論文の内容の要旨

論文題目

Endocrinological studies on the estrogenic regulation of follicle stimulating hormone using a model teleost, medaka (*Oryzias latipes*)

（モデル生物メダカ（*Oryzias latipes*）を用いたエストロジェンによる濾胞刺激ホルモン制御に関する内分泌学的研究）

氏名　加用　大地

序論

すべての生物は、フィードバック制御の仕組みをあらゆる制御系に取り入れている。それは生命の始まりである受精卵から一つの個体が出来上がり、外部環境の中を生き抜き命尽きるまで、その生命体の維持のために作用し続ける。とりわけ、本研究が対象とする脊椎動物の視床下部・脳下垂体・生殖腺制御系における負のフィードバック調節機構は、親世代の生存に必要なリソースの浪費を防ぎ、生殖機能を正常に維持することなどに役立っており、フィードバック制御の代表例としてその存在は古くから知られている。

脊椎動物の配偶子の形成には、脳下垂体から放出されるゴナドトロピン（濾胞刺激ホルモン（FSH）及び黄体形成ホルモン（LH））が重要な機能を果たしている。近年、真骨魚類を用いた FSH、LH のノックアウト（KO）実験によってこれらゴナドトロピンの脊椎動物に普遍的な役割が知られるようになった。これらゴナドトロピンは、メス個体においては、それぞれ、卵巣の濾胞発育（FSH）または排卵（LH）を促進する。一方、発育した濾胞から血中に放出される性ステロイドホルモン、「エストロジェン」によって自身の産生量はフィードバック調節（エストロジェンフィードバック）を受けている。

近年、魚類でも KO 実験が行えるようになって改めて明らかになったように、一般的に、脊椎動物において FSH は濾胞発育を、LH は排卵をそれぞれ促進する。しかしそれに加えて、哺乳類においてのみ、後期濾胞発育で LH が FSH に取って代わって機能する、という大きな違いもわかってきた。哺乳類では、視床下部のキスペプチン産生ニューロンがエストロジェンフィードバックの標的（エストロジェン受容体（ER）を発現）となってエストロジェンを受容し、GnRH ニューロンを介して脳下垂体 LH の放出をパルス状に刺激するという独特の神経回路の存在により、LH が後期濾胞発育を制御する（図 1 下部、Herbison, 2016）。このように、哺乳類で想定されている濾胞発育のフィードバック制御は、「キスペプチンニューロンを介した LH パルスの調節経路」という哺乳類以外の脊椎動物では存在しない経路である。したがって、哺乳類以外の脊椎動物にも普遍的な濾胞発育制御のフィードバック調節を理解するには FSH のフィードバック制御機構を知ることが不可欠である（図 1）。

先に述べたとおり、脊椎動物全般に濾胞発育に対する重要性が広く知られるようになった FSH であるが、この制御機構

に関する研究は脊椎動物全体を通しても少なく、理解が進んでいないのが現状である。本研究では、濾胞発育を調節するエストロジェンフィードバックにおける、FSH 制御機構の解明に向けて、繁殖状態の実験操作が容易で、ゲノム編集技術や各種の生理学的実験手法が適用可能な真骨魚類メダカをモデルとして活用し、解析を行った。

