

論文の内容の要旨

Neuroendocrinological studies on the neuronal systems that are regulated by kisspeptin neurons using medaka as a non-mammalian model

(メダカをモデルとしたキスペプチン神経系が制御する機能に関する神経内分泌学的研究)

氏名 中城 光琴

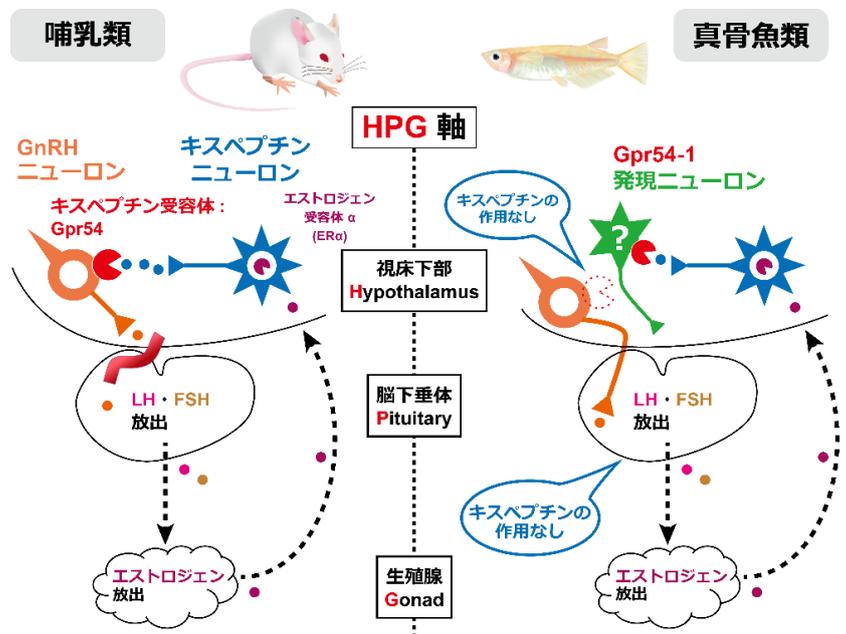
序論

生殖は、全ての生命現象の中で、生物が次世代を残すために必須かつ最重要な機能の一つである。特に、動物の有性生殖では、個体が内外の様々な情報の統合を経て、繁殖期において生殖腺の成熟を促し、生殖可能な状態を実現する生殖機能調節と、異性他個体と交配する性行動等の繁殖期特異的な機能の協調的な制御が不可欠である。この生殖の円滑な遂行に必須な協調的制御には、生殖腺由来の性ステロイドが重要な役割を果たす。脊椎動物の生殖機能調節は、視床下部・脳下垂体・生殖腺における、神経系と内分泌系が協調した機構 (HPG 軸制御機構) によって制御されると考えられている (図 1)。この HPG 軸制御機構について、哺乳類、真骨魚類等を用いた先行研究の共通見解から、脊椎動物の幅広い種 (四肢動物も含む硬骨魚綱) で、視床下部における生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 産生ニューロン、および GnRH の作用によって脳下垂体から放出される生殖腺刺激ホルモン (黄体形成ホルモン (LH) と濾胞刺激ホルモン (FSH)) により、生殖機能調節がなされることが明らかになっている (図 1)。さらに、哺乳類を用いた研究から、視床下部における生殖機能調節の最終共通路と考えられている GnRH ニューロンを直接的に制御する神経ペプチド、キスペプチンの存在が明らかとなった。視床下部に局在し、キスペプチンを産生するキスペプチンニューロンは、エストロゲン受容体 $ER\alpha$ を発現し、生殖腺からフィードバックされる性ステロイドホルモン、エストロゲン依存的に機能することで (エストロゲン感受性)、生殖機能調節を司る。以上の知見より、哺乳類においては、キスペプチンが生殖機能調節の必須因子であることは最早定説となっている (図 1 左)。

一方、近年の真骨魚類を用いた知見から、キスペプチン関連遺伝子 (リガンド: *kiss1/2*, 受容体: *gpr54-1/2*) のノックアウト (KO) メダカ・ゼブラフィッシュが正常な稔性を有することをはじめとした多角的な検証の結果、哺乳類以外の脊椎動物におけるキスペプチンの HPG 軸制御機構への寄与については否定的であることが明らかになりつつある (図 1 右)。しかし、鳥類を除く全ての脊椎動物において、キスペプチン関連遺伝子、およびキスペプチンニューロンのエストロゲン感受性が広く保存されているため、哺乳類では見落とされている、脊椎動物に共通の、キスペプチンが担う重要な生殖状態特異的な機能の存在が強く示唆される (図 1 右)。

