

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成13年度博士課程 入学

氏 名 藤岡 仁美

指導教員名 西原 眞杉

論文題目 性腺刺激ホルモン放出ホルモン神経系の形成機構に関する研究

ほ乳類の生殖機能は中枢神経系により高度に制御されており、その制御の要となるのが性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンである。GnRH ニューロンの発生には興味深い特徴がある。ほ乳類では、GnRH ニューロンは発生期の嗅板で初めて検出される。これら細胞は前脳向かって遊走・侵入し、視索前野視床下部前部に移動してネットワークを形成するとともに、正中隆起を含む投射領域に軸索を伸ばす。

本研究では、胎生後期の GnRH ニューロン系のネットワーク形成期に着目した。GnRH ニューロンの性質や機能を修飾する因子について多数の報告があるが、発生後期の視床下部に移動し神経回路を形成している時期の GnRH ニューロンの性質に関する報告は少ない。中枢神経系外より移動して来た GnRH ニューロンと中枢神経系の細胞がネットワークを形成する過程を調べることは、発生期や性成熟前における GnRH の役割や性成熟後の GnRH 系の制御機構を理解する上でも有用であると考えられる。また、GnRH 系の回路形成や制御に関わる因子やその作用機序を調べることは、視床下部性腺機能低下症の発現機序の解明にも貢献するものと考えられる。本研究では、まず、GnRH ニューロンを簡便に識別できる実験系の確立を目指した。続いて、中枢神経系の細胞による GnRH ニューロンの機能制御系として γ -アミノ酪酸 (GABA) による GnRH の転写活性制御についての検討を、GnRH ニューロンの形態変化制御系として神経突起伸長に関与する因子とその作用

機序に関して検討を行った。

第一章では、GnRH ニューロンを簡便に識別可能な実験系の構築を目指し、ラット GnRH 5' 端転写制御領域に蛍光タンパク質である Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子を繋いだ組み換え DNA (pGnRHpro-EGFP) を作成し、in vitro での GnRH ニューロンの可視化を試みた。まず、組み換え DNA の EGFP タンパク質合成能及び細胞種特異性を検討するため、GT1-7 (マウス GnRH ニューロン由来株化細胞) 及び C-6 (ラットグリア細胞腫由来非 GnRH 産生株化細胞)、CHO-K1 (チャイニーズハムスター 卵巣由来 GnRH 産生株化細胞)、JEG-3 (ヒト胎盤絨毛上皮腫由来 GnRH 産生株化細胞)へ、リポソーム法を用いて一過性遺伝子導入を行った。その結果、齧歯類由来の GnRH 産生細胞である GT1-7 と CHO-K1 特異的に EGFP を発現することが示された。続いて、胎齢 17.5 日のラット視床下部初代分散培養細胞への組み換え DNA の一過性遺伝子導入を行い、その有用性について検討した。導入遺伝子として、pGnRHpro-EGFP と CMV プロモーターにより細胞種非特異的に EGFP が発現する pEGFP-N1 を用いた。その結果、pEGFP-N1 では EGFP 陽性細胞が確認されたが、pGnRHpro-EGFP では確認されなかった。この差異の原因はリポソーム法による神経系細胞への遺伝子導入効率の低さと、初代培養細胞に占める GnRH ニューロンの数の少なさのためと考えられる。本実験の結果から、少数の細胞種で発現が期待される組み換え DNA の一過性導入は困難であるが、組み換え DNA の発現が期待される細胞種が多数を占める場合はこの実験系は有用であることが示唆された。

第二章では、個体レベルでの GnRH ニューロン解析モデルとして、GnRHpro-EGFP 組み換え DNA を用いてトランスジェニック (TG) ラットの作出を行った。この TG ラットの GnRH ニューロンに於ける導入遺伝子発現の特異性を検討した結果、GnRH 免疫陽性 (ir) 細胞の約 76% で EGFP が発現していた。一方、GnRH-ir 細胞外では、EGFP の蛍光は観察されなかった。この結果は、用いた組み換え遺伝子が第一章における in vitro の実験と同様の細胞種特異性を持って機能していることを示すものである。また、EGFP の発現量は GnRH 遺伝子転写活性を反映すると考えられることから、EGFP が観察されない GnRH ニューロンが存在することは、GnRH ニューロンが転写活性の異なる多様な細胞集団から構成されていることを示唆している。本 TG ラットでは EGFP が GnRH ニューロンに局在し、比較的弱いレベルで発現していることから、GnRH 遺伝子転写活性を解析するモデルとして有用であることが期待された。

