

論文内容の要旨

Expression of hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin A neurons attenuates in female Zucker fatty rats

Zucker fatty 雌ラットにおける視床下部キスペプチン、ニューロキニン B、ダイノルフィン A の発現に関する組織細胞化学的解析

日本医科大学大学院医学研究科 女性生殖発達病態学

大学院生 中尾 仁彦

Neuroscience letters 第 665 巻 135-139 頁 2 月 5 日(2018) 掲載

【背景】

性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) および黄体形成ホルモン (LH) のパルス状分泌は、雌において卵胞発育に重要であり、視床下部弓状核にあるキスペプチン、ニューロキニン B (NKB)、ダイノルフィン A (DynA) が共局在する KNDy ニューロンに制御されていると広く認識されるようになってきた。一方、排卵に関わる LH サージは、視床下部前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンが GnRH を介して関与していると考えられている。生殖機能と栄養状態は密接に関与しており、例えば、肥満女性では月経周期異常や不妊症を呈することが報告されている。本研究では、この肥満による生殖機能異常に視床下部のキスペプチンニューロンが関わっているのではないかと仮説を立てた。肥満モデルラットのひとつとして知られている Zucker fatty ラットはレプチン受容体異常を有し、高レプチン血症にもかかわらず、過食と肥満を示す。レプチンは脂肪細胞から分泌され、エネルギー貯蓄の充足を脳に伝えるアディポサイトカインであるが、肥満女性においても血中レプチン濃度が高いことが報告されている。Zucker fatty ラットは不妊であることが知られており、LH パルスは抑制されていることが報告されている。一方、Zucker fatty ラットにステロイドホルモンを投与すると LH サージは誘発されることが明らかとなっている。本研究では、Zucker fatty 雌ラットを用いて、パルス状分泌に関わる弓状核の KNDy ニューロン及び LH サージに関わる前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンの発現を組織化学的解析手法により検討することを目的とした。

【方法】

7 週齢の Zucker fatty および対照群として lean 雌ラットを使用した。発情周期が正常であるかを検討するために膣細胞診で確認した。内因性エストロゲンの濃度差の影響を除去するため 10 週齢で卵巣除去し、発情休止期の血漿エストラジオール (E₂) 濃度になるように E₂ チューブの皮下に埋め込んだ。1 週間後、麻酔下で採血を行った後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。採取した脳は浸漬固定し、50 μ m 凍結切片を作成した。弓状核の *Kiss1*、*Tac3*、*Pdyn* (それぞれキスペプチン、NKB、DynA をコードする遺伝子) と前腹側室周囲核の *Kiss1* を *in situ hybridization* 法で、弓状核のキスペプチン、NKB、DynA と前腹側室周囲核のキスペプチンおよび視索前野の GnRH を免疫組織化学法で可視化し、細胞数を計測した。血漿 LH 濃度はラジオイムノアッセイ法により 2 連で測定した。

【結果】

発情周期は Zucker lean ラットではおよそ 4 日周期で正常な周期が見られたが、Zucker fatty ラットでは発情休止期が有意に長く、5 日以上の不整な周期を示した。卵巣除去し、E₂ チューブの皮下投与により E₂ 濃度を一定にした後でも、Zucker fatty ラットでは Zucker lean ラットと比べ、血漿 LH 濃度が有意に低下していた。弓状核の KNDy mRNA (*Kiss1*、*Tac3*、*Pdyn*) およびペプチド (キスペプチン、NKB、DynA) の発現は、Zucker fatty ラットでは Zucker lean ラットと比較してすべて有意に減少していた。しかし、前腹側室周囲核の *Kiss1* の発現細胞数に両群で有意差は見られず、キスペプチン免疫陽性細胞は両群共にほと

んど検出されなかった。視索前野の GnRH 免疫陽性細胞数は両群で有意差は見られなかった。

【考察】

弓状核 KNDy ニューロンの mRNA とペプチドがともに減少していることから、レプチン受容体異常による肥満において、KNDy ニューロンは転写の段階から抑制を受けていることが示唆された。前腹側室周囲核の *Kiss1* と視索前野の GnRH に有意差は見られなかったことから、レプチン受容体異常でもポジティブフィードバック機構は維持されており、高濃度のエストロゲンにより LH サージを誘起することが可能であると考えられた。両群において前腹側室周囲核のキスペプチン免疫陽性細胞が検出されなかったのは、本実験では、発情休止期レベルの E₂ (低濃度 E₂) を投与していたため、E₂ のポジティブフィードバックを受ける前腹側室周囲核キスペプチンニューロンにおいては mRNA は発現するものの、翻訳までされる効果量には達していなかったと思われる。以上のことから、レプチン受容体異常は弓状核の KNDy ニューロンを抑制することにより、GnRH および LH パルスが抑制され、結果的に発情周期の異常および妊孕性の異常をもたらすと考えられた。これらの結果から、レプチン異常を伴う肥満による生殖機能の低下には、弓状核の KNDy ニューロンが関わっている可能性が示唆された。

(1741 文字)

学位申請者の担当部分についての報告書

着想

申請者は、日本医科大学 大学院医学研究科 解剖学・神経生物学分野 小澤一史 大学院教授と岩田衣世講師より、「レプチン受容体異常肥満の視床下部キスペプチン、ニューロキニン B、ダイノルフィン A の発現への影響」という研究課題を受けた。申請者は、肥満と生殖機能低下の関連性を調べるに伴い、レプチンおよびレプチン受容体と生殖機能の関係についての文献を調べ、小澤大学院教授および岩田講師の御指導・御協力を得て、適切なモデル動物およびその週齢を決定し、入手した。

実験とデータ収集

申請者は、小澤大学院教授の総括指導および岩田講師の直接指導のもと、以下を行った。対象動物の膣細胞診による発情周期の確認、麻酔、性腺除去、エストラジオール含有シリコンチューブの皮下埋め込み、頸静脈採血、還流固定、脳摘出、凍結切片の作成、*in situ* hybridization 法、免疫組織化学、光学顕微鏡を用いた撮影・細胞数計測、結果の統計解析を行った。ラジオイムノアッセイ法によるホルモン濃度測定は岩田講師の御協力のもと行った。

論文の作成

小澤大学院教授、岩田講師及び女性生殖発達病態学 竹下俊行大学院教授の御指導・御協力のもと、申請者は論文の執筆、図表の作成を行った。小澤大学院教授に *corresponding author* を担当していただき、英文校閲は専門的知識を有する英文校正者に依頼した。論文の投稿に際しては、全ての共著者の確認と承認のあと、提出した。