

論文内容の要旨

論文題目

Neuroendocrinological studies of kisspeptin neurons in the sex steroid feedback
(性ステロイドフィードバック機構を形成するキスペプチンニューロンの神経内分泌学的研究)

氏名 神田 真司

序論

脊椎動物において生殖機能を制御する視床下部 GnRH ニューロンの発見から 30 年経った。しかし、その後の研究から、GnRH ニューロンは、正常な生殖腺機能に必須で、生殖腺からのステロイドフィードバック信号を受け取るエストロゲン受容体 α を発現していないことが明らかになった。そこで、エストロゲン受容体 α を発現し、GnRH ニューロンの GnRH 分泌を促す他のニューロンの存在が予想されてきたものの、その実体は長年不明であった。近年の哺乳類を用いた研究から、新規ペプチドキスペプチン (遺伝子は *kiss1*) を伝達物質として分泌するキスペプチンニューロンがその役割を担っている可能性が示唆されている。ヒト、マウスにおいてキスペプチン受容体の欠損で春機発動が起こらなくなることも明らかとなり、生殖機能に必須な要素としてキスペプチンニューロンは現在神経内分泌学分野で大きな注目を浴びている。そこで私はこのような機構が哺乳類以外を含めた脊椎動物全般を通して普遍的に存在するのかという問題点や、種間での共通点、相違点の比較を通して性ステロイドフィードバック機構におけるキスペプチンニューロンの一般的役割を知りたいと考えた。一方、脊椎動物を通じて視床下部外にも GnRH ニューロンが存在し、それらは神経修飾作用をもつとされている。それら視床下部外 GnRH ニューロン機能の調節に対する関与も検証することにより、私はキスペプチンニューロンの GnRH 系に対する関与を包括的に

解析することとした。そのため、視床下部内外に存在する3種類のGnRH系が形態学的・機能的に最も明瞭に同定可能な硬骨魚類がこれらの目的を達成するために有用であると考え、中でもトランスジェニック技術が応用可能なメダカを用いて研究を開始した。

第一章.メダカにおける性ステロイドフィードバック

ゲノムデータベースを用いたシクエンシー解析により、硬骨魚類の生殖腺刺激ホルモン遺伝子のうち、*LH β* 遺伝子は、四足動物の*LH β* 遺伝子と異なる遺伝子座を持ち、ゲノム構造に大きな違いがあることが示唆された。このことから、硬骨魚類*LH β* は四足動物とは異なる発現制御を受けていることが予想された。実際、*LH β* と *FSH β* が四足動物で同一細胞で共発現しているのに対し、硬骨魚類では別の細胞で発現していることを *in situ* hybridization (ISH) で示した。さらに、性ステロイドフィードバック機構の様式に関して、詳細な解析を行った。硬骨魚類における性ステロイドフィードバック機構の報告は多くないため、まず、メダカの生殖腺刺激ホルモンである LH, FSH の発現がどのように性ステロイドによって制御されるのかを、卵巣除去およびステロイド投与個体の LH, FSH 遺伝子発現を比較することによって検証した。その結果、*LH β* は卵巣由来のステロイドによって発現促進を受け、逆に *FSH β* は抑制を受けることが明らかとなった(図1)。したがって、メダカでは性ステロイドの低い状態では FSH が分泌されて生殖腺の成長が促され、成熟が進み、卵巣の性ステロイドの分泌が盛んになるにつれ、FSH 分泌は減少、ポジティブフィードバックによって LH 分泌が促進されることによって LH サージを引き起こすというメカニズムが示唆され、メダカは双方のメカニズムを下垂体レベルで解析できる極めて有用な実験動物であることが明らかとなった。

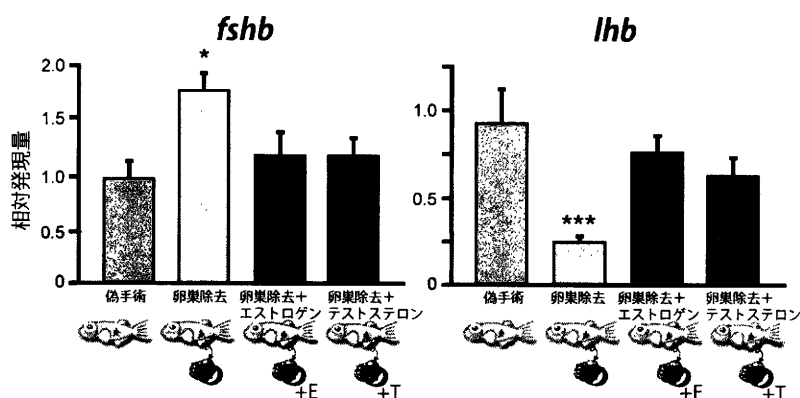


図1. メスのメダカにおいて、*FSH β* の発現は、卵巣由来の性ステロイドによって抑制され、*LH β* は促進されている。したがって、メダカはネガティブ、ポジティブフィードバックの双方を下垂体レベルで解析できる極めて有用な実験動物であることが明らかとなった。E, estrogen; T, 11-ケトテストステロン。

