

論文の内容の要旨

論文題目

Neuroendocrinological studies on central actions of estrogen

(生殖機能制御を中心としたエストロジェン中枢作用の

神経内分泌学的研究)

氏名 善方 文太郎

序論

脊椎動物雌の性成熟、排卵、性行動といった生殖機能は、生殖腺と脳が相互作用し、協調的に機能することで制御される。性成熟、排卵は視床下部—脳下垂体—生殖腺(HPG)軸によって調節される。視床下部から生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH1)が GnRH1 ニューロンにより放出され、その作用で脳下垂体から黄体形成ホルモン(LH)、濾胞刺激ホルモン(FSH)が分泌されて生殖腺に作用し、その成熟や排卵を促す。同時に生殖腺からはエストロジェンが分泌され、一部が視床下部にフィードバックし GnRH1 の分泌量を調節する(図1)。一方、性行動は繁殖期や排卵後などの生殖腺の状態に応じて促進/抑制され、発情ホルモンという名の通り、エストロジェンが脳内の性行動制御神経回路の調節に関与すると考えられている。すなわち、エストロジェンは、生殖腺の成熟状態を脳に伝える最も重要な情報伝達因子の一つと言える。しかし、HPG 軸フィードバック調節機構、性行動制御機構へのエストロジェンの入力経路の実態については未解明な点が多く残されている。そこで本研究ではこの点を解明するため、脳および脳下垂体のエストロジェン標的細胞と、それ以降の神経回路を明らかにし、生殖機能の中枢制御機構を解明することを目的とした。

従来の生殖機能制御機構に関する研究は、生殖不全の原因遺伝子などに着目したものが

多く、エストロゲン標的ニューロンは脳内に広く分布するが、解析されているのは一部のみにであった。これを踏まえ、本研究ではエストロゲン受容体(ER)に着目し、脳および脳下垂体に発現する全エストロゲン標的細胞を解析対象とした。遺伝子工学的手法の応用が容易であるメダカを実験動物とし、ER 発現細胞を EGFP 標識したトランスジェニックメダカ系統を樹立することで ER を発現する細胞を可視化し、多角的なアプローチを試みた。

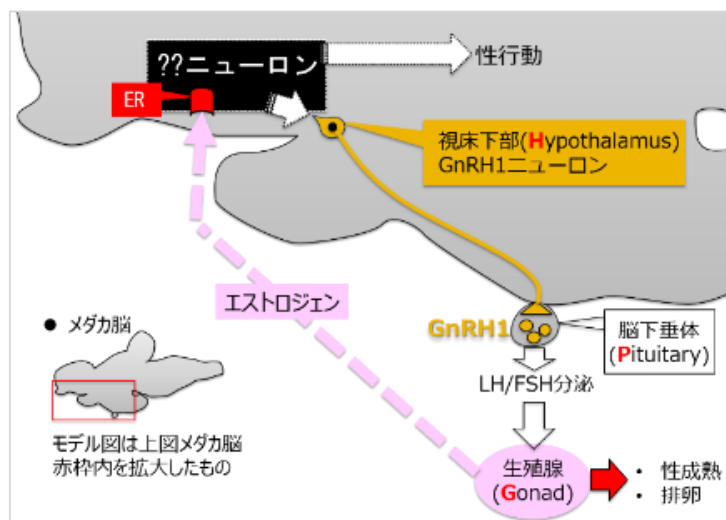


図 1. エストロジェンの生殖機能制御中枢への入力

1章. エストロゲン標的ニューロンの脳内分布解析

エストロゲン標的ニューロンの脳内分布を明らかにするため、*in situ hybridization* 法により ER mRNA の発現分布を解析した。その結果、以下の点が明らかとなった。1) ER 各種サブタイプのうち ER α を発現するニューロン (ER α ニューロン) が最も広い領域に分布 2) Vs, POA, Nppv, NVT 領域が主な ER α ニューロン分布領域 3) POA 領域には特に ER α ニューロンの数が多く、高密度に分布。

