

論文審査の結果の要旨

Immunoelectron microscopic observation of the subcellular localization of kisspeptin, neurokinin B and dynorphin A in the KNDy neuron of the female rat

雌ラット視床下部 KNDy ニューロンにおける kisspeptin, neurokinin B, dynorphin A の局在に関する免疫電子顕微鏡観察

日本医科大学大学院医学研究科 女性生殖発達病態学分野

大学院生 村川 裕子

Neuroscience Letters 第 612 巻 2016 掲載

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。脳内の視床下部弓状核に発現している kisspeptin ニューロンは、GnRH 分泌調節制御に深く関わり、GnRH/LH パルス生成に重要な役割を果たしていると考えられる。弓状核の 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 ニューロンとも呼ばれている。これらの神経ペプチドは、細胞体で合成後、分泌小胞を形成し軸索末端より分泌されるが、神経ペプチドの分泌小胞内局在様式は明らかになっていない。そこで、申請者は免疫電子顕微鏡法を用いてラットにおけるこれらの局在様式の解析を行なった。

エストロゲンレベルを一定にするために、卵巣摘出した Wistar-Imamichi 系の成熟した雌ラットの皮下にエストラジオール充填チューブを留置した。特異的な抗 kisspeptin 抗体、抗 NKB 抗体、抗 DynA 抗体を用いて、kisspeptin と NKB、kisspeptin と DynA、NKB と DynA について、それぞれ二重蛍光免疫染色を施した。また、KNDy ニューロンを含む視床下部弓状核部分及び正中隆起領域をピンポイントに選択し、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電子顕微鏡法を行い、透過電子顕微鏡を用いて観察した。

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様子が観察された。さらに、免疫電子顕微鏡法にて、弓状核から正中隆起にかけて金コロイド標識された 3 種の神経ペプチドを含む分泌小胞が散見された。包埋後二重免疫電子顕微鏡法では、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超微細構造のレベルにおいて確認された。

2 次審査では、3 つの神経ペプチドが別個の分泌小胞に存在することの GnRH/LH パルス形成への意義、PCOS などの病態形成における KNDy ニューロンの機能変化、KNDy ニューロンの機能調節に関わる因子、免疫電子顕微鏡法の技術的な問題などに関して質疑がなされ、それぞれの確かな回答を得た。

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、KNDy ニューロンの 3 つの神経ペプチドのソーティングと分泌制御という細胞生物学的な重要な問題だけではなく、GnRH/LH 分泌機構やその異常に起因す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。よって学位論文として十分価値のあるものと認定した。