第三章では、GnRH ニューロンのネットワーク形成期の GnRH 遺伝子制御系として、胎生後期の GnRH 遺伝子発現への GABA の作用を検討した。まず、胎齢 18.5 日のラットの脳組織を用いた免疫組織化学的実験により、GnRH ニューロンの存在する領域で広くグルタミン酸脱水素酵素 (GAD) 67 免疫陽性細胞が見られ、また GABA-A 受容体、GABA-B

受容体免疫陽性の GnRH ニューロンが存在することが明らかとなった。次に、胎齢 18.5 日 TG ラット視床下部初代培養を用いて、GABA の GnRH 遺伝子発現に対する影響を観察した。その結果、GABA とムシモール (GABA-A 受容体作動薬) 処置により、EGFP 陽性細胞数/GnRH-ir 細胞数の比率が上昇することが示された。この結果は、GABA が胎仔 GnRH ニューロンに対して、GABA-A 受容体を介して GnRH 遺伝子発現を上昇させることを示すものである。これらの *in vivo* と *in vitro* の結果から、胎生後期の視床下部では、GABA ニューロンにより産生された GABA が GnRH ニューロンでの GnRH の産生を促進する方向に働いていることが示唆された。近年、神経細胞の増殖や移動、生存に GABA が重要な役割を果たしているという報告がなされている。一方、GnRH は海馬錐体細胞を脱分化させることが報告されている。これらのことから、GABA は GnRH ニューロンの生存を維持するとともに、GnRH の合成、分泌を促進することで、回路上 GnRH ニューロンの下流に存在する GnRH 受容体を持つ細胞の活動や生存にも影響を与えていると考えられる。

第四章では、GnRH 神経回路形成期の GnRH ニューロンの神経突起伸長に注目し、関与する因子及び細胞内シグナル伝達経路について検討した。胎齢 18.5 日ラット視床下部初代培養を用いて、GnRH ニューロンの神経突起伸長に対する GABA、GnRH、インスリン様成長因子 (IGF)-1、及び繊維芽細胞成長因子 (FGF)-2 の影響を調べた。その結果、FGF-2 の処置では有意に神経突起が伸長し、IGF-1 処置では伸長する傾向が観察された。一方、GABA 及び GnRH の処置では神経突起伸長に影響は見られなかった。次に、FGF ファミリーの一員である FGF-8 の GnRH ニューロンの神経突起伸長への影響を調べた結果、FGF-2 と同様に FGF-8 も神経突起伸長を促進することが示された。この結果は、FGF-2 以外の FGF も GnRH ニューロンの神経突起伸長に関与している可能性を示すものである。更に、PD98059 (MEK 阻害薬) の前処理により FGF による神経突起伸長効果が減弱されたことから、MEK/ERK 経路が FGF による GnRH ニューロンの神経突起伸長に関与することが示唆された。

本研究では GnRH ニューロンの解析モデルとして、GnRH-EGFP TG ラットを作出した。この TG ラットの視床下部初代分散培養系を用いることで、GnRH ニューロンの株化細胞である GT1 より、より生体に近い GnRH ニューロンに於ける GnRH の転写活性を簡便に解析することが可能となった。この実験系は、生体に近い状態の GnRH ニューロンに於ける GnRH 遺伝子転写の修飾や制御を検討する有用なツールとなりうる。次に、本研究では、GnRH ネットワーク形成期における、GnRH ニューロンの機能制御を行う系と GnRH ニューロンの形態変化を制御する系について検討した。第三章では、GnRH ニューロンの機能制御の系として、胎生後期の GnRH 遺伝子発現への GABA の作用を検討した。その結果、胎生後期の視床下部では、GABA により GnRH ニューロンでの GnRH 転写活性が上昇

し、GABA が GnRH ニューロンの生存や回路形成に関与していることが示唆された。第四章では GnRH ニューロンの形態変化を制御する系として神経突起伸長に注目し、関与する因子及び細胞内シグナル伝達経路について検討した。その結果、チロシンキナーゼ型受容体 (TKR) をもつ FGF や IGF-1 神経突起の伸長が観察された。一方、興味深いことに、GnRH の転写制御に関与した GABA は神経突起伸長には変化を与えなかった。この結果は、GnRH ニューロンの神経突起伸長は TKR を介する修飾の寄与が大きい一方、脱分極刺激の修飾は小さいことを示すものである。本研究の結果、TKR を介するシグナルは GnRH ニューロンの形態変化に、脱分極シグナルは GnRH 転写制御を含む機能的制御に関与している可能性が示された。脱分極刺激が形態変化を促進することが報告されている神経モデルもあることから、これらの結果を更に吟味することで、各ニューロン系特異的なネットワーク形成機構の特徴が更に明らかになることが期待される。更に、本研究で上げられた因子や細胞内シグナル伝達経路の精査は、視床下部性腺機能低下症の発現機序の解明にも貢献するものと考えられる。