

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32666
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460316
研究課題名(和文)キスペプチンによる甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンを介した生殖生理調節を検証する

研究課題名(英文)Verifying the regulation of reproductive physiology by kisspeptin through thyroliberin.

研究代表者
澤井 信彦 (Sawai, Nobuhiko)
日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70307916
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳の視床下部にあるキスペプチンを産生するニューロンは、性周期リズムを作り出す中枢であることが近年明らかになっている。本研究では、母乳の産生を行うプロラクチンの分泌を制御するドーパミン産生ニューロンや、体温調節にも関わる甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRHと呼ばれる)産生ニューロンが、キスペプチンの作用を受ける可能性を示す脳内ネットワークの存在を証明した。このことは、キスペプチンが妊娠、出産、閉経などの生殖生理状態に応じて変化するプロラクチン分泌、体温調節などに、TRHを介して広く関わっている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Kisspeptin expressing neuron in the hypothalamus of the brain, is recently well known as a center of rhythm formation in sex hormone cycle. In the present study, we identified a neural network that may convey an effect of kisspeptin to prolactin regulating dopaminergic neuron or thyroliberin producing neuron, which is called TRH neuron, that also regulates body temperature. The finding suggests a possibility that kisspeptin affect via TRH, to the changes of prolactin secretion or body temperature that occur during pregnancy, delivery, or menopause.

研究分野：神経内分泌、神経解剖学

キーワード：kisspeptin neurokinin B prolactin thyroliberin sex hormone network receptor expression hypothalamus

1. 研究開始当初の背景

脳の視床下部ニューロンで産生されるキスペプチンは、性ホルモンの分泌リズムを形成することが近年、明らかになった。キスペプチン産生ニューロンは、女性ホルモンが結合するエストロゲン受容体を発現しており、一方で性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 産生ニューロンに軸索投射することで、性周期リズムを制御している。このことは、さらに様々な生殖生理の働く思春期発動や、妊娠、分娩、保育におけるキスペプチン産生ニューロンの動向に興味を抱かせるものであった。そこで研究代表者らは、母乳の産生を誘起するプロラクチンに着目し、プロラクチンの下垂体からの分泌を抑制している視床下部のドーパミン産生ニューロンへのキスペプチンの関与を示してきた。すなわち、キスペプチン産生ニューロンは、プロラクチン抑制性ドーパミン産生ニューロンに軸索投射することを二重免疫電顕などで形態学的に証明することに成功した。しかし、キスペプチン産生ニューロンは同じ視床下部内の他の領域へも軸索投射しているため、他にも生殖活動に関連したニューロンへ投射している可能性があった。当時、国際的な学会や原著論文等では、キスペプチン産生ニューロンが体温調節にも関与することを示唆することが報告された。これらの背景から、キスペプチン産生ニューロンの軸索が見られる視床下部室傍核に着目し、体温調節およびプロラクチン分泌の両方に作用することが知られている、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) 産生ニューロンとの関連性を検証することを発案した。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らが、キスペプチン免疫陽性の神経線維終末がシナプスすることを示したのは、ラット視床下部に存在するプロラクチン抑制性ドーパミン産生ニューロンのうち、A12 の弓状核にある一群だけであった。プロラクチン抑制性ドーパミン産生ニューロンには、第三脳室沿いに存在する別群 (A14) があり、キスペプチン産生ニューロンの局在する弓状核から吻側に向かって分布している。一方で、ラットで証明したドーパミン産生ニューロンへのキスペプチン軸索投射が、ラット固有なのか、マウスにも存在するのか確認する必要があった。そこで、ラットおよびマウスの両方を用いて、A12 だけでなく、A14 のドーパミン産生ニューロンへのキスペプチン軸索投射のネットワークを同定し、齧歯類共通のプロラクチン制御系であるか否かを検証することとなった。