そこで本研究では、キスペプチン神経系が司る、HPG 軸制御による生殖機能調節ではない未知の機能の探索を目的とした。真骨魚類に属し、ゲノム情報の豊富なメダカをモデル動物として用い、遺伝子編集技術により樹立された、キスペプチン関連遺伝子の KO や、特定のニューロン群を特異的に EGFP 標識した遺伝子組換え系統を駆使し、組織学、電気生理学、次世代シーケンス等、様々な手法を用いた多角的解析を行った。

図1: キスペプチン神経系と HPG 軸制御機構の概要および哺乳類と真骨魚類での比較。哺乳類 (左) においてキスペプチンニューロン (青) は、ER α (紫) を発現し、生殖状態依存的に GnRH ニューロン (橙) に直接作用し、LH/FSH (桃・金) 放出による生殖機能調節を担う。一方、真骨魚類 (右) においては、キスペプチン受容体 Gpr54 の発現は GnRH ニューロン上ではなく、近傍の別の細胞にあることや、キスペプチンが GnRH ニューロン、LH/FSH 産生細胞に作用しないことなどから、キスペプチンの HPG 軸制御以外の、生殖状態特異的な機能の存在が強く示唆されている。



第1章: キスペプチン関連遺伝子 KO 個体を用いた性行動解析

各キスペプチン関連遺伝子 KO メダカ (*kiss1^{-/-}*, *kiss2^{-/-}*, *gpr54-1^{-/-}*, *gpr54-2^{-/-}*, *kiss1^{-/-};kiss2^{-/-}*) は正常な稔性を保持していることが既に示されている。また、メダカとキンギョを用いた生理学的解析により、キスペプチンが GnRH ニューロン、LH 細胞の活動にも作用しないことから、キスペプチンは真骨魚類では生殖機能調節を司る HPG 軸制御機構には寄与しないことが強く示唆されている。本研究では、生殖機能調節以外の生殖に寄与する表現型として、産卵数および性行動に着目し、同 KO メダカ各系統および野生型からなるペア群を用いてこれらの表現型を解析した。その結果、キスペプチン神経系が性行動制御に寄与する可能性が示唆された。

