

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780285

研究課題名（和文） パルス状 GnRH 分泌を制御する弓状核キスペプチンニューロン神経活動制御機構の解明

研究課題名（英文） Research for a mechanism for generation of GnRH pulse regulated by neural activity of kisspeptin neurons in the arcuate nucleus

研究代表者

若林 嘉浩 (WAKABAYASHI YOSHIHIRO)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・主任研究員

研究者番号：00510695

研究成果の概要（和文）：弓状核キスペプチンニューロン神経系は、GnRH/LH のパルス状分泌を制御すると考えられ、このニューロン群の同期発火がパルス状分泌のトリガーであると推察されるが、その同期発火機構は不明である。本研究では、形態学および電気生理学的手法を用いて研究を行い、1) 弓状核キスペプチンニューロン群が互いに神経線維によるネットワークを形成していること、また、2) 左右両側に存在する弓状核キスペプチンニューロン群の活動が同期して起こっていることを明らかにした。これらの結果から、弓状核キスペプチンニューロンは、互いに神経ネットワークを形成しており、このネットワークを用いて多数のニューロンの神経活動が同期している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus (ARC) might regulate pulsatile secretion of GnRH/LH. Neural activity of the majority of these neurons might burst simultaneously, however a mechanism for this phenomenon still remains unclear. In this study, we addressed how mechanism controls the simultaneous burst of majority of the ARC kisspeptin neurons. The ARC kisspeptin neurons have neural network each other by their fibers in the contralateral as well as ipsilateral side. And recording of neural activity revealed that neural activity of ARC kisspeptin neurons from both side were synchronized. These results suggest that synchronized neural activity of majority of ARC kisspeptin neurons might be controlled by neural network using their fibers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：キスペプチン、弓状核、

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の繁殖機能制御は、視床下部-下垂体-性腺軸によって制御され、その最上位中枢は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンと考えられてきた。GnRH/黄体形成ホルモン (LH) 分泌には、排卵を誘起するサージ状分泌と、卵胞発育に必要なパルス状分泌の2種類の分泌形態が存在し、後者は、GnRH パルスジェネレーターという神経機

構によって制御されると考えられている。性腺ステロイドホルモンや栄養状態、日長条件やフェロモンなど、様々な内的・外的要因は、GnRH パルスジェネレーターに作用し、個体の繁殖機能に多大な影響を及ぼしているが、この神経機構の存在部位や、どのような神経系により構成されているのかは不明であった。近年、キスペプチンが発見され、弓状核に存在するキスペプチンニューロン神経系が、パ

ルス状 GnRH/LH 分泌に関与していると考えられている。研究代表者は、これまでに以下の研究を行ってきた。すなわち、シバヤギを用いて、弓状核キスペプチンニューロンが密集する部位の近傍に記録電極を留置し、その神経活動を多ニューロン発火活動 (Multiple-Unit Activity; MUA) として、覚醒下でリアルタイムに記録するシステムを確立した。この手法を用いて、弓状核キスペプチンニューロンの神経活動が、周期的に一過性の上昇 (MUA ボレー) を示すこと、また MUA ボレーは常にパルス状 LH 分泌と同期して起こることを明らかにした。これらの結果から、MUA ボレーは、パルス状 GnRH/LH 分泌を引き起こす神経活動を反映していると考えられた。MUA は、単一のニューロン由来の記録ではなく、複数のニューロンから記録された活動を示しているため、“ボレー”として記録される神経活動は、多数のニューロンが同時に発火している状態を反映している。しかし、どのような機構によって、複数のキスペプチンニューロンが同期発火活動を営んでいるのか、その制御機構は不明である。近年、多くの哺乳類の弓状核キスペプチンニューロンが Neurokinin B (NKB) という神経ペプチドを共発現することが明らかになった。また、NKB または NKB 受容体 (NK3R) をコードする遺伝子に変異を持つヒトでは、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を呈することなどが報告され、NKB は繁殖機能において重要な役割を担っていると考えられている。研究代表者は、ヤギを用いて、*NKB* と *NK3R* が弓状核キスペプチンニューロンに共発現すること、また、NKB の脳室内投与により、MUA ボレーが直ちに誘起される一方で、NK3R 阻害剤によって MUA ボレーが抑制されることを明らかにした。上記の研究成果より、先行して発火を開始した弓状核キスペプチンニューロンから分泌された NKB が、近傍に位置している複数のキスペプチンニューロンを次々と発火させることによって、多くのニューロンの同期発火を瞬時に誘起し、一過性神経活動上昇 (=MUA ボレー) が形成されるというモデルを提唱した (Wakabayashi et al, 2010 J. Neuroscience 30:3124-3132)。本研究では、このモデルをより詳細に解析することを目的とした。これらの研究により、パルス状 GnRH/LH 分泌の調節技術の開発など、応用につながる重要な知見を得られるものと考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究から、弓状核キスペプチンニューロンの周期的な同期発火活動が、GnRH/LH のパルス状分泌を引き起こす根源となる神経活動であることが示唆されている。弓状核キスペプチンニューロンは、脳の左右

