

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500298

研究課題名（和文） ミクログリアの新しい生理機能：GnRH ニューロン活動調節への生理的関与

研究課題名（英文） Novel physiological function of microglia: Possible involvement of microglia in the regulation of GnRH neural function

研究代表者

明間 立雄 (AKEMA TATSUO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：60128585

研究成果の概要（和文）：本研究では、中枢による生殖制御の要である GnRH ニューロンの機能をミクログリアがプロスタグランジンの合成を介して調節している可能性を検討した。その結果、GnRH ニューロン細胞体近傍ではミクログリアでのみ COX-1（プロスタグランジン合成に関わる酵素の1つ）が発現しており、プロスタグランジンは GnRH ニューロンの電気生理学的特性に性周期依存的に影響を与えることが示された。また、感染ストレスによる性腺刺激ホルモン分泌抑制にミクログリアが関わる可能性が示唆された。本研究によりミクログリアが生理的条件および感染ストレス条件において、GnRH ニューロンの機能を調節する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present studies were aimed to examine whether microglia may be involved in regulation of functions of GnRH neurons which govern reproductive functions. We revealed that cyclooxygenase (COX) -1 immunoreactivity in the vicinity of GnRH neurons was almost entirely localized in microglia in the preoptic area, and prostaglandin E₂, which is one of the products catalyzed by COX, modulated electrophysiological properties of GnRH neurons in an estrus cycle-dependent manner. We also found pretreatment of an inhibitor of microglial activation reversed suppression of gonadotropin secretion by inflammatory stress. These results suggest that microglia may be involved in regulation of GnRH neural function in both physiological and inflammatory conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：GnRH ニューロン、ミクログリア、シクロオキシゲナーゼ、プロスタグランジン、miniature EPSCs、LH サージ

する最近の研究により、グリア細胞の役割がニューロンの栄養作用・支持作用・食食作用にとどまらないことが明らかになりつつある。ミクログリアは、これまでの炎症や変性疾患により活性化され、炎症反応や変性・細胞死に関与すると考えられてきたが、最近では神経新生や空間学習などへの関与が示唆され、非病理的状態での機能が明らかにされつつある。

グリア細胞と GnRH ニューロンの相互作用に関しても活発に研究されているが、それらのほとんど全てはアストロサイトの役割に関するものであり、ミクログリアによる GnRH ニューロンの機能調節についての報告は殆ど無い。

申請者らは、ゴナドトロピン分泌調節の神経分泌機序について研究を重ねる過程で、プロスタグランジン合成の律速酵素シクロオキシゲナーゼ(COX)の非選択的阻害薬インドメタシンおよび COX-1 選択的阻害薬フルビプロフェンが、ラットの排卵性ゴナドトロピンサージ発現時に視床下部 GnRH 免疫陽性細胞数を減少させることを発見した。また、二重蛍光免疫染色法を用いて、GnRH ニューロン細胞体が多く存在する視床下部視索前野では COX-2 の発現は観察されず、COX-1 はミクログリアに限局して存在すること明らかにした。

これらの結果は、ミクログリアに局在する COX-1 により産生されるプロスタグランジンが、パラクライン的に GnRH ニューロンに作用し、その機能を調節する可能性を示唆するものである。これは従来知られていないミクログリアの新しい生理機能であり、その解明は脳のグリア研究発展に重要な意味があると考えられるに至った。

2. 研究の目的

上記の背景より、本研究では、*in vivo* および *in vitro* 実験で GnRH ニューロンの機能調節におけるミクログリアの関与とその機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) Wistar-Imamichi 系雌性ラットより視床下部視索前野(POA)の切片を作成し、COX-1 と GnRH・ミクログリアのマーカータンパク質である CD11b との三重蛍光免疫組織染色を行い、GnRH ニューロンと COX-1 陽性ミクログリアの組織学的関係を検討した。
- (2) 雌性ラット POA の切片を作成し、ミクログリアにおけるエストロゲン受容体 α および G タンパク質共役エストロゲン受容体 (GPER)、プロゲステロン受容体の発