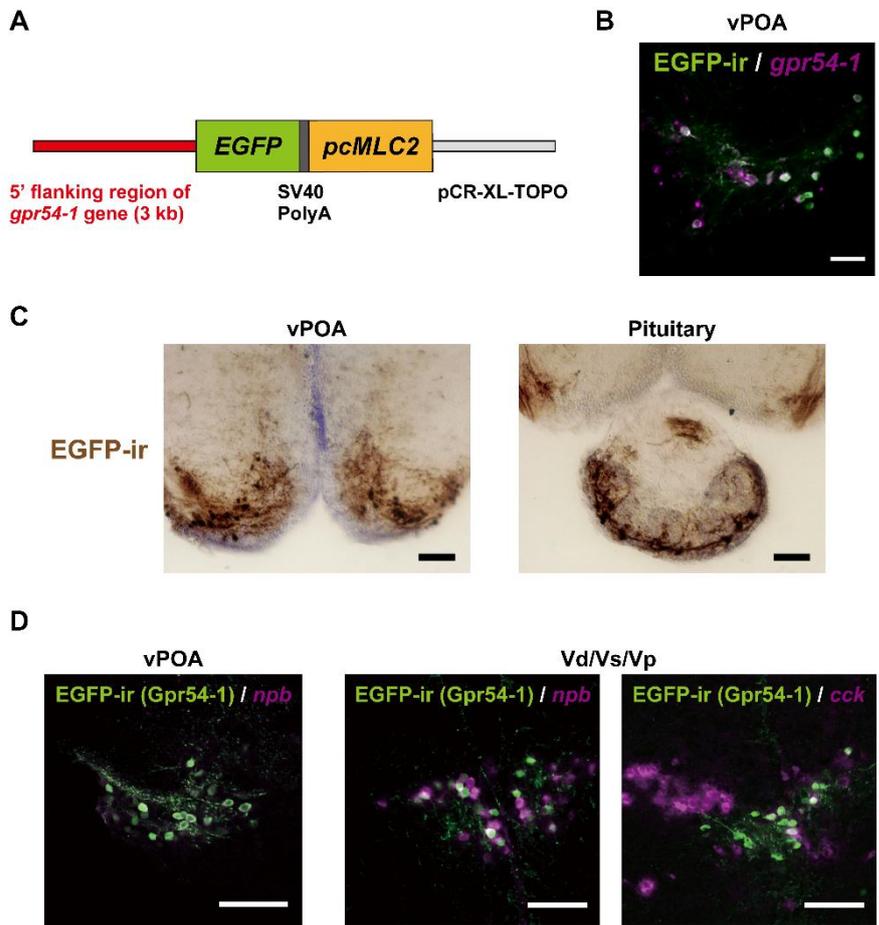
第2章: Gpr54-1 発現ニューロンの担う神経回路の解析

本研究では続いて、エストロジェン感受性である *Kiss1* の制御下にある神経経路の解析を行った。包括的な解析のため、*Kiss1* 受容体 Gpr54-1 を発現するニューロンを特異的に EGFP 標識した遺伝子組換えメダカを樹立し (図 2A, B)、組織学、電気生理学、次世代シーケンスの併用による多角的解析を行った。まず、軸索末端まで EGFP 標識された Gpr54-1 発現ニューロンを用いた軸索投射部位の詳細な組織学的解析により、脳内の複数の神経核に局在する同ニューロンのうち、腹側視索前野 (vPOA) に位置する一群が脳下垂体に顕著な軸索投射をもつことが明らかとなった (図 2C)。また、次世代シーケンスと組織学的手法の併用により、Gpr54-1 を発現する複数のニューロン群が共発現する神経伝達物質として、ニューロペプチド B (Npb)、ニューロペプチド Yb (Npyb)、コレシストキニン (Cck) 等、GnRH ではない様々な神経ペプチドを同定した (図 2D)。さらに、同ニューロンの神経活動が *Kiss1* ペプチド投与によって促進されることを電気生理学的に示した (図 3)。特に、複数の群で Gpr54-1 との共発現が示された Npb は近年、ストレス応答、内分泌制御等の様々な機能への寄与が示唆されてきている神経ペプチドであり、本研究は神経経路レベルで Npb と *Kiss1* 神経系との関係性を示唆した初の知見である。次に、脳下垂体へ顕著に投射する vPOA Gpr54-1/Npb ニューロンが作用する標的細胞を組織学的に探索した。その過程で、脳下垂体主葉基部において、同ニューロンと、脳下垂体ホルモンであるイソトシン (IT)、バソトシン (VT) を産生する IT/VT ニューロンが軸索同士で密に絡み合う特徴的な構造を発見した (図 4)。これより、*Kiss1* を介して vPOA Gpr54-1/Npb ニューロンが脳下垂体において IT/VT の内分泌制御を担うことを示唆した。

第3章: vPOA Gpr54-1/Npb ニューロンによる IT/VT 制御

第2章の結果を受けて、第3章では IT/VT ニューロンに着目し、第2章と同様に多角的な解析を行った。メダカにおける先行研究では、Npb ニューロンはメス特異的に発現している神経核が複数存在する一方で、本研究で特に着目した vPOA 群では雌雄同等の *nbp* mRNA 発現を示すことが報告されている。そこで本章では、vPOA Gpr54-1/Npb ニューロンによる IT/VT ニューロンへの、雌雄同様であることが示唆される作用を解析した。その結果より、エストロジェン感受性の *Kiss1* が vPOA Gpr54-1/Npb ニューロンを賦活し、Npb 放出による POm IT/VT ニューロンの制御を担う一連の神経経路の存在が示唆された (図 5)。

図 2: Gpr54-1 発現ニューロン特異的に EGFP 標識した遺伝子組換えメダカを用いた組織学的解析の結果。A. 遺伝子組換えメダカへ導入したコンストラクトの概要。B. vPOA における EGFP と *gpr54-1* mRNA に対する二重標識像。両シグナルの明瞭な共局在から、同遺伝子組換えメダカにおける Gpr54-1 発現ニューロンに特異的な EGFP 標識が確認された。C. EGFP に対する免疫組織化学による Gpr54-1 発現ニューロンの投射解析。vPOA に局在する同ニューロン群の脳下垂体への顕著な軸索投射がみられた。D. 二重標識による複数の神経核における EGFP (Gpr54-1 発現ニューロン) と *npb*, *cck* mRNA の共局在。vPOA と Vd/Vs/Vp の両神経核において、同ニューロン上の *npb* mRNA の共局在が観察された。また Vd/Vs/Vp については、*cck* mRNA の共局在がみられた。以上より、同ニューロンにおける GnRH ではない複数の神経伝達物質が同定された。