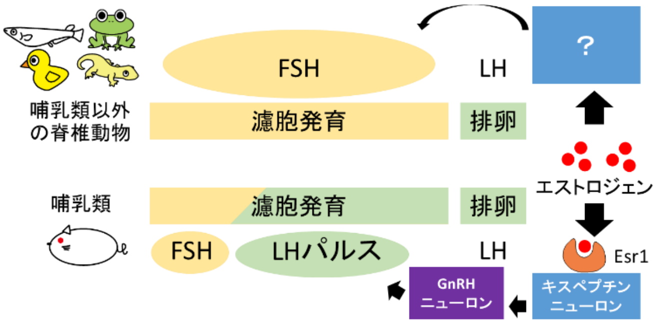


図 1 ゴナドトロピンの濾胞発育に対する寄与及び、脊椎動物間での比較

1 章 FSH 制御に寄与するエストロジェン受容体の同定

エストロジェンが作用するには ER の存在が不可欠である。過去の研究より、真骨魚類メダカの FSH mRNA (*fshb*) 発現量は、エストロジェンによって負のフィードバック制御を受けている(抑制されている)ことが示されていることから(Kanda *et al.*, 2011)、この制御にも ER が強く関与するものと考えられる。メダカは 3 種類の ER サブタイプ(Esr1、Esr2a、Esr2b)をもつため、本章ではまずどの ER が FSH 制御に関与するのかについての絞り込みを行った。まず CRISPR Cas9 システムにより各 ERKO メダカを作製し、妊性を確認したところ、*esr2a*$^{-/-}$メス個体が不妊となることが明らかになった。続いて脳下垂体 *fshb* 発現量を各 ERKO 個体で比較した結果、*esr2a*$^{-/-}$メスにおいて発現量が有意に増加することが明らかになった(図 2)。これらの結果から、Esr2a サブタイプがエストロジェンによる *fshb* 発現抑制に関わる可能性が示唆された為、引き続く解析として *esr2a*$^{-/-}$メス個体でみられた不妊が高発現 *fshb* とどのように関わっているのかについて検証した。まずエストロジェンの産生器官である卵巣について、解剖と組織切片による観察を行ったところ、*esr2a*$^{-/-}$メス個体は正常な濾胞と排卵後の卵を卵巣内に保持していた。さらに興味深いことに、*esr2a*$^{-/-}$メス個体は不妊にもかかわらず、通常のメス個体が見せる一連の性行動を正常に行った。これらの結果から、排卵した卵を体外に出せない可能性を考え、メスメダカの輸卵管組織切片を入念に観察した結果、*esr2a*$^{-/-}$メス個体において輸卵管形成不全が起きていることが明らかとなった(図 3)。

以上の結果から、Esr2a サブタイプが FSH 制御の負のフィードバックに関与する可能性が示唆された。また、*esr2a*$^{-/-}$メス個体の不妊の直接的な原因は輸卵管閉鎖によるものであり、*esr2a*$^{-/-}$個体は *fshb* 発現のエストロジェンフィードバック制御以外には脳下垂体・卵巣の機能に大きな影響を及ぼしていないことがわかった。これらの結果をうけて、その後の解析では *esr2a*$^{-/-}$メス個体を活用することで、Esr2a サブタイプを介した FSH 発現の負のフィードバック制御を解析することとした。

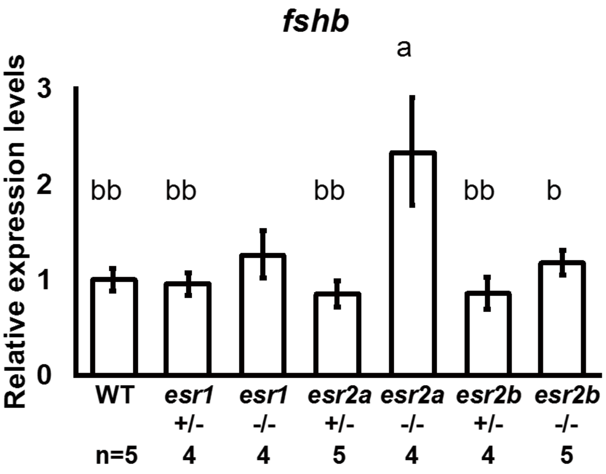


図 2 各 ERKO メス個体の *fshb* 発現量
esr2a$^{-/-}$メス個体は、*esr1*$^{-/-}$メス個体を除いて有意な *fshb* 発現上昇を示す。(a VS b: $P < 0.05$, a VS bb: $P < 0.01$, Tukey-Kramer's test)