現を、ミクログリアのマーカータンパク質との二重蛍光免疫組織染色法を用いて検討した。

- (3) 雌性ラット・マウス・モルモットの POA 切片を作成し、COX-1 とミクログリアのマーカータンパク質である Iba-1 の二重蛍光免疫染色を行い、POA における COX-1 発現細胞の同定とその種差について検討した。
- (4) GnRH ニューロンの株化細胞である GT1-7 細胞にプロスタグランジン(PG)E2 を処置し、リアルタイム PCR 法にて GnRH 遺伝子発現の変化を検討した。
- (5) GnRH-EGFP トランスジェニックラットより POA 切片を作成し、パッチクランプ法にて GnRH ニューロンより miniature EPSCs を記録し、PGE2 処置によるその変化を観察した。
- (6) ミクログリア活性化阻害薬であるミノサイクリンを前投与し、Lipopolysaccharide(LPS)投与による性ステロイド誘起黄体形成ホルモン(LH)分泌の抑制が回復するかを、経時的に採取した血清の LH 濃度を測定することで検討した。

4. 研究成果

(1) GnRH ニューロンとシクロオキシゲナーゼ(COX)-1 陽性ミクログリアの解剖学的関係の検討

申請者らは先行研究で、GnRH ニューロン細胞体が多く存在する POA では COX-1 はミクログリアのみで発現していることを明らかにした (J Neuroendocrinol, 2009)。本研究では、GnRH ニューロンと COX-1 陽性ミクログリアの解剖学的位置関係を更に明らかにするため、GnRH と COX-1、CD11b(ミクログリアのマーカータンパク質)の三重蛍光免疫染色を行い解析した。その結果、GnRH ニューロンに非常に近接して COX-1 陽性ミクログリアが存在することが明らかになった。COX-1 はニューロンやアストロサイトには存在しなかった。この結果は GnRH ニューロン近傍のミクログリアが COX-1 による PG 合成を介して GnRH ニューロンの調節に関与している可能性を示唆するものである。(第 89 回日本生理学会および Endocrine J, 2013 にて発表)

(2) POA ミクログリアにおける性ステロイドホルモン受容体発現の検討

性ステロイドホルモンがミクログリアを介して GnRH ニューロンの機能調節を行なっている可能性を検討するため、はエス

トログエン核受容体 α または G タンパク質共役型エストロゲン受容体・プロゲステロン核受容体とミクログリアのマーカータンパク質 (Iba-1 または CD11b) との二重蛍光免疫染色を行い、ミクログリアにおけるこれら卵巣ステロイド受容体の発現を解析した。その結果、POA のミクログリアにおいてこれら受容体の発現は観察されなかった。また、卵巣摘出ラットに性ステロイドを処置した群とセサミオイルを処置した群において、POA での COX-1 の細胞局在に大きな差異は観察されなかった。これらの結果より、ミクログリアによる GnRH ニューロン機能調節は性ステロイドホルモン非依存的である可能性が示唆された。(第 89 回日本生理学会および一部は Endocrine J, 2013 にて発表)

(3) POA におけるミクログリアでの COX-1 発現の種差の検討

COX-1 発現細胞種およびその GnRH ニューロンとの解剖学的関係について、動物種差を雌ラット、マウス、モルモットを用いて免疫組織化学的に検討した。POA の脳実質内ではラット、マウス、モルモットとも COX-1 はミクログリアでのみ発現し、ミクログリアの関与の普遍性が示唆された。モルモットでは血管内皮様細胞の一部でも COX-1 の発現が観察された。(第 34 回日本神経科学大会にて発表)

(4) GT1-7 細胞における PGE2 による GnRH 遺伝子発現の変化の検討

本研究は当初、成体マウス視床下部より単離したミクログリアを用いた実験を計画し、単離・培養の条件検討を重ねたが、純度の高いミクログリアを高生存率で得ることが困難であった。そこで、COX-1 陽性ミクログリアからの分泌が予想される PGE2 を GT1-7 細胞へ処置し、GnRH 遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて検討したが、PGE2 の処置による明確な GnRH 遺伝子発現の変化は観察されなかった。

(5) PGE2 処置による視索前野 GnRH ニューロンの電気生理学的特性の変化の検討

上記組織学的な研究結果は、ミクログリアの COX-1 を介して作られた産物がパラクライン的に GnRH ニューロン細胞体に作用していることを示唆するものである。そこで、COX-1 の代謝産物の 1 つである PGE2 が GnRH ニューロンの電気生理学的特性に実際に影響をあたえるのかを、GnRH-EGFP トランスジェニックラットより作成した視索前野のスライスを用いて検討した。その結果、①PGE2 処理は GnRH ニューロンの miniature EPSC の

振幅には影響を与えない、②発情休止期のラット由来 GnRH ニューロンでは PGE2 処理により miniature EPSC の頻度は減少する、③発情前期ラット由来 GnRH ニューロンでは PGE2 処理により miniature EPSC の頻度が有意に上昇する、④この miniature EPSC は CNQX(AMPA/カイニン酸受容体拮抗薬)によりほぼ喪失すること、を見出した。これらの結果により、PGE2 が GnRH ニューロンへのグルタミン酸を介した神経伝達を修飾する可能性があること、およびその修飾作用は性周期によって異なることが示唆された。(第 90 回日本生理学会にて発表)