両側に多数存在しており、一過性のパルス状 GnRH/LH 分泌を引き起こすためには、これら多数の弓状核キスペプチンニューロンが同期して発火する必要があると想定される。しかし、この同期発火活動が、どのようなメカニズムによって制御されているのかは不明である。本研究では、この同期活動を可能とする神経回路の存在を、形態学および電気生理学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

弓状核キスペプチンニューロンの神経回路を詳細に解析する目的で、卵巣除去シバヤギを用いて、順行性トレーサーである Biotin-dextran amine (BDA) を、脳定位固定装置を用いて片側の弓状核キスペプチンニューロン近傍に微量注入した。2 週間の回復期間を置いた後、灌流固定を行い、視床下部を含む脳部位を採材した。次に 50 μ m の凍結切片を作製し、組織化学染色によって BDA を可視化した。また、同一切片上で、抗キスペプチンあるいは抗 NKB 抗体を用いた免疫染色を行った。染色後、BDA によって標識された弓状核キスペプチンニューロン由来の線維の走行パターンと投射部位を解析した。

複数の弓状核キスペプチンニューロンが同期して発火していることを電気生理学的に検証する目的で、卵巣除去シバヤギを用いて、左右両側の弓状核キスペプチンニューロン局在部位の近傍に、複数の記録電極を留置する手術を行った。約 1 ヶ月の回復期間を置いた後、MUA 記録実験に用いた。まず、従来の MUA 記録方法を改変し、4 本の異なる電極から同時に MUA 記録が可能なシステムを確立した。このシステムを用いて、左右の異なる 4 本の記録電極から MUA が記録可能な個体を選別し、4 カ所の記録部位より周期的に起こる内因性の MUA ボレーが発生するタイミングを解析した。また、外部からの刺激 (雄効果フェロモンを含む雄被毛の呈示および NKB の末梢血中への投与) によって強制的に引き起こされる MUA ボレーについても同様に解析した。

4. 研究成果

片側の弓状核キスペプチンニューロン近傍に BDA を微量注入した組織切片を用いて、同一切片上で BDA とキスペプチン、あるいは NKB を多重染色することで、BDA 陽性キスペプチンニューロン由来の線維の走行パターンとその投射部位を詳細に検討することが出来た。弓状核キスペプチンニューロン由来の神経線維が、他のキスペプチンニューロンの細胞体近傍を通過する、あるいは接していることが明らかとなった。また、このような神経投射は、BDA を微量注入した同側の弓状

核内だけでなく、反対側の弓状核においても観察された。これらの線維上には、キスペプチンだけでなく、NKB も含まれていることが明らかとなった。また、一部のキスペプチン/NKB 含有 BDA 陽性線維は、正中隆起内を同側から反対側に向かって走行していた。これらの結果から、弓状核キスペプチンニューロンは、自身の線維によって互いに神経連絡をもっていると考えられた。また、左右両側の弓状核キスペプチンニューロン間にも神経連絡が存在することが明らかとなった。

次に、弓状核キスペプチンニューロン群が同期した神経活動を行っていることを、電気生理学的に検討するために、左右の弓状核に複数の記録電極を留置し、異なる 4 本の記録電極から、周期的に起こる内因性の MUA ボレーを同時に記録した。その結果、異なる記録電極由来の MUA ボレーは、全て同時に起こっていることが明らかとなった。左右に留置した電極由来の MUA ボレーにおいても、同時に起こっていることが明らかとなった。また、MUA ボレーは、雄効果フェロモンの呈示や NKB の投与などによって人為的に引き起こすことが可能であることが解っている。そこで、雄効果フェロモン(雄被毛)呈示あるいは NKB を投与した際に引き起こされる MAU ボレー発生タイミングについて、同様の解析を行った。その結果、内因性の MUA ボレーだけでなく、外部からの入力によって引き起こされた MUA ボレーでも、左右異なる部位において、同時に起こることが明らかとなった。これらの結果から、多数の弓状核キスペプチンニューロンは、互いに同期した発火活動を行っていることが示唆された。