(2) 下垂体からのプロラクチン分泌は、TRH によっても制御される。また、TRH は甲状腺刺激ホルモンを分泌し、体温調節に関与することがよく知られているが、性ホルモン状態に応じた動態はあまり分かっていない。視床

下部室傍核に局在する TRH 産生ニューロンは、ほとんどエストロゲン受容体を発現していない。にもかかわらず、TRH 遺伝子発現は、女性ホルモンの影響を受けることが報告されており、エストロゲンの情報を間接的に伝える中継ニューロンがあると考えられた。このような推測のもと、以下の事項を目的とした。

キスペプチン産生ニューロンは、室傍核 TRH 産生ニューロンへ軸索投射するか、もし投射するならば、どの区域の TRH ニューロン集団に投射するのかを検索する。

視床下部室傍核の TRH 産生ニューロンは、キスペプチンの作用を直接受けることができる受容体を発現しているか否かを検証することとした。室傍核には、やはり生殖と深く関連したオキシトシン産生ニューロンも存在し、キスペプチンの投射を受けている可能性が示唆されるため、併せて受容体遺伝子の発現解析を行う。

女性ホルモンが TRH 遺伝子発現に与える経路としてキスペプチン産生ニューロンを介する経路を仮定し、このニューロンの破壊実験による機能解析を試みることを目的とした。まずは、女性ホルモンに対する感受性を、TRH 産生ニューロンの亜群ごとに解析し、キスペプチン軸索投射先との関連性を検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 代表的な齧歯類の実験動物であるラットおよびマウスにおいて、多重免疫組織染色法を用いた神経細胞間の軸索投射を検索した。ドーパミン産生ニューロンの標識には、ドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) に対するモノクローナル抗体を用い、キスペプチンの標識には、キスペプチン C 末端の生理活性ペプチド部位の配列に対するポリクローナル抗体を用いた。動物は主に成熟した雌を用い、十分な全身麻酔後に心臓カテーテルによる灌流固定を行い、組織学的検索のための脳サンプルを採取した。脳の急速凍結切片を作製し、上記の抗体による蛍光二重免疫染色を行い、顕微鏡による解析を行った。用いた顕微鏡は、蛍光顕微鏡およびレーザー共焦点顕微鏡で、前者はドーパミン産生ニューロンの細胞体の分布、およびキスペプチン陽性の神経線維の分泌の分布の観察に用いた。キスペプチン陽性線維の TH 陽性ドーパミン産生ニューロン細胞体や樹状突起への近接は、共焦点顕微鏡を用いて三次元的に解析した。

(2) キスペプチン産生ニューロンと TRH 産生ニューロンの関係性を調べるため、TRH に対する抗体を作製した。ウサギを宿主として用い、ポリクローナル抗体を作製し、前吸収

試験による抗体の評価を行った。

(1)の方法と同様に、多重免疫組織染色法を用いて、キスペプチン免疫陽性神経線維と TRH 免疫陽性細胞体との関連性の三次元的な解析を試みた。TRH 産生ニューロンは、通常の生理状態では TRH 断片は細胞体内に長く留まらないため、神経線維は染色されても、細胞体の分布が明瞭ではない。そのため、微小管構築を障害し、軸索輸送を障害するコルヒチンを脳室内投与することによって、TRH 陽性の細胞体を可視化した。また、視床下部弓状核にあるキスペプチン産生ニューロンは、タキキニン類に含まれるニューロキニン B を共発現し、同じ軸索で輸送していることが報告されているため、キスペプチン神経線維の視床下部室傍核への投射と併せて、抗ニューロキニン B 抗体を用いた、ニューロキニン B 免疫陽性神経線維の投射についても解析した。

