

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870621

研究課題名(和文) 吸乳刺激によるキスペプチン制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of kisspeptin-regulating mechanism by suckling stimulus

研究代表者

山田 俊児 (Yamada, Shunji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40454079

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)：キスペプチンは性腺機能を制御する最上位の神経ペプチドで、性腺機能が抑制される授乳期の母ラットでは、その脳内における発現が乳仔からの吸乳刺激により顕著に抑制される。本研究では、吸乳刺激がどのようなメカニズムを介してキスペプチン発現を抑制するのか探索した。本研究により、授乳期では視床/脳幹部においてカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が増加すること、および視床のCGRP神経が吸乳刺激により活性化することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Kisspeptin is the head of neural peptide regulating reproductive functions, and the expression is remarkably suppressed by suckling stimulus from pups in lactating mother rats who are inhibited reproductive function. The present project was undertaken to investigate what kind of mechanism does suckling stimulus suppress kisspeptin expression through. The present study demonstrated that calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the thalamus and brainstem were increased during lactation and thalamic CGRP neurons were activated by suckling stimulus.

研究分野：神経内分泌

キーワード：キスペプチン 授乳期 吸乳刺激 生殖内分泌

1. 研究開始当初の背景

キスペプチンは、ヒトを含むほ乳類において、生殖機能を制御する神経ペプチドとして注目をあびている。申請者らのグループはキスペプチンが生殖機能を強力に促進する作用を有すること、さらには、ラットの脳においてキスペプチン神経は前腹側脳室周囲核と視床下部弓状核の2カ所に局在することを報告した (Kinoshita, Yamada et al. *Endocrinology* 2005, Adachi, Yamada et al. *Journal of Reproduction and Development* 2007)。ほ乳類の生殖機能は視床下部 - 下垂体 - 性腺軸と呼ばれる一連のメカニズムによって制御される。視床下部にある性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 神経からパルス状に分泌される GnRH は、下垂体からのゴナドトロピン (卵胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモン (LH)) を介して、性腺の活動を促す。GnRH は生殖機能を制御する「最上位のホルモン」として長い間君臨してきたが、キスペプチンは GnRH 分泌を制御するさらに上位のホルモンである。

授乳期に乳児 (仔) から母親が受ける吸乳刺激は、母親の性腺機能を抑制する因子の一つである。申請者らはパルス状 LH 分泌が抑制される授乳期の母ラットにおいて、乳児からの吸乳刺激により視床下部弓状核のキスペプチンとその遺伝子である Kiss1 の発現が低下すること (Yamada et al. *Endocrinology* 2007) および、授乳期のラットでもキスペプチンの脳室内投与により LH 分泌が亢進することを明らかにした (Yamada et al. *J. Neuroendocrinology* 2012)。このことは、授乳期の性腺機能低下に弓状核キスペプチン神経の抑制が関与することを示唆するとともに、キスペプチン神経を制御できれば、それに続く GnRH 分泌、ひいてはゴナドトロピン分泌も制御できる可能性を示唆する。しかしながら、吸乳刺激によるキスペプチン制御機序は分かっていない。

2. 研究の目的

授乳期に増加するプロラクチンやオキシトシンはキスペプチン神経の抑制にあまり関与しないという報告があるので、乳頭からの神経系による抑制が存在すると考えられる。そこで本研究は、1) 乳頭から弓状核キスペプチン神経に吸乳刺激を伝える神経経路と2) 吸乳刺激がキスペプチン神経に及ぼす影響を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 吸乳刺激を伝える神経経路

神経トレーサーを用いたオキシトシン分泌に関する研究より、乳頭からの吸乳刺激は脊髄から脳幹や視床を介して視床下部に伝達されると考えられる。そこで、視床や脳幹から生じる伝達物質が弓状核のキスペプチン神経の抑制に関与すると仮定し、授乳ラットの視床や脳幹における伝達物質の増減を

real-time RT-PCR 法を用いて網羅的に探索した。次に、発見した伝達物質の授乳ラットの脳内における局在やその投射を順行性および逆行性神経トレーサーを利用した免疫組織化学的手法を用いて解析し、弓状核キスペプチン神経とのつながりを調べた。