第二章. *kiss1* 遺伝子発現の特徴

次に、魚類キスペプチン遺伝子のクローニングを行った。種間で保存性の高いC末端10残基を元に相同性検索等を通してクローニングを試みたところ、ゼブラフィッシュ、メダカで二種類のキスペプチン類似配列がゲノムデータベース上で発見された。シクエンシー解析を行ったところ、片方にのみ哺乳類のキスペプチンとのシクエンシー関係が認められ、こちらが魚類における *kiss1* 遺伝子であることが明らかとなった。一方、シクエンシー関係の認められなかった遺伝子に関しては、*kiss2* 遺伝子と名付けた。

kiss1 の ISH を行ったところ、*kiss1* ニューロンは視床下部では NVT, NPPv と呼ばれる神経核と視床下部外の手網核に発現が局在することがわかった。これらのニューロンのステロイドフィードバックへの関与を検証するため卵巣除去手術を行ったところ、NVT の *kiss1* ニューロンのみが卵巣由来のエストロゲンによって発現を促進されることが明らかとなった(図2)。すなわち、卵巣が十分に成熟し、第一章で示したようにエストロゲンの発現が高く *LH β* の発現が促進される際に、エストロゲン受容体 α を発現する NVT の *kiss1* ニューロンが発現を強く促進されていることが明らかとなった。

第三章 . *kiss2* 遺伝子発現の特徴

ゼブラフィッシュ, キンギョを用いた他の研究室の結果から, *kiss1* のパラログ遺伝子である *kiss2* の転写産物, Kiss2 もキスペプチン受容体に対して Kiss1 に遜色ない活性を示すことが明らかとなったため, Kiss2 についても ISH 法を用いて, ステロイド感受性, 生殖・非生殖状態における発現変動の解析を行った。その結果, *kiss2* ニューロンは視床下部 NRL に局在すること, NVT の *kiss1* ニューロンとは異なり, ステロイド感受性, 生殖・非生殖状態における発現変動を一切示さないことが明らかとなった。また, 視床下部外に存在する手綱核の *kiss1* ニューロンについても同様の解析を行ったが, こちらも発現変動を一切示さなかった。さらに, 二重 ISH 法を用いて *kiss1*, *kiss2* ニューロンがエストロゲン受容体 α を共発現する可能性を検証したところ, NVT の *kiss1* ニューロンのみがエストロゲン受容体 α を発現していることが明らかになった。これは, 卵巣除去実験により証明された NVT の *kiss1* 遺伝子発現のステロイド感受性と整合し, メダカキスペプチンニューロンの中で, NVT *kiss1* ニューロンのみがポジティブフィードバックに関与することが示唆された。

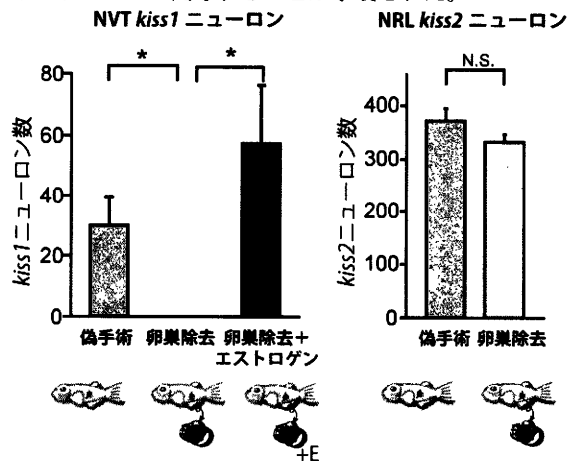


図 2. 脳内に複数存在するキスペプチンニューロンのうち, NVT に局在する *kiss1* ニューロンのみが, ステロイド感受性を示した。また, NVT *kiss1* ニューロンの制御は, エストロゲン受容体 α を介していることが示唆された。

第四章 . Kiss1 による GnRH ニューロン制御機構

次に, ステロイドフィードバックに関与することが明らかになった Kiss1 ニューロンの免疫組織化学を行った。抗体の特異性は, 吸収試験, および ISH 法との二重標識で確認した。その結果, Kiss1 免疫陽性線維は脳内で視床下部および視索前野, 終脳腹側野といった, 生殖機能の制御に関与するとされる部位のみに投射していることが明らかとなった。視床下部外手綱核の Kiss1 ニューロンは, 手綱核のニューロンが半屈束を經由して脚間核に投射するという従来からの知見通り, 脚間核にのみ投射することが明らかとなり, 手綱核の Kiss1 ニューロンは生殖に関与しないことが示唆された。二重免疫組織化学によって, NVT Kiss1 ニューロンの GnRH1,2,3 ニューロンへの投射を検証したところ, 生殖機能を制御する GnRH1 ニューロンのみに投射が確認され, 神経修飾作用を司る GnRH2,3 ニューロンへは全く投射が認められなかった。

