiroko, Uenoyama Yoshihisa	4. 巻 161
2. 論文標題 Testosterone Supplementation Rescues Spermatogenesis and In Vitro Fertilizing Ability of Sperm in Kiss1 Knockout Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqaa092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endocr/bqaa092	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 IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, NAKAMURA Sho, WATANABE Youki, SUGIMOTO Arisa, MAJARUNE Sutisa, HORIHATA Kei, NAGAE Mayuko, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, INOUE Naoko, MAEDA Kei-ichiro, TSUKAMURA Hiroko, UENOYAMA Yoshihisa	4. 巻 66
2. 論文標題 Conditional kisspeptin neuron-specific <i>Kiss1</i> knockout with newly generated <i>Kiss1</i> -floxed and <i>Kiss1</i> -Cre mice replicates a hypogonadal phenotype of global <i>Kiss1</i> knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-026	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 -

1. 著者名 MINABE Shiori, NAKAMURA Sho, FUKUSHIMA Eri, SATO Marimo, IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, INOUE Naoko, UENOYAMA Yoshihisa, TSUKAMURA Hiroko, MAEDA Kei-ichiro, MATSUDA Fuko	4. 巻 66
2. 論文標題 Inducible <i>Kiss1</i> knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 369 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-164	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------