2) 吸乳刺激が弓状核キスペプチン神経に及ぼす影響

授乳期では吸乳刺激が何らかの神経伝達物質を介してキスペプチン神経に作用し Kiss1 mRNA の転写を抑制すると考えられる。授乳期に弓状核キスペプチン神経内で起こる転写制御のメカニズムを解明するために、授乳ラットの弓状核における転写抑制関連因子の発現量などを調べた。転写抑制関連因子としてキスペプチン分泌抑制に関与するプロダイノルフィンの発現量、転写因子である Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) や cAMP Response Element Binding protein (CREB) のリン酸化量、転写の抑制に関与するエピジェネティック因子の発現量を調べた。

4. 研究成果

1) 吸乳刺激を伝える神経経路

脳幹と視床を切り出し、授乳に関連する遺伝子の発現量を調べたところ、授乳ラットにおけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の発現量が非授乳ラットに比べ有意に多いことが明らかとなった。次に、授乳ラットにおける CGRP 神経の局在を免疫組織化学的手法で調べたところ、非授乳期と変わらぬ分布を示し、CGRP 神経細胞体は視床の脚周囲核 (PP) や腕傍核に多く見られ、CGRP 神経線維は視床下部腹内側核 (VMH) や尾状核-被殻 (CPu) に多く見られた。ARC にも少しではあるが CGRP 神経線維が確認できた。その発現量は授乳期と非授乳期で差は見られなかった。そこで、PP の CGRP 神経が吸乳刺激で活性化するか否かを、神経細胞活性化のマーカーである cFos タンパクを利用して CGRP との蛍光免疫二重染色で調べた。授乳期では PP における cFos 免疫陽性細胞数が有意に増加し、CGRP 神経における cFos 免疫陽性細胞数も有意に増加した。このことは、吸乳刺激により PP の CGRP 神経が活性化することを示唆する。PP からの神経投射を調べるために、PP に順行性トレーサーであるビオチンデキストラアミン (BDA) を投与した。BDA 線維は VMH や CPu に投射していた。CGRP 神経線維の局在と似ていたので、ARC、VMH と CPu に逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG) を投与し、PP における CGRP と FG の蛍光免疫二重染色を行った。ARC や VMH に FG を投与したラットでは PP において CGRP と FG の二重陽性細胞はほとんど見られなかったが、CPu に投与したラットでは多くの二重陽性細胞が見られた。以上のことから PP から CPu に投射する CGRP 神経が吸乳刺激で活性化することが明らかとなった。今後はこの神経がキ

スベプチン抑制に関与するの否かを解明する必要があると思われる。

2) 吸乳刺激が弓状核キスベプチン神経に及ぼす影響

弓状核のキスベプチン神経はダイノルフィンを共発現し、ダイノルフィンはキスベプチンの働きを抑制すると考えられている。そこで、授乳期のキスベプチン発現の抑制にダイノルフィンが作用している可能性を考え、授乳ラットのARCにおけるプロダイノルフィン(ダイノルフィンの遺伝子)発現量を in situ hybridization で調べたところ、授乳ラットでは非授乳ラットに比べ Kiss1 発現量が低下したが、プロダイノルフィン発現量に差は見られなかった。

そこで、授乳期では Kiss1 の転写を抑制するために転写因子のリン酸化が減少するのではと仮定し、ERK や CREB のリン酸化量をウエスタンブロット法で調べたが、授乳期と非授乳期に差は見られなかった。

吸乳刺激による Kiss1 遺伝子のプロモーター部位のメチル化やヒストン修飾といったエピジェネティック作用が転写抑制に関与する可能性を考え、エピジェネティックに関連する遺伝子(ヒストン脱アセチル化酵素、メチル CpG 結合タンパク、ポリコーム群タンパク質複合体)の発現量を real-time RT-PCR 法で調べたが、こちらも授乳期と非授乳期に顕著な差は見られなかった。神経刺激によるエピジェネティック制御は新しい知見であり、今後はエピジェネティック制御が Kiss1 遺伝子で起こっているか直接調べる必要があると思われる。

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3件)