視床下部室傍核に分布する TRH 産生ニューロンがキスペプチンあるいはニューロキニン B を結合することができる受容体を所持していることを検証するため、様々なニューロンの混在する室傍核から TRH ニューロン集団のみを、レーザーマイクロダイセクション法を用いて回収することを試みた。TRH 産生ニューロンを特定するための標識には、(2) で用いた抗 TRH 抗体を利用した。免疫染色条件の検討の結果、アセトンやホルマリンによる軽度の固定では染色されないことから、パラホルムアルデヒドによって固定された脳切片から、標識された TRH 産生ニューロンを回収し、遺伝子発現解析をする方法を試みた。アルデヒド固定による遺伝子の断片化が生じた切片からの、キスペプチンやニューロキニン B に対する受容体の遺伝子解析を試みるため、まずは単独ニューロン集団ではなく、室傍核の領域ごとによる解析を行った。

パラホルムアルデヒド固定した脳から作製した切片をフィルム付スライドガラスに貼付し、レーザーマイクロダイセクション機を用いて室傍核の亜領域を UV レーザーにて切り抜いて採集した。得られた組織片から total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA テンプレートを作成した。受容体遺伝子は、キスペプチンへの親和性が報告されている受容体として、*kiss1r*, *npff1r*, *npff2r*, ニューロキニン B への親和性がある受容体としては、*tac2r*, *tac3r*, について、各プライマーを用いた PCR によって検索した。PCR 産物を電気泳動および塩基配列のシーケンスにより解析した。

室傍核の TRH 産生ニューロンは大きく分けて、視床下部正中隆起で血管系に投射して下垂体前葉に作用するグループと、脳内の各領域に投射して神経ネットワークを形成

するグループがあり、ニューロン細胞体の室傍核内の存在領域が凡そ分けられている。このため、性ホルモン量の変化などに対して影響を受ける遺伝子発現変化を、TRH 産生ニューロンの投射型ごとに解析できる可能性がある。方法としては、遺伝子発現の比較定量を行うため、アルデヒド固定ではなく、未固定の凍結新鮮脳を用いて解析を行った。第一段階として、全身麻酔下で卵巣摘出術を施した成熟雌ラット群を用意し、うち半数には一週間後に -エストラジオール (E2) を3日間連続で皮下注射して E2 群とし、E2 無処置の残り半数を OVX 群とした。動物をエスカリンによる吸引麻酔後にすばやく断頭処置し、脳を取り出して急速凍結した。個々の脳サンプルから -20 のクリオスタット内で、視床下部室傍核を含む凍結切片を作製し、クレジールバイオレットによる対比染色を行った。顕微鏡下で室傍核内の大細胞領域、小細胞領域の吻側部、脳室周囲部を同定し、それぞれの領域をレーザーマイクロダイセクション機によって切り抜き、回収した。得られた組織片から total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA テンプレートを作成した。これをもとに、OVX 群と E2 群の個々の動物について、TRH およびオキシトシンの mRNA、キスペプチン親和性受容体 mRNA の *kiss1r*, *npff1r*, ニューロキニン B 親和性受容体 mRNA の *tac3r* について、real-time PCR 法により比較定量を行った。これらは、過去の報告の追試とともに、キスペプチン産生ニューロンを弓状核において特異的に細胞死させるイムノトキシンの脳内投与による破壊実験群との比較において、性ホルモン状態を TRH 産生ニューロンに中継する役割としてのキスペプチン産生ニューロンの重要性を検証する実験の一端として行われた。

4. 研究成果

(1) キスペプチン産生ニューロンが存在する同じ視床下部弓状核内に存在するプロラクチン抑制性ドーパミン産生ニューロン (A12) へのキスペプチン陽性線維の集積は報告していたが、本研究の結果、散在性に脳室周囲核に分布するプロラクチン抑制性ドーパミン産生ニューロン (A14) へも同様に投射していることが確認された。脳室沿いを走行するキスペプチン陽性線維のほとんどはニューロキニン B との二重染色で、両方に陽性であることから、弓状核のキスペプチン産生ニューロン群からの投射であると考えられた。次に、プロラクチン抑制性ドーパミン産生ニューロンが、これらの神経ペプチドに親和性のある受容体を発現していることを検証し、キスペプチン受容体に対する有効な抗体は見つからなかったため検証できなかったが、ニューロキニン B への親和性が最も高いニューロキニン 3 受容体 (TAC3R) が、A12 にも A14 にも発現していることを免疫組織学的に明らかにした。また、キスペプチ