過去の知見から、Vs は性行動制御神経回路の重要な要素である可能性が示唆されている。また POA は GnRH1 ニューロンの分布域であり、その他にも脳下垂体へ入力するニューロンの分布が示唆されている。このことから、Vs に発現するニューロンがエストロゲンを受容し、その血中濃度に応じて性行動制御神経回路を調節する可能性、および、POA に発現するニューロンが HPG 軸フィードバック調節機構に血中エストロゲン濃度情報を伝達する機能を担う可能性が考えられた。

そこで、性行動および HPG 軸制御への関与が特に強く示唆された Vs、POA の ER α ニューロンに着目して解析を進めた。

2章. エストロジェンの脳下垂体に対する直接作用の解析

1章に加え、HPG 軸フィードバック制御機構をより詳細に理解するため、脳下垂体 FSH、LH 細胞に対する、エストロゲンの直接作用を解析した。*in situ hybridization* 法により脳

下垂体における ER α の発現分布を解析した。その結果、FSH、LH 細胞がいずれも ER α を共発現することが示唆された。さらに、脳からの制御経路を遮断した *in vitro* 脳下垂体標本を用い、FSH、LH の転写に対するエストロジェンの作用を解析した。その結果、エストロジェンは FSH に対してのみ抑制作用を示し、LH には作用しないことが示唆された。

このことからエストロジェンは FSH に対して直接的にネガティブフィードバック様の作用を示し、一方で、過去の *in vivo* エストロジェン投与実験と合わせ、LH に対しては主に視床下部の神経回路を介したポジティブフィードバック作用を示すことが示唆された。これら異なる機構が協調的に機能することで FSH、LH がそれぞれに異なる、適切なタイミングで分泌され、濾胞の発育や排卵を制御することが示唆された。

3. エストロジェン標的ニューロンの形成する神経回路解析

ER α :EGFP トランスジェニックメダカ系統を作出し、Vs、POA に分布する ER α ニューロン（以下 Vs-ER α ニューロン、POA-ER α ニューロン）からの出力に着目して、それらの神経軸索投射、神経伝達物質について、細胞レベルで解析した。

エストロジェン標的ニューロンの軸索投射解析

EGFP により可視化された ER α ニューロン軸索投射を形態学的に解析した結果、Vs-ER α ニューロンは延髄へ投射し、POA-ER α ニューロンは GnRH1 ニューロンの細胞体付近および脳下垂体へ投射することが示唆された。また、脳下垂体に POA-ER α ニューロン由来と思われる軸索が投射していた。

この結果より、Vs-ER α ニューロンが延髄において性行動に関わる神経回路を制御する可能性、POA-ER α ニューロンが GnRH1 ニューロンを介して、HPG 軸フィードバック調節に関与する可能性が示唆された。

エストロジェン標的ニューロン投射先に関する形態学的解析

以上の結果をうけ、GnRH1 ニューロンおよび脳下垂体 LH、FSH 細胞に対する POA-ER α ニューロンの軸索投射先の細胞について詳細な形態学的解析を行った。

ER α :EGFP トランスジェニックメダカの脳内において、*gnrh1* あるいは *lhb*、*fshb* の mRNA を *in situ hybridization* 法により標識した(図 2)。その結果、POA-ER α ニューロンが GnRH1 ニューロン細胞体に直接軸索投射すること、さらに一部の POA-ER α ニューロン軸が脳下垂体 LH、FSH 細胞近傍に軸索投射することが明らかとなった。

エストロジェン標的ニューロンの神経伝達物質候補

次に、POA-ER α ニューロンの正体を突き止めるため、代表的な神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) やグルタミン酸を伝達物質としてもつ可能性を検討した。*era* と、GABA またはグルタミン酸のマーカー遺伝子の mRNA を二重 *in situ hybridization* 法で標識して検討した結果、多数の POA-ER α ニューロンでグルタミン酸共発現が認められ、GABA についても一部で共発現が認められた。これより、グルタミン酸・GABA 作動性の POA-ER α ニュー