(Scale bars: B, 20 μ m; C-D, 50 μ m)

考察

IT/VT はそれぞれ哺乳類の脳下垂体後葉ホルモン、オキシトシン (OT)/バソプレシン (VP) のオルソログ産物であり、内分泌制御、行動制御等の多様な機能への寄与が示唆されている神経ペプチド・脳下垂体ホルモンである。過去の多くの研究から、IT/VT は脳下垂体神経葉から血中放出され全身性の機能を担うのに対し、脳下垂体主葉基部および中葉においては他の脳下垂体ホルモン制御という局所的な機能を担うと考えられている。特に VT ニューロンは後者の機能の一つとして、脳下垂体のプロオピオメラノコルチン (POMC) 産生細胞を介した、ストレス応答への制御を司ることが幅広い種で示唆されている。本研究ではキスペプチン神経系と、Npb、IT/VT 神経系の関係性を神経経路レベルで示唆した (図 5)。Kiss1 神経系がエストロゲン依存的に機能することも考慮すると、今回発見した神経経路は、IT/VT 放出制御を介したストレス応答等を生殖状態特異的に制御するシステムを構成している可能性が高い。興味深いことに、近年、哺乳類を用いた研究においても、Npb、VT(VP) 神経系はどちらもストレス応答への寄与が示唆されてきている。さらに、OT/VP 神経系へのキスペプチン神経系の直接・間接的な制御も示唆されてきていることから、Kiss1-Npb 神経系を介した、あるいはキスペプチン神経系による直接的な IT(OT)/VT(VP) 制御経路は、脊椎動物に共通する機能の可能性がある。

結論

本研究の結果と上述の先行研究の知見、さらに、キスペプチン関連遺伝子を完全に喪失した鳥類の繁殖という事実を併せて解釈すると、キスペプチン神経系の HPG 軸制御への寄与は、哺乳類だけが進化の過程で偶然獲得した機能であり、脊椎動物に共通する本来の機能は、IT(OT)/VT(VP) への制御などをはじめとする、HPG 軸制御機構による生殖機能調節以外のものであったと推察される。キスペプチン神経系は繁殖期において、生殖腺からのエストロゲンに応じて Kiss1 発現を昂進し、Npb、IT (OT)/VT(VP) 神経系を制御する神経経路を介して、内分泌・行動等の様々な生理機能を制御することで円滑な生殖の遂行に寄与していることが示唆される。更なる比較内分泌学的研究により、脊椎動物間でのこれらの神経系の関係性とその共通性が解明されることが期待され、本研究はそのための重要な足掛かりとなる知見であると考えられる。