ン産生ニューロン集団の発達にはラットとマウスとでは差があることが知られているが、本研究の結果では、マウスにおいてもラット同様に A12 および A14 のドーパミン産生ニューロンへの投射・近接が示されたため、代表的な齧歯類の実験動物であるラットとマウスともに、キスペプチンおよびニューロキニン B 産生ニューロンによるプロラクチン制御系が存在する可能性が示唆された。以上の研究成果は、原著論文 (文献 1) として発表し、国際神経内分泌学会においても報告した。

(2) ラット視床下部の切片を用いて新たに作製した抗 TRH 抗体の免疫染色性を、過去に報告されている TRH 産生ニューロンの細胞体および神経線維の分布を比較した。免疫陽性細胞は、室傍核吻側の背内側部に多く、尾側では脳室周囲部に多くの分布が見られたほか、室傍核以外でも脳弓周囲や外側野に陽性細胞が散在し、過去の報告に一致した。免疫陽性神経線維の分布についても、視床下部正中隆起に高密度に観察された。また、抗原ペプチドと抗体を一晩反応させた前吸収試験では、上記の免疫染色性がほぼ消失した。以上の結果から、作製した抗体によって標識される細胞および神経線維は、TRH の局在を反映していると判断した。

一方、キスペプチンおよびニューロキニン B の免疫陽性神経線維は、視床下部室傍核へ投射し、尾側の脳室周囲部や吻側の背内側部に相対的に多く見られることが分かった。多くの神経線維が、キスペプチン+ニューロキニン B によって二重染色された。すなわち、これらは 2 つのペプチドを共発現することが報告されている弓状核のキスペプチン産生ニューロン群からの投射であると考えられた。次に、TRH とキスペプチンに対する抗体の二重標識の結果では、背内側部の TRH 陽性細胞の周囲にキスペプチン陽性線維が走行し、レーザー共焦点顕微鏡下で重なるように近接することが確認された。このことは、少なくともキスペプチン産生ニューロンの軸索が室傍核の TRH 産生ニューロン細胞体に投射していることを示しており、伝達物質の放出が行われていることが示唆された。但し、キスペプチン線が近接する TRH 陽性細胞は全体の細胞数に比してあまり多くは見られなかった。このことはコルヒチンの処理を行った場合と、用いなかった場合で検討してみる必要がある。

TRH 産生ニューロンにおける受容体発現を解析するには、一つには double-in situ hybridization 法によって組織学的に明らかにする方法があるが、本研究ではより多くの発現遺伝子を解析することと、定量的な比較を行う意図があり、シングルセル回収と PCR 法による発現遺伝子解析を行った。作製した

TRH 抗体は結果的に新鮮に近い切片では標識されなかったため、シングルセルレベルでの比較定量は行うことができなかった。しかし、アルデヒド固定した脳サンプルから発現遺伝子を解析することには成功した。最初に、TRH 産生ニューロンの分布する室傍核の背内側部や脳室周囲部をレーザーマイクロダイセクション法で回収し、キスペプチン親和性受容体 mRNA である *kiss1r*, *npff1r*, *npff2r*, ニューロキニン B 親和性受容体 mRNA である *tac2r*, *tac3r*, について、各プライマーを用いた PCR によって検索し、PCR 産物を電気泳動および塩基配列のシーケンスにより解析した。その結果、*tac3r*, *npff1r*, *npff2r* の 3 つの産物において、シーケンスが一致し、この方法によって受容体遺伝子の発現を検証できることが示された。次に、室傍核を含む切片から、TRH やオキシトシンに免疫標識されたニューロン集団をレーザーマイクロダイセクション法でシングルセル回収し total RNA を抽出したサンプルにおいても同様に解析した結果、TRH サンプル、オキシトシンサンプルともに *tac3r* などの PCR 産物が電気泳動により確認された。TRH やオキシトシンの産生ニューロンが、キスペプチンやニューロキニン B のシグナルを受けることができる受容体遺伝子を発現していることから、これらの室傍核ニューロンが、性ホルモン状態に応じて活動性が変化するキスペプチン産生ニューロンの投射を受け、神経ペプチドによる制御を受ける可能性が示唆された。