ーロンが GnRH1 ニューロンもしくは LH、FSH 細胞を制御する可能性が示唆された

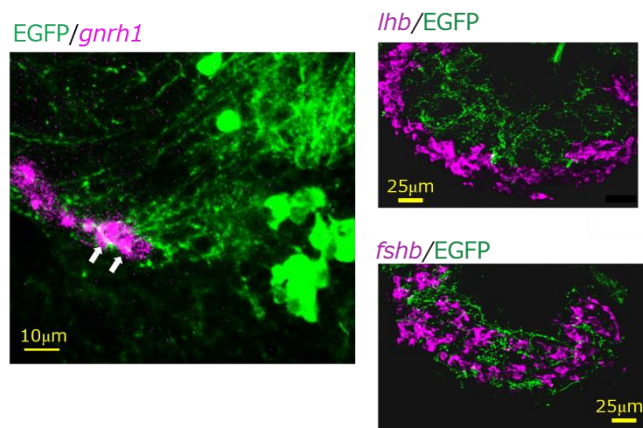


図 3. GnRH1 ニューロン, LH 細胞, FSH 細胞に対する ER α ニューロン軸索投射

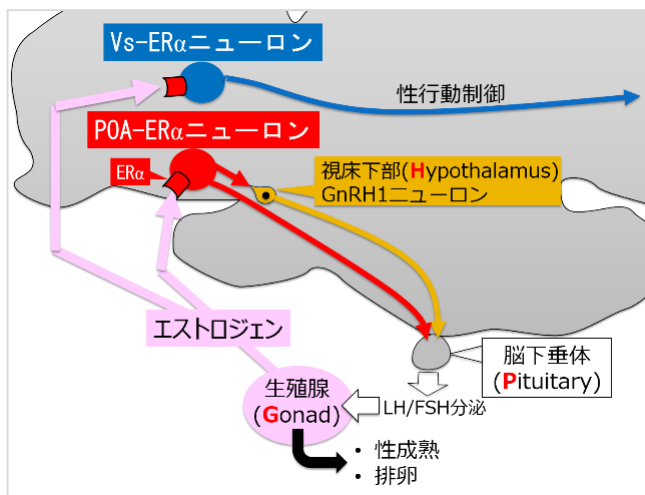
結論

1) エストロゲン受容から HPG 軸中枢制御機構までを繋ぐ新たなフィードバック調節回路の可能性を示唆。

POA-ER α ニューロンが血中エストロゲン濃度に応じて直接 GnRH1 ニューロンを制御する、HPG 軸フィードバック調節の担い手であるという新たな可能性が示唆された (図 4. 赤で示した経路)。また、FSH に対するエストロゲンの直接作用の解析により、FSH、LH が異なる経路からのエストロゲンフィードバック制御を受けることを示唆した (図 4. 緑で示した経路)。POA-ER α ニューロンがグルタミン酸・GABA 作動性である可能性も見いだしたが、さらに他の神経伝達・修飾物質の関与の可能性も検討することで、POA-ER α ニューロンによる HPG 軸制御機構の解明に近づくと期待される。

2) エストロゲンの受容から性行動制御までを繋ぐ経路を示唆。

本研究より、Vs-ER α ニューロンがエストロゲン濃度に応じて性行動を制御する神経回路調節の重要な鍵を握っている可能性を新たに見いだした。



以上、本研究より、未解明な点の多かった、脳内におけるエストロゲン受容から HPG 軸フィードバック調節機構および性行動調節までを繋ぐ未知の経路の正体に関して、新たな形態学的知見が得られ、今後の機能的解析に繋がる基礎を構築することができた。

図 4. 本研究の結論