以上の結果から、弓状核キスペプチンニューロンは互いに線維による神経回路を有しており、この神経回路を用いて NKB- NK3R シグナリングを介することによって、多数のキスペプチンニューロンが互いに同期して発火活動を行っていると考えられた。

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 4 件)

Wakabayashi Y., Yamamura T., Sakamoto K., Mori Y., Okamura H. (2013) Electrophysiological and morphological evidence for synchronized GnRH pulse generator activity among kisspeptin/neurokinin B/dynorphin A (KNDy) neurons in goats. J Reprod Dev. 59:40-48. 査読有

Sakamoto K., Murata K., Wakabayashi Y., Yayou K-I., Ohkura S., Takeuchi Y., Mori

Y., Okamura H. (2012) Central administration of Neurokinin B activates kisspeptin/NKB neurons in the arcuate nucleus and stimulates luteinizing hormone secretion in ewes during the non-breeding season. J. Reprod. Dev. 58:700-706. 査読有

Tanaka T., Ohkura S., Wakabayashi Y., Okamura H. (2012) Effect of peripherally administered kisspeptin-10 on GnRH neurosecretion into the hypophyseal portal circulation in ovariectomized goat does. Small Ruminant Res., 105:273-276. 査読有

Matsuyama S., Ohkura S., Mogi K., Wakabayashi Y., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K.-I., Ichikawa M., Okamura H. (2011) Morphological Evidence for Direct Interaction Between Kisspeptin and GnRH Neurons at the Median Eminence of the Male Goat: An Immunoelectron Microscopic Study. J. Neuroendocrinol., 94:323-332. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

Wakabayashi Y. A possible mechanism of generation of GnRH pulse. The 2nd congress on kisspeptin signaling in brain. 平成 24 年

Wakabayashi Y., Yamamura T., Ohkura S., Homma T., Sakamoto K., Mori Y., Okamura H. Senktide, a neurokinin B receptor agonist, stimulates pulsatile LH secretion through a mechanism mediated by the GnRH pulse generator in goats. 42th Society for Neuroscience Annual meeting 平成 24 年

若林嘉浩、山村崇、大蔵聡、本間玲実、坂本光平、森裕司、岡村裕昭. NKB は弓状核キスペプチン/NKB ニューロンに作用して GnRH パルスを産生させる 第 105 回 日本繁殖生物学会 平成 24 年

Ohkura S., Matsuyama S., Mogi K., Wakabayashi Y., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K., Ichikawa M., Okamura H. Male kisspeptin neuronal network and its interaction with GnRH neurons in goats. 2nd World congress on reproductive biology 平成 23 年

山村崇, 若林嘉浩, 大蔵聡, 本間玲実, 坂本光平, 森裕司, 岡村裕昭. Neurokinin B 受容体阻害剤が性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) パルス産生機構の活動におよぼす

影響 第104回 日本繁殖生物学会大会
平成23年

若林嘉浩, 山村崇, 本間玲実, 坂本光平,
森裕司, 前多敬一郎, 岡村裕昭. 左右両側
の弓状核キスペプチンニューロン群におけ
る同期した神経活動 第104回 日本繁殖
生物学会大会 平成23年

本間玲実, 若林嘉浩, 山村崇, 坂本光平,
大蔵聡, 森裕司, 岡村裕昭 雄ヤギ弓状核
におけるキスペプチン、ニューロキニンBお
よびダイノルフィンの発現 第104回 日
本繁殖生物学会大会 平成23年

Wakabayashi Y., Ohkura S., Sakamoto K.,
Murata K., Homma T., Mori Y., Maeda K-I.,
Okamura H. Effects of senktide, a
Neurokinin B receptor agonist, on neural
activity of arcuate kisspeptin neurons and
luteinizing hormone secretion in the goat.
40th Society for Neuroscience Annual
meeting 平成23年

[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

若林 嘉浩 (WAKABAYASHI YOSHIHIRO)

研究者番号：00510695

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：