

【背景】

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)/luteinizing hormone (LH) のパルス状分泌は卵胞発育に不可欠であることが知られている。GnRH/LH パルスの分泌異常は、多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome; PCOS) や体重減少性無月経などの疾患において見られることから、女性の月経異常や不妊症などに関連していると考えられている。

脳内の視床下部弓状核に発現している kisspeptin ニューロンは、強力な GnRH 分泌促進物質であり、エストロゲン受容体を発現していることから、エストロゲンのネガティブフィードバックのターゲットであることが明らかとなっている。また、kisspeptin ニューロンは、神経ペプチドである neurokinin B (NKB) と dynorphin A (DynA) を共発現していることから、KNDy ニューロンとよばれている。KNDy ニューロンに関して、NKB は kisspeptin 分泌を促進させ、DynA は kisspeptin の分泌を抑制することから、NKB と DynA の自己分泌・傍分泌作用により kisspeptin 分泌を同期させることで GnRH/LH パルスジェネレーターとして機能する可能性が示唆されている。

神経ペプチドは、細胞体で合成、修飾された後、分泌小胞を形成し、軸索へと運ばれ、軸索末端より分泌される。3 種類の神経ペプチドを含む KNDy ニューロンにおける分泌小胞内での局在様式は明らかになっておらず、本研究では、免疫電子顕微鏡法を用いて雌ラットにおけるこれらの局在様式を解析することを目的とした。

【方法】

実験には、細胞体と軸索の染色が最も強かった発情休止期レベルのエストロゲンを投与した動物を使用した。Wistar-Imamichi 系の成熟した雌ラットを正常な性周期を膣細胞診で確認した後に、エストロゲンレベルを一定にするために、卵巣摘出した後、直ちに β -estradiol を含む溶液を充填させたチューブを留置し、10~13 日後に実験に使用した。蛍光免疫染色では、4% パラホルムアルデヒド(PFA) 溶液で灌流固定した後、脳を取り出し、40 μ m の脳切片を作成した。anti-kisspeptin 抗体、anti-NKB 抗体、anti-DynA 抗体を用いて、kisspeptin と NKB、kisspeptin と DynA、NKB と DynA について、それぞれ二重染色を行った。

免疫電子顕微鏡法においては、4% PFA と 0.5% グルタルアルデヒドの混合固定液で灌流固定した後、50 μ m の脳切片を作成した。KNDy ニューロンを含む視床下部弓状核部分及び軸索終末の観察される正中隆起領域を分離し、脱水、エポキシ樹脂に包埋後、80 nm の超薄切片を作製した。超薄切片上で kisspeptin、NKB、DynA の各抗体と金コロイド標識二次抗体を用いた包埋後免疫反応法を行い、透過電子顕微鏡で観察した。包埋後二重免

疫反応法では、異なる大きさの金コロイド標識二次抗体を用いて免疫反応を行い、透過電子顕微鏡を用いて観察した。

【結果】

KNDy ニューロンを含む視床下部弓状核において二重蛍光染色を行ったところ、kisspeptin と NKB、kisspeptin と DynA、NKB と DynA のそれぞれの二重染色において、大多数の細胞が共発現しているのが観察された。

免疫電子顕微鏡法にて、kisspeptin、NKB、DynA をそれぞれ単染色したところ、すべての神経ペプチドに関して弓状核から正中隆起にかけて、金コロイド標識された分泌小胞を含む軸索の断面が散見された。包埋後二重免疫反応法では、弓状核から正中隆起にかけて、kisspeptin と NKB、kisspeptin と DynA、NKB と DynA のそれぞれが、同一軸索内の別々の分泌小胞に独立して存在していることが観察された。

同様の結果が細胞体でも観察され、KNDy ニューロンの細胞体から軸索にかけて、3つの神経ペプチドは別々の分泌小胞に独立して存在していることが確認された。

【考察】

3つの神経ペプチドが異なる分泌小胞に存在することから、それらが性ステロイドやストレス、栄養状態といった環境の変化によって、個々に生成、放出されている可能性が示唆された。また、3つの神経ペプチドが個々に制御されている可能性があることから、まずNKBが優位に生成されることによってkisspeptinの生成が促進されてパルスが立ち上がり、続いてDynAが優位に生成されることによってkisspeptinの生成が抑制されてパルスが収束することでGnRH/LHパルスが形成されている可能性が考えられた。

本研究はKNDyニューロンの3つの神経伝達物質が別々の分泌小胞内に存在し、異なる機序で生成、放出調節されている可能性を示唆する初めての報告であり、GnRH/LH分泌機構やその異常が起因となっておこる月経異常や不妊症などの病態生理を解明する上で極めて有用な知見といえる。