キスペプチン産生ニューロンの軸索投射と TRH 産生ニューロンの受容体遺伝子発現を検証するとともに、その機能的意義の検証を試みた。室傍核におけるエストロゲン受容体の発現は全体として多くはなく、TRH 産生ニューロンはとくにエストロゲン型受容体、型受容体ともにほとんど発現していない。しかし、E2 血中濃度の増加に応じて、室傍核 TRH mRNA の発現量が減少することが示されている。本研究では最初に、神経内分泌型 TRH 産生ニューロンと脳内投射型 TRH 産生ニューロンの領域をレーザーマイクロダイセクション法でそれぞれ回収し、E2 血中濃度による TRH mRNA 発現量の変化が現れる領域 (投射による TRH 産生ニューロン亜集団) を比較することから開始した。結果としては、室傍核脳室周囲部、すなわち神経分泌型 TRH 産生ニューロンの多い領域において TRH mRNA が E2 群で減少することが示唆されたが、この結果については E2 濃度依存性を含めた実験数の追加が必要である。本研究の目標は、E2 濃度と TRH mRNA 発現量の関係を把握し、その中継ニューロンとしてのキスペプチン産生ニューロンがホルモン変化による TRH の発現調節、体温調節、プロラクチン分泌などに関与することを検証することであったが、これらは現在、ひ

きつづき検証中の課題である。

<引用文献>

Nobuhiko Sawai, Norio Iijima, Hitoshi Ozawa, Toshiyuki Matsuzaki. Neurokinin B- and kisspeptin-positive fibers as well as tuberoinfundibular dopaminergic neurons directly innervate periventricular hypophyseal dopaminergic neurons in rats and mice. Neuroscience Research, 84, 2014,10-8.

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 1 件)

Sawai N, Iijima N, Ozawa H, Matsuzaki T. Neurokinin B- and kisspeptin-positive fibers as well as tuberoinfundibular dopaminergic neurons directly innervate periventricular hypophyseal dopaminergic neurons in rats and mice. Neuroscience Research、査読有、84、2014、10-8.
DOI: 10.1016/j.neures.2014.05.002.

[学会発表](計 7 件)

澤井信彦、性ホルモンによる視床下部室傍核TRHおよび生殖関連ペプチド受容体の垂核間mRNA発現量変化の比較解析 .第122回日本解剖学会全国学術集会 .2017年3月29日 .長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市) .

澤井信彦、ラット視床下部ドーパミンニューロンへの蛍光標識キスペプチンを用いた in vivo binding assay法の検討、第121回日本解剖学会全国学術集会 .2016年3月27日 .ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市) .

Sawai N, Iijima N, Ozawa H, Matsuzaki T. Prolactin-regulating dopaminergic neurons in the hypothalamus express neurokinin-B receptor and are innervated by neurokinin B- and kisspeptin-immunopositive fibers in rodents. The International Congress of Neuroendocrinology, 2014年8月18日 .シドニー(オーストラリア) .

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤井 信彦 (SAWAI, Nobuhiko)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：70307916

(2)研究分担者

松崎 利行 (MATSUZAKI, Toshiyuki)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30334113

飯島 典生 (IIJIMA, Norio)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00285248