Yamada S and Kawata M, Identification of neural cells activated by mating stimulus in the periaqueductal gray in female rats, *Frontiers in Neuroscience*, 査読有り, doi:10.3389/fnins.2014.00421, 2014
Takanami K, Sakamoto H, Matsuda KI, Satoh K, Tanida T, Yamada S, Inoue K, Oti T, Sakamoto T, Kawata M, Distribution of Gastrin-Releasing peptide in the rat trigeminal and spinal somatosensory systems. *Journal of Comparative Neurology*, 査読有り, 522, 1858-1873, 2014, doi:10.1002/cne.23506

Mostari MP, Ieda N, Deura C, Minabe S, Yamada S, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有り, 59, 266-272, 2013, doi:DN/JST.JSTAGE/jrd/2012-193 [pii]

[学会発表](計11件)

山田俊児, 畑幸一、石上真由子、笹倉康熙、小澤孝明、河田光博、授乳期における視床脚周囲核のカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)発現神経の解析、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015年3月21-23日、神戸国際会議場(神戸)

山田俊児, ロードーシスに関与する中脳中心灰白質の神経細胞の特性、第20回「性と生殖」公開シンポジウム、2014年12月20日、早稲田大学所沢キャンパス(所沢)

Shunji Yamada, Kouichi Hata, Yasuteru Sasakura, Mitsuhiro Kawata, Involvement of brain stem calcitonin gene-related peptide in suckling stimulus during lactation, 8th International Congress of Neuroendocrinology, August 17-20, 2014, Sydney (Australia)

山田俊児, 畑幸一、笹倉康熙、河田光博、授乳期の視床下部弓状核におけるプロダイノルフィン遺伝子発現、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27-29日、自治医科大学(宇都宮) 谷田任司, 松田賢一, 山田俊児, 高浪景子、河田光博、エストロゲン関連受容体 ERR によるエストロゲン応答性調節機構、119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27-29日、自治医科大学(宇都宮)

高浪景子, 坂本浩隆, 松田賢一, 佐藤慧太, 谷田任司, 山田俊児, 井上海平, 越智拓海, 坂本竜哉, 河田光博、ラット三叉神経節および脊髄後角神経節における gastrin-releasing peptide の発現と回路、19回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27-29日、自治医科大学(宇都宮)

山田俊児, 笹倉康熙、畑幸一、河田光博、吸乳刺激で活性化する脳幹の神経細胞とカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)神経の関係、第40回日本神経内分泌学会学術集会、2013年10月25-26日、宮崎市民プラザ(宮崎)

谷田任司, 松田賢一, 山田俊児, 高浪景子、河田光博、エストロゲン関連受容体 ERR はエストロゲン受容体 ER の可動性を減ずることでその転写活性を抑制する、第40回日本神経内分泌学会学術集会、2013年10月25-26日、宮崎市民プラザ(宮崎)

9 Shunji Yamada, Miku Ohoya, Kenichi Matsuda, Mitsuhiro Kawata, The role of androgen receptor during postnatal periods in masculinization of nervous system, The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, June

20-23, 2013, 京都国際会議場 (京都)
Takashi Tanida, Ken-ichi Matsuda,
Shunji Yamada, Keiko Takanami,
Mitsuhiro Kawata, The co-localization
of nuclear estrogen-related receptor
(ERR) and estrogen receptor (ER)
in the rat brain, The 36th Annual
Meeting of the Japan Neuroscience
Society, June 20-23, 2013, 京都国際
会議場 (京都)
Keiko Takanami, Hiroataka Sakamoto,
Ken-Ichi Matsuda, Keita Satoh, Kaihei
Inoue, Shunji Yamada, Takashi Tanida,
Takumi Oti, Tatsuya Sakamoto, and
Mitsuhiro Kawata, Distribution of
gastrin-releasing peptide in the
trigeminal sensory system, The 36th
Annual Meeting of the Japan
Neuroscience Society, June 20-23,
2013, 京都国際会議場 (京都)

〔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：
出願年月日：
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
山田 俊児 (YAMADA Shunji)
京都府立医科大学大学院 医学研究科
解剖学教室 生体構造科学部門・講師

研究者番号：40454079

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：