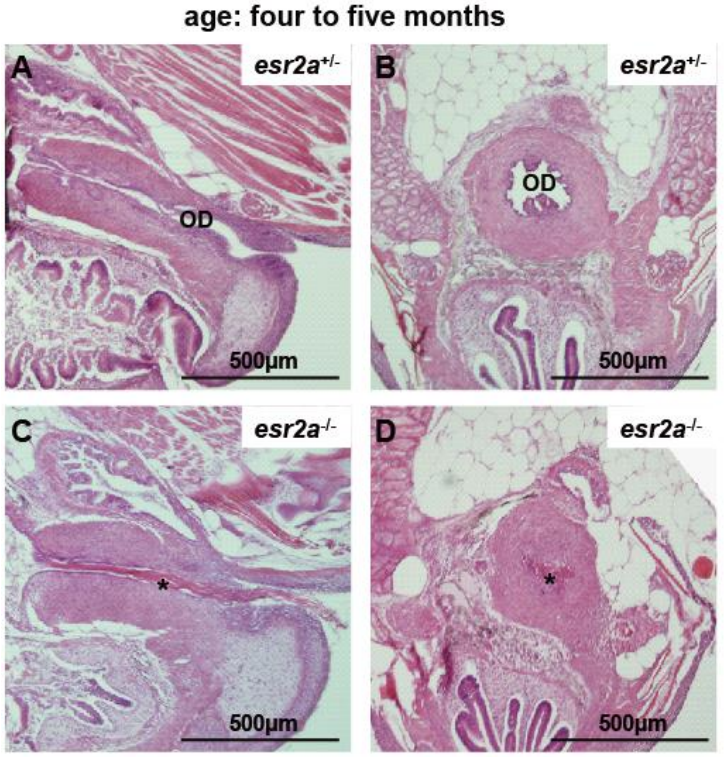


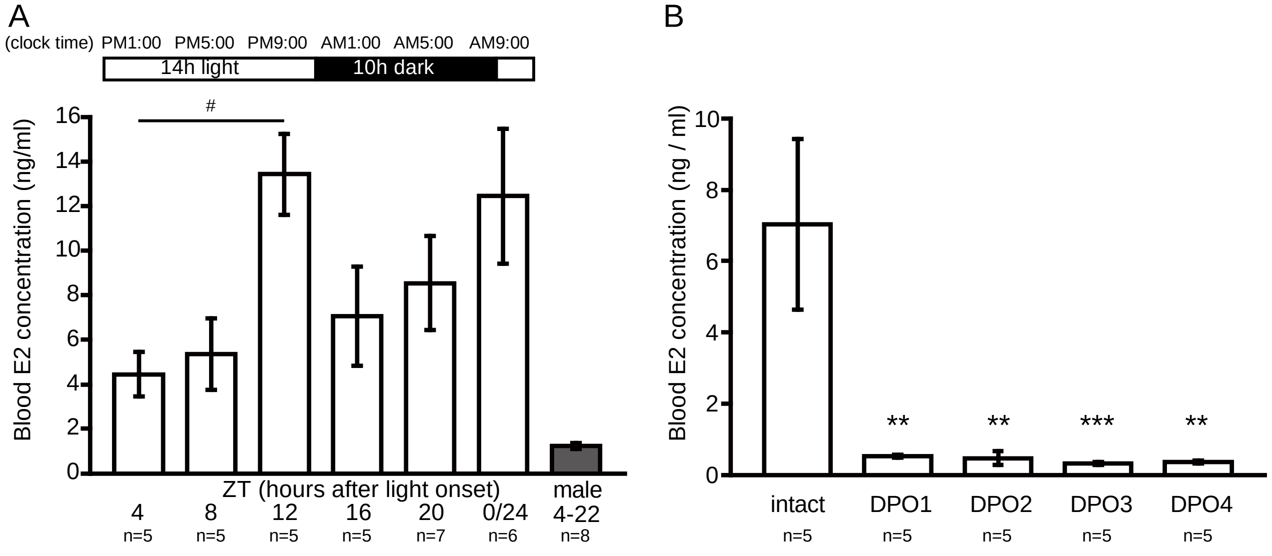
図 3 4-5 ヶ月齢 *esr2a*$^{+/-}$、*esr2a*$^{-/-}$メスメダカの輸卵管
A、B *esr2a*$^{+/-}$メスメダカ輸卵管の矢状断面(A)、冠状断面(B)。C、D *esr2a*$^{-/-}$メスメダカ輸卵管の矢状断面(C)、冠状断面(D)。OD:輸卵管、*:輸卵管閉鎖