(6) 感染ストレスによる LH 分泌抑制へのミクログリアの関与の検討

LPS 投与による LH 分泌抑制にミクログリアの活性化が関与するのかをミノサイクリンを用いて検討した。その結果、ミノサイクリンの前投与により低濃度 LPS 投与による LH サージ状分泌抑制は減弱したが、高濃度 LPS による抑制は維持されることが示された。また、ミノサイクリンの前投与は LPS による血中サイトカインの上昇に影響しないことが示された。これら結果より感染ストレスによる LH 分泌抑制の一部にミクログリアが関与する可能性が示唆された(第 90 回日本生理学会にて発表、論文投稿準備中)。

GnRH ニューロン機能のアストログリアによる修飾は広く研究されているが、脳内の細胞の 15% を占める細胞集団であるミクログリアによる修飾については殆ど報告がなかった。本申請課題により、ミクログリアが生理的条件および感染ストレス条件において、GnRH ニューロンの機能を調節する可能性が示唆された。

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 2 件)

1. Fujioka H, Kakehashi C, Funabashi T, Akema T.

Immunohistochemical evidence for the relationship between microglia and GnRH neurons in the preoptic area of ovariectomized rats with and without steroid replacement. Endocrine Journal, 2013, 60: 191-196, doi: 10.1507/endocrj.EJ12-0280, 査読有

2. Fujioka H, Akema T.
Lipopolysaccharide acutely inhibits proliferation of neural precursor cells in the dentate gyrus in adult rats. *Brain Research* 2010; 1352: 35-42, doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.032, 査読有
3. Furuta M, Fukushima A, Chiba S, Sano A, Akema T, Kimura F, Funabashi T.
Progesterone receptor immunoreactivity in the brains of ovariectomized aged rats. *Neuroreport* 2010; 21: 777-81, doi: 10.1097/WNR.0b013e32833c5b6f, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 藤岡仁美、船橋利也、明間立雄
GnRH ニューロンの制御におけるミクログリアの関与(Possible involvement of microglia in regulation of GnRH neural functions)、第 90 回日本生理学会大会 (学会連携シンポジウム) (東京)、2013 年 3 月
2. 藤岡仁美、掛橋千彰、船橋利也、明間立雄
雌ラット GnRH ニューロン周囲のシクロオキシゲナーゼ-1 の細胞局在と性ステロイドの影響(Cellular localization of cyclooxygenase-1 and ovarian steroid effects on its expression in the vicinity of gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic area of female rats)、第 89 回日本生理学会大会 (松本)、2012 年 3 月
3. 藤岡仁美、掛橋千彰、明間立雄
雌ラット・マウス・モルモットの視索前野におけるシクロオキシゲナーゼ-1 の分布と細胞局在の検討(Distribution and cellular localization of cyclooxygenase-1 in the preoptic area of normal female rats, mice and guinea pigs)、第 34 回日本神経科学大会 (横浜)、2011 年 9 月
4. 藤岡仁美、掛橋千彰、明間立雄
雌ラット・マウス・モルモットの視索前野におけるシクロオキシゲナーゼ-1 の細胞局在と GnRH ニューロンとの解剖学的関係(Cellular localization of cyclooxygenase-1 and its anatomical relationship to

gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic area of normal female rats, mice and guinea pigs)、第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会全国学術集会 合同大会 (東日本大震災により誌上開催)、2011 年 3 月

5. 藤岡仁美、明間立雄
成体ラット海馬歯状回における神経新生に対する細菌性内毒素の急性効果 (Proliferation of neural precursor cells in the dentate gyrus is acutely inhibited by lipopolysaccharide in adult rats.)、第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会および第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会 (神戸)、2010 年 9 月

[図書] (計 1 件)

1. Fujioka H, Funabashi T, Akema T.
Morphological evidence for involvement of microglia in the regulation of GnRH neurons. In: Sills ES (ed), *Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH): Production, Structure and Function*. Nova Scientific Press, Inc (New York), 2013. (in press)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
<http://www.marianna-u.ac.jp/physiology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

明間 立雄 (AKEMA TATSUO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：60128585

(2)研究分担者

藤岡 仁美 (FUJIOKA HITOMI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：50410064

掛橋 千彰 (KAKEHASHI CHIAKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術

員

研究者番号：80535683

(3)連携研究者

なし