次にキスペプチン受容体を 2 種類クローニングし, 分子系統的な解析から, 脊椎動物に存在する *kissr1,2,3,4* のうち, *kissr2,4* に相当することが判明した。メダカ以外の硬骨魚類でも二種類の受容体が確認された。これらの cDNA を用いて ISH を行ったところ, Kiss1 免疫陽性線維の確認された視床下部, 視索前野, 終脳腹側野にのみキスペプチン受容体の発現が確認された。Kiss1 免疫陽性線維投射と同じく, GnRH1 ニューロン近傍にのみキスペプチン受容体の発現が見られた。

二重 ISH 法で解析したところ, GnRH1 ニューロン自体はキスペプチン受容体を発現していないが, 非常に近傍のニューロンがキスペプチン受容体を発現していることが明らかとなった。そこで, キスペプチンが局所所在ニューロンを介して GnRH ニューロンを制御している可能性が示唆された。

結論

メダカにおいて複数存在するキスペプチン遺伝子、およびキスペプチンニューロン群のうち、NVTに局在する Kiss1 ニューロンのみが生殖に必須と言われているエストロゲン受容体 α を発現し、卵巢由来のエストロゲンによって Kiss1 発現を促進されていることから、これらがエストロゲンポジティブフィードバックに関与することが強く示唆された。また、キスペプチンニューロンは、GnRH ニューロンの中でも生殖機能を制御する GnRH1 ニューロンのみに投射し、介在ニューロンを介してそれを制御することが示唆された (図 3)。

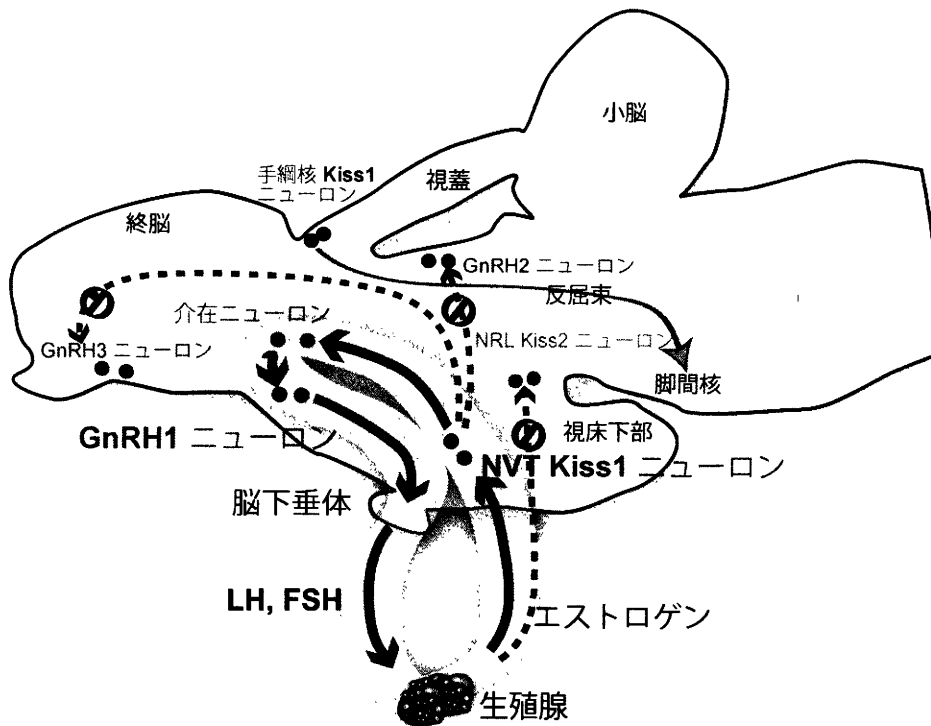


図 3. 視床下部 NVT Kiss1 ニューロンは、生殖腺が放出するエストロゲン濃度の上昇を受け、介在ニューロンを介して GnRH1 ニューロンの GnRH 放出を促進することにより、性ステロイドによる生殖調整の正のフィードバックを形成する。神経修飾を司る GnRH2 および GnRH3 ニューロンへの入力は認められない。一方、Kiss2 ニューロンは、ステロイド感受性を示さず、ステロイドフィードバックへの寄与の可能性は極めて低い。手網核 Kiss1 ニューロンは、反屈束を経て脚間核に投射し、生殖機能以外の機能を司っていることが示唆される。