2 章　エストロジェンフィードバック機構解析モデルの確立

エストロジェンフィードバック機構を解析するにあたり、血中エストロジェン濃度の知見は必須である。しかし、メダカは小型で採血の難易度が高い為か、これらに関する知見が極めて少ないという問題点があった。本章では、まずメダカの生理的な血中エストロジェン（主要なエストロジェンである 17β-Estradiol （E2））濃度を ELISA 法により測定し、卵巣除去手術（OVX）によって内因性 E2 が除去される時間経過を解析した。そして、複数の E2 投与方法を比較し、生理的な血中 E2 濃度を再現するのに適した方法を検討した（図 4）。

メダカの生理的な血中 E2 濃度は、メス個体において 4-13ng/ml の範囲をとり、オス個体では 1ng/ml 程度であった（図 4A）。メダカの生理的血中E2濃度に関する報告は過去に2件の論文があったが、血清中E2濃度では4-20ng/ml（Soyano *et al*., 1993）、血漿中 E2 濃度では 363-401ng/ml（Foran *et al*., 2002）と、その値は大きく食い違うものであった。今回の結果は前者に近いものであり、雌雄含めたメダカ血中 E2 濃度をより正確に理解する上で重要な知見となった。また、メス個体における内因性 E2 は OVX 手術後 24 時間以上経過するとオスと同程度まで減少することを示した（図 4B）。続いて、前述の結果より、血中 E2 濃度がメスに比べて十分低いことが示されたオスメダカに対して E2 投与を行い、3 種類の E2 投与方法における血中 E2 濃度変化を比較した（図 4C）。その結果、人工飼料に E2 を配合して給餌投与する方法において、一過的な血中 E2 濃度の上昇と 24 時間以内での減少が起きており、日内変動しているメスメダカの血中 E2 濃度の変化を実験的に再現するにあたって優れた手法であることが示された。非常に興味深いことに、いくつかの先行研究で用いられていた環境水中への E2 曝露投与法では、血中 E2 濃度は環境水 E2 濃度（処理濃度）よりも圧倒的に高い値を示し、メダカ体内への強い吸着、すなわち生体濃縮が示唆されたほか、投与後 24 時間が経過しても生理的な血中 E2 濃度を大きく超えた値を保っており、投与量の調節が極めて難しいことが明らかになった。腹腔内に E2 含有シリコンブロックを埋め込む方法においても、水中暴露時とほぼ同様の濃度変化を示した。

一連の解析から、今回比較した 3 種類の E2 投与方法において、給餌投与による E2 処理方法が、メスメダカにおける内因性の E2 作用を解析する際に有用な手法であることが明らかになった。



