

## 審査の結果の要旨

だい みんど  
氏 名 戴 明道

哺乳類における繁殖活動は、視床下部－下垂体－性腺軸 (hypothalamic-pituitary-gonadal axis) によって制御されている。性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-releasing hormone : GnRH) は、視床下部で産生され、下垂体からの黄体形成ホルモン (luteinizing hormone : LH) の分泌を刺激する重要な神経ペプチドである。GnRH と LH には、パルス状およびサージ状という 2 種類の分泌様式が存在する。サージ状分泌は排卵を誘起する一方で、パルス状分泌は発情周期の回帰や卵胞の発達、性ステロイドホルモンの分泌に重要な役割を担っている。2003 年にキスペプチンとその受容体である GPR54 が発見されて以降、これらが GnRH や LH に対して促進効果をもたらすという知見が集積され、現在では、キスペプチン神経群が GnRH 神経の上流に存在し、その活動を制御していると考えられている。なかでも、弓状核に存在するキスペプチン神経細胞はニューロキニン B (neurokinin B : NKB) とダイノルフィン (dynorphin A : Dyn) を共発現しているために KNDy 神経細胞と称され、本細胞群が GnRH パルスジェネレータの本体と推察されている。パルス発生機構として、NKB と Dyn は重要な役割を担うと考えられるが、NKB の受容体である NK3R は KNDy 神経細胞に発現し自己もしくは傍分泌によってフィードバックループを形成し、KNDy 神経細胞を活性化する一方で、Dyn とその受容体であるカップオピオイド受容体 (kappa-opioid receptor : KOR) は LH のパルス状分泌を抑制することが知られているものの、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、弓状核における *Oprk1* (KOR をコードする遺伝子) を発現する細胞群を同定し、GnRH パルス産生機構に対する役割と KNDy 神経に対する Dyn-KOR シグナリングの役割について解明することを目的とした。

本論文は 5 章で構成され、第 1 章において本研究の背景と目的が論じられている。

第2章では、*Oprk1* 発現細胞を同定することとした。本実験では、雌ラットの弓状核における *Oprk1* の *in situ* hybridization (ISH) とキスペプチンの免疫染色を同時に実施したところ、両者は弓状核全般に渡って染色されたものの、キスペプチン含有神経細胞に *Oprk1* の発現は認められなかった。一方で、キスペプチン陽性軸索が、*Oprk1* 発現細胞近傍に存在することが明らかとなった。以上の結果より、KNDy 神経細胞に存在する Dyn が近傍の *Oprk1* 発現細胞に作用することでパルス発生機構に関与するものと考察している。

第3章では、弓状核に存在する *Oprk1* 発現細胞が LH パルス状分泌に与える影響について検討した。細胞毒として知られる Saporin に Dyn を結合し、これを雌ラットの弓状核に投与して選択的に *Oprk1* 発現細胞を破壊したところ、LH パルスの頻度と基底濃度が有意に増加した。一方でキスペプチン神経細胞には影響が認められなかった。以上の結果より、弓状核におけるキスペプチン神経細胞には *Oprk1* は発現していないこと、*Oprk1* 発現細胞は KNDy 神経細胞に対して抑制効果を有することが示唆された。

第4章では、Dyn と *Oprk1* 発現細胞の関係について検討した。雌ラットの第三脳室内に KOR の選択的アゴニストである nalfurafine を投与した後、弓状核を *Oprk1* と Fos 蛋白について共染したところ、nalfurafine 投与群では Vehicle 投与群に比較して二重陽性細胞数が有意に増加することが明らかとなった。以上の結果より、弓状核における *Oprk1* 発現細胞は Dyn によって活性化することが示唆された。一般的に KOR は  $G\alpha_i$  サブユニットを含む G 蛋白と共役していることが知られていることから、KOR にリガンドが結合すると、その細胞は抑制されることとなる。本実験結果との矛盾について、G 蛋白共役型の特殊なカリウムチャネル (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel : GIRK) もしくは分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase : MAPK) を介することによって *Oprk1* 発現細胞の活性が高まったものと考察している。

第5章では総合考察が展開されている。本研究では、雌ラットにおいて視床下部弓状核に *Oprk1* 発現細胞が存在するものの、それはキスペプチン陽性細胞とは異なること、*Oprk1* 発現細胞は近傍に存在する KNDy 神経細胞より Dyn という情報を受けて活性化し、KNDy 神経細胞に対して負のシグナルを返している可能性が示唆された。

これらの研究成果は、学術上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。