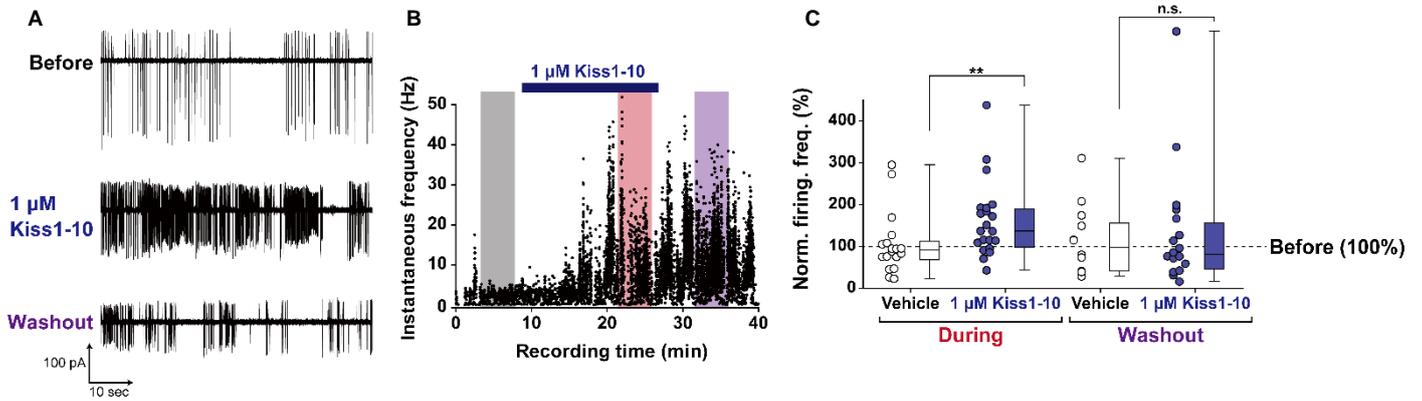


図 3: 同遺伝子組換えメダカを用いた vPOA Gpr54-1 発現ニューロンに対する電気生理学的解析の結果。A. 単一細胞からの記録の一例。Kiss1 ペプチド (Kiss1-10) 投与前・中・後、各 1 分間の抜粋。投与中には顕著な高頻度発火が観察された。B. A に示した記録全体の発火頻度変化を表した散布図。Kiss1 投与による顕著な高頻度発火の上昇がみられた。C. B の各カラーバーで示した時間帯について、複数の記録を統計処理した結果。対照群 (Vehicle) に対し、Kiss1 (青) の投与中 (赤) は発火頻度の有意な増加が示された ($p < 0.01$, Mann-Whitney U test)。一方、投与後 (紫) については有意な差はない。投与中・後の発火頻度は投与前 (灰) の発火頻度により標準化している。

図 4: 同遺伝子組換えメダカを用いた Gpr54-1 発現ニューロンとイソトシン (IT) ニューロンに対する二重免疫組織化学の結果。A. 脳下垂体における両ニューロンの軸索形態。脳下垂体背側 (左上) の神経葉ではなく、辺縁 (右・下部) の脳下垂体主葉基部において両ニューロンの軸索の近接がみられる。B. A の点線部の拡大図。IT ニューロンの軸索膨大部を vPOA Gpr54-1/Npb ニューロンの軸索が囲い込むような特徴的な構造が観察された。

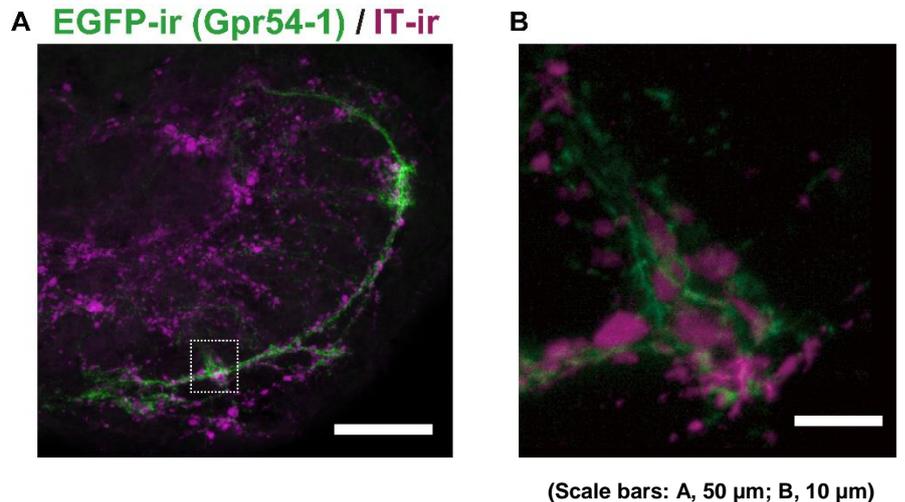


図 5: 本研究より示唆された神経経路と作業仮説。先行研究より、視床下部 NVT における Kiss1 ニューロン (茶) は $ER\alpha$ (桃) を発現し、生殖腺からのエストロゲン依存的に活動するエストロゲン感受性をもつ。また GnRH1 ニューロン (橙) は Kiss1 受容体 Gpr54-1 (赤) を発現しないことが示されている。本研究では、Vd/Vs/Vp および vPOA において、Gpr54-1 発現ニューロン (緑) が Npb 等の GnRH ではない神経伝達物質を発現することが示された。さらに、vPOA Gpr54-1/Npb ニューロンは、POm に局在し、先行研究では Kiss2 の作用が示唆されている IT/VT ニューロン (紫) に対し、両者の投射部位である脳下垂体主葉基部における軸索間で作用することが示唆された。以上より、Kiss1-Gpr54-1 神経系が司る生殖状態特異的な機能として、Npb を介した間接的な IT/VT 制御が神経経路レベルで示唆された。