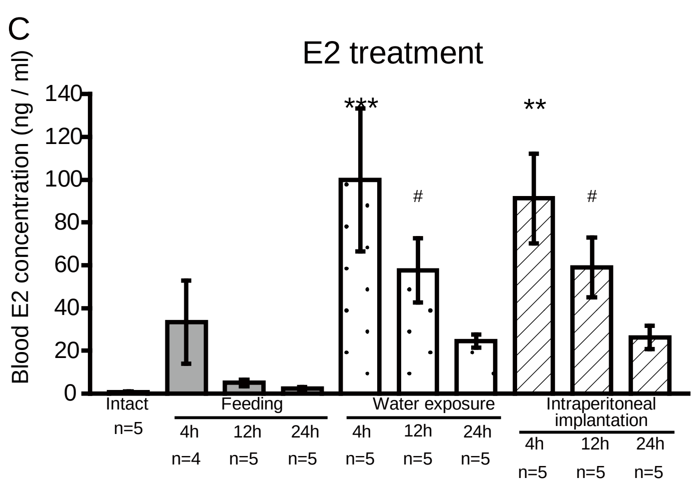


図 4　メダカの全血中 E2 濃度
A　白及び灰色の棒グラフはそれぞれメス、オスの血中 E2 濃度を示す。メス個体は 4 時間おきに採血し、ZT0/24 は明期の開始を意味する（Tukey-Kramer's test, #: P < 0.1）。B　卵巣除去後 1 日で、メス個体の血中 E2 濃度はオスと同程度まで減少する（Dunnett's test, compared with intact, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, DPO: days post OVX）。 C　オスメダカに対する 3 種類の E2 投与後の、血中 E2 濃度の時間経過。灰色、ドット状、および斜線で示した棒グラフはそれぞれ給餌投与群（Feeding）、水中暴露（Water exposure）、腹腔内投与（Intraperitoneal implantation）を示す（Dunnett's test, compared with intact, #: P < 0.1, **: P < 0.01, ***: P < 0.001）。

3 章　FSH 産生を調節するエストロジェンフィードバック経路の解析

E2 による FSH 産生抑制に Esr2a サブタイプが必要であることを検証するため、2 章で検討した E2 の給餌投与方法を活用し、*esr2a*$^{+/-}$、*esr2a*$^{-/-}$メス個体に適用した。その結果、*esr2a*$^{+/-}$メス個体では OVX+E2 処理により *fshb* の発現が有意に減少したが、*esr2a*$^{-/-}$メス個体では有意な減少が見られなかった（図 5A、B）。この結果より、1 章で示唆された通り、エストロジェンによる FSH の負のフィードバック制御に Esr2a サブタイプが大きく寄与していることが実験的に示された。先行研究と異なり、*esr2a*$^{+/-}$メス個体が OVX 個体と同程度の高 *fshb* 発現を示したが、これは実験に用いた個体の生殖腺がやや未成熟だったため、*fshb* 発現抑制に必要なエストロジェンが不足していたことによるものと考えられる。

続いて、エストロジェンの作用点についての解析を行った。*fshb* の負のフィードバック制御に視床下部性の入力が必要かどうか検証するため、脳下垂体を単離培養し視床下部からの入力を遮断した状態で E2 を作用させた（図 5C）。その結果、E2 含有培地上で 20 時間脳下垂体を単独培養するだけで *fshb* の有意な発現減少が起きた。さらに、同一条件で *esr2a*$^{-/-}$メス個体の脳下垂体を単独培養したところ、E2 依存的な発現抑制がほぼ消失した（図 5D）。この結果から、Esr2a を介する FSH の負のフィードバックは脳下垂体への直接制御の可能性が示された（図 6）。

まとめ・考察

今回、メダカを用いた解析から、発達した濾胞から放出されたエストロジェンは、脳下垂体に直接作用し Esr2a を介して FSH の転写を抑制することが明らかになった。このフィードバック機構の脊椎動物での一般性は今後明らかにしていく必要があるが、哺乳類の LH パルス調節では視床下部に対するフィードバックが重要であるのに対し、メダカにおいては卵巣から脳下垂体への短い経路を介したフィードバック制御が重要であることがわかった。

