

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Hypothalamic KNDy Neuron Expression in Streptozotocin-induced Diabetic Female Rats

ストレプトゾトシン誘発糖尿病雌ラットにおける
視床下部 KNDy ニューロンの発現に関する研究

日本医科大学大学院医学研究科 脳神経外科学分野
大学院生 榎本 弘幸

Journal of Endocrinology 2022 Vol. 253, issue 1 掲載予定

DOI: 10.1530/JOE-21-0169

本論文において申請者は、雌ラット糖尿病モデルの視床下部の kisspeptin、NKB、Dyn ニューロンの発現について検討し雌の糖尿病による不妊に視床下部 KNDy ニューロンが関与しているのかを明らかにすることを目的とした。また糖尿病の重症度の指標として血漿中の glucose、3-ヒドロキシ酪酸 (3HB)、非エステル化脂肪酸 (NEFA) の測定も行い、生殖機能と糖尿病の重症度との関係について検討した。

Kiss1 遺伝子にコードされる kisspeptin は、哺乳類において性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) /黄体形成ホルモン (LH) の放出を刺激し、排卵や卵胞発育、精子形成等の生殖機能制御に深く関わっていることが明らかになってきた。齧歯類では、kisspeptin ニューロンは主に視床下部の前腹側脳室周囲核 (AVPV) と弓状核 (ARC) に存在する。AVPV の kisspeptin ニューロンはエストロゲンの正のフィードバックを受け、排卵前の GnRH/LH サージの誘導に関与していると考えられている。一方、ARC の kisspeptin ニューロンは、性ステロイドによる GnRH/LH 分泌への負のフィードバック効果を媒介する。多くの哺乳類では、ARC kisspeptin ニューロンは、*Tac3* 遺伝子と *Pdyn* 遺伝子にそれぞれコードされる neurokinin B (NKB) と dynorphin (Dyn) を共発現する。これらの細胞は KNDy (Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin) ニューロンと呼ばれ、脈動性 GnRH/LH 分泌に関与していると考えられている。糖尿病は、男性では勃起不全、女性では不妊症や月経不順を引き起こすと言われている。雌の糖尿病による生殖機能障害とこれらのニューロンとの関連は解明されていない。

成熟した雌ラットにストレプトゾトシン (STZ) を投与し、STZ の濃度と投与方法を変えることで重症度の違った糖尿病モデルを作成した。内因性の性ステロイドホルモンの影響を除くため、脳を採取する 1 週間前に卵巣除去し、エストロゲン含有シリコンチューブを皮下に留置した。STZ 投与から 8 週間後、麻酔下で採血後、4%パラホルムアルデヒド 0.1M リン

酸緩衝液にて灌流固定し、脳を採取した。視床下部 *Kiss1*、*Tac3*、*Dyn* mRNA 発現は *in situ hybridization* (ISH) 法を用いて検討し、mRNA 発現細胞数を計測した。また、免疫組織化学法を用いて、*kisspeptin*、NKB、*dynorphin A* の免疫陽性細胞数を計測した。糖尿病進行の指標として、血漿中の *glucose*、3HB、NEFA を測定した。糖尿病の進行に伴う *Kiss1* の発現の変化について検討するために、STZ 投与から 2 週間後に性腺を除去していない状態で灌流固定を行い、視床下部の *Kiss1* の発現について検討した。

STZ 投与してから 8 週間後において重度糖尿病では、連続発情休止期を示し、弓状核の KNDy ニューロンの mRNA 発現の抑制と血漿 LH 濃度の低下を示した。中等度糖尿病では、*kisspeptin* 免疫陽性細胞数および血漿中 LH 濃度は低下したが、KNDy ニューロンの mRNA 発現については変化が見られなかった。軽度糖尿病では、KNDy ニューロンおよび血漿中 LH 濃度に影響は見られなかった。また、KNDy mRNA 発現細胞数は血漿中 3HB 濃度と強い負の相関を示すことが明らかとなった。STZ 投与直後の変化について検討したところ、STZ 投与後 1 日目で血漿中の *glucose*、3HB、NEFA 濃度の増加が観察された。STZ 投与後 3-5 日目から性周期が不規則になり、重度糖尿病ラットでは STZ 投与から 2 週間後に ARC の *Kiss1* mRNA 発現が低下していた。一方、LH サージに関わる AVPV の *Kiss1* mRNA 発現細胞数は、STZ 投与から 2 および 8 週間後で糖尿病の重症度に関係なく、対象群と比べて有意差は観察されなかった。

重度糖尿病では、卵胞発育に関わる ARC の *Kiss1*、*Tac3*、*Pdyn* の発現が抑制されることで、血漿中 LH 濃度の低下と連続発情休止期を引き起こす可能性が示唆された。重症度の指標である血漿中 3HB 濃度と KNDy ニューロンが強い負の相関を示すことから、重症度に比例して KNDy ニューロンの発現が抑制される可能性が示唆された。一方、排卵に関わる AVPV の *kisspeptin* ニューロンは糖尿病状態でも重症度に関係なく、エストロゲンに反応する可能性が示唆された。この結果は、女性における糖尿病は、病態の進行に比例して、LH の脈動性分泌を調節する ARC の KNDy ニューロンに悪影響を与え、月経障害や不妊の原因となる可能性があることを示唆する実験データと考えられた。また、糖尿病による HPG 軸の変化は、糖尿病の重症度によって異なる可能性があり、神経学的な問題を調べる際には、糖尿病の重症度を考慮する必要があることが示唆された。

第二次審査では、上記の内容に加え、KNDy ニューロンの減少はいつどのような機序で起こり、場所によって影響が異なる理由、KNDy ニューロン抑制へのストレス及びケトン体などの関連因子の関与の可能性、グリア細胞の活性化、炎症の介在について、人における 2 型糖尿病での性機能低下の男女での頻度、LH 濃度の低下などについて広く質疑が行われたが、いずれも適切な回答がなされた。

本研究は女性における糖尿病は、病態の進行に比例して、LH の脈動性分泌を調節する ARC の KNDy ニューロンに悪影響を与え、月経障害や不妊の原因となる可能性があることを示唆する重要な研究であることが確認された。以上より本論文は学位論文として価値のあるものと認定した。