母親が生まれる前から子に与える投資、つまり配偶子形成にどれだけのコストを費やし、どれだけを自身の生存に費やすか、というトレードオフの関係は繁殖戦略レベルでその種の存続を左右する重要な問題である。こうした戦略を内分泌的側面から調節するために、エストロジェンフィードバックによる濾胞発育制御は極めて重要な仕組みであり、本研究では、その重要性にも関わらず不明であった、脊椎動物全般に共通した濾胞発育のフィードバック制御機構を解き明かす端緒を見出すことに成功した。

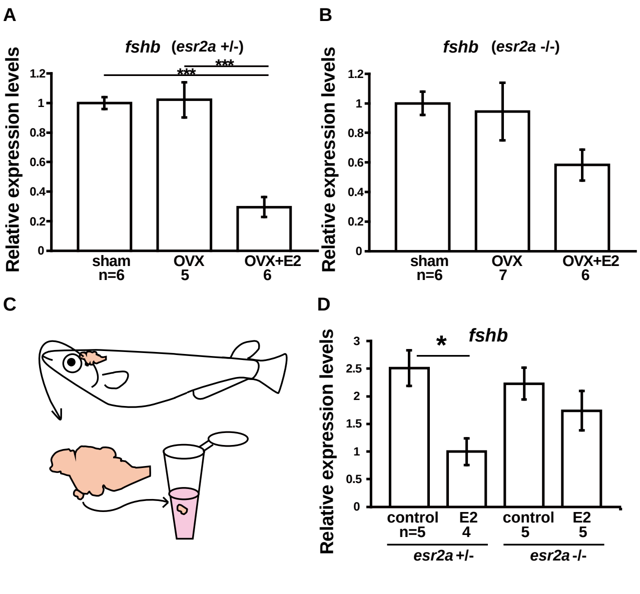


図 5　Esr2a サブタイプがエストロジェンによる *fshb* 発現抑制に必須である。A、B　*esr2a*$^{+/-}$（A）、*esr2a*$^{-/-}$（B）メス個体に対する偽手術群（sham）、OVX、および OVX+E2 投与群の *fshb* 発現量（***: $P < 0.001$, Tukey-Kramer's test）。　C、D　脳下垂体単離培養の模式図（C）及び、*esr2a*$^{+/-}$, *esr2a*$^{-/-}$メス個体における培養後の *fshb* 発現量（D, *: $P < 0.05$, Tukey-Kramer's test）

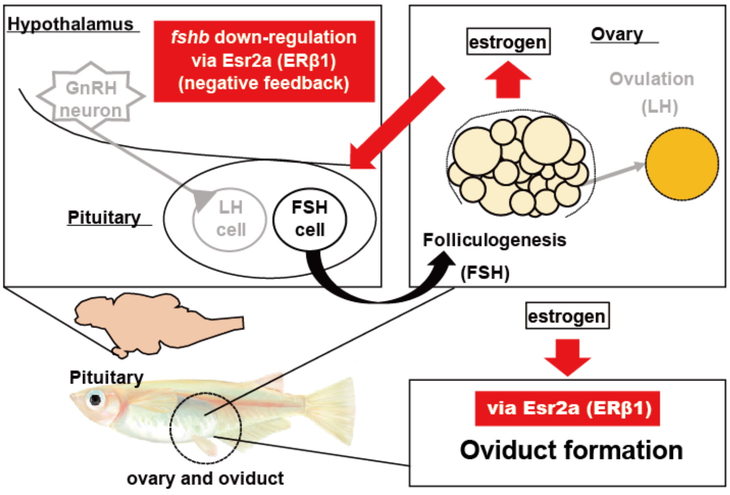


図 6　本研究で明らかにした、Esr2a サブタイプのエストロジェン受容が生殖制御に及ぼす影響の模式図。脳下垂体に発言する Esr2a サブタイプがエストロジェンを受容し、*fshb* 発現を抑制する負のフィードバック調節に必須であることが明らかになった。これに加え、不妊を示す *esr2a*$^{-/-}$メス個体は輸卵管の形成不全を示すことが明らかになった。