

GnRHニューロンの細胞生理学的研究の急展開

日本医科大学大学院システム生理学分野
佐久間康夫

視床下部に分布するニューロンの産生する視床下部ホルモンのひとつ、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の分離と構造決定を対象にSchallyとGuillminがノーベル賞(1977年)を受けてから早いもので四半世紀が経過した。インヒビンの発見などを経て、GnRHニューロンが生殖内分泌機能を調節する視床下部下垂体性腺系の唯一・最終の共通路であることが確立し、栄養状態や日照時間といった体内外の環境の変化に反応して思春期の発動や性周期の維持、性腺機能の維持を行う原動力となっていること、おそらく細胞固有の性質として、GnRHニューロンは規則的・律動的に興奮し、その結果GnRHは下垂体門脈血中にヒトでは約60分の周期でパルス状に分泌され、下垂体前葉に運搬されることなどが判明した。GnRHが下垂体前葉のゴナドトロピン分泌細胞(ゴナドトロフ)のGnRH受容体に強力なダウンレギュレーションを起こすことから、パルス状分泌により受容体が維持されると考えられ、このダウンレギュレーションにより性ホルモン分泌を低下させ、子宮内膜症、子宮筋腫や前立腺癌の治療を行う目的で、リュープロレリンに代表される強力なアゴニストが日本で開発され広く臨床応用されている。

免疫組織化学やin situ hybridization法による形態学的研究も進み、哺乳類では多くの種で総数700~2,000にすぎないこと、発生学的にはGnRHニューロンは驚くべきことに他の脳細胞とは異なり、嗅粘膜と鋤鼻器に由来し、胎生期に終神経を伝わって脳に入り最終的には内側中隔、対角帯野、終板器官から視索前野(ラット、マウス、ヒツジ)または視床下部漏斗核周辺(ヒト、サル、ウサギ、モルモット)まで移動し、定着して正中隆起外層外側部に軸索終末を送るという特異な過程をたどることが分かった[1-3]。このことから細胞接着タンパクの関与などニューロンの移動一般を理解するためのモデルとしても注目され、また、伴性遺伝性のカルマン症候群における無嗅症とゴナドトロピン欠損が接着タンパクをコードするKAL-1遺伝子の異常に起因し、嗅球の欠損とGnRHニューロンが病態の基本にあることも判明し

た[4]。

ところがGnRHの分泌調節をはじめとする生理学的研究は、限られた数のGnRHニューロンが他の細胞に混じって散在しているために、内分泌学的研究や形態学的研究に大きく立ち遅れてきた。この隘路を開くために従来取られてきた戦略は(1)大型のGnRH細胞体が集塊として存在する魚類での比較生理学的研究[5];(2)発がん遺伝子の導入により得られたマウスGnRH株細胞の利用であった。また、マウス胎児で嗅窩に集まっている移動開始前のGnRHニューロンを培養した研究もある[6]。最近になって(3)リポータ遺伝子の発現によりGnRHニューロンを特定する手法が普及し急速な研究の展開により、魚類や株細胞における所見との比較やマウス、ラットの種差についての議論が可能になってきた。ただし、硬骨魚ではGnRHニューロンが3部位にあり[7]、集塊として存在する大細胞性GnRHニューロンは、終神経GnRH細胞と呼ばれ、ゴナドトロピン分泌調節ではなく脳の広い部分、嗅球から脊髄までに投射しおそらく性行動などに関わる神経回路の機能を修飾するものと考えられている。実際雄ティラピアのなわばり行動は、終神経GnRH細胞の分泌するサケ型GnRHの合成を阻害すると消失する。ゴナドトロピン分泌調節に関与するGnRHニューロンは魚類でも内側視索前野に存在し、細胞体は終神経GnRH細胞に比べて小さい。中脳には魚類から哺乳類まで系統発生的にもっとも良く保存されたGnRHを発現する細胞群が見い出されている。中脳のGnRHは、最初にニワトリで見い出されたのでChicken GnRH IIと呼ばれる[8]。アミノ酸組成が僅かに異なるGnRHファミリーは、ホヤからヒトに至るまで現在までに16種ほどが同定されている。

魚、とくにドワーフグーラミにおける終神経GnRHニューロンの特性は岡ら[5]により詳しく調べられている。細胞内電位の記録、ホールセルクランプ膜電位あるいは電流固定実験により、終神経GnRHニューロンがきわめて規則的なペースメーカー電位を発生すること、このペースメーカー電位はテトロドトキシン耐性のナトリ

ウムチャンネルと膜電位依存性カリウムチャンネルの相互作用により生じ、この電位がある閾値に達すると通常のナトリウムチャンネルが活性化され、周期的な活動電位が発生する。活動電位の発生によりN型カルシウムチャンネルが活性化し、細胞外カルシウムの流入が起こることなども示されている。終神経GnRHニューロン自体にGnRH受容体が存在していて、各種のイオンチャンネルの活性が修飾されるという。このように魚類終神経GnRHニューロンはゴナドトロピン分泌に直接関わるものではないが、哺乳類でみられるパルス状GnRH分泌の発生機転を理解するうえで貴重なモデルである。また、終神経GnRHニューロンでは細胞体からGnRHの開口分泌が起こることとの岡の報告は、ラットオキシトシンニューロンでは軸索末端とは別個に樹状突起からオキシトシンが分泌され、シナプス入力にポジティブフィードバック様に作用して、射乳時の軸索末端からの大量分泌を可能にするとのLudwigらの所見 [9] を考え合わせるとペプチドホルモン分泌調節の観点からも興味深いものがある。

Weinerら [10] がGnRHプロモータに腫瘍遺伝子を結合したトランスジーンを導入により作成したマウスGnRHの株細胞であるGT1細胞は、GnRHニューロンの株細胞というばかりでなく、分化したニューロンの株細胞系としても貴重で、さまざまな実験に用いられてきた。GT1細胞は自発放電活動やそれに伴う細胞内カルシウムイオン濃度の周期的変動、GnRHのパルス状分泌など本来のGnRH細胞の特性を維持している。電位依存性カルシウムチャンネルを通して流入したカルシウムイオンは分泌や神経細胞の興奮性の変化、遺伝子の転写調節などさまざまな効果を発揮するが、GT1細胞でもGnRH分泌を促進し、GnRH遺伝子の転写と翻訳に影響を与える。電位依存性カルシウムチャンネルのうちL型のブロッカーが細胞内カルシウム濃度の周期的変動とそれに伴うGnRH分泌を抑制すること、GABA、グルタメート、NMDA、カイニン酸などによる細胞内カルシウム濃度の上昇もL型のブロッカーにより抑えられ、同時にGnRH分泌も減少する。一方、T型チャンネルのブロッカーもカルシウムイオンの流入を抑制することから、GT1細胞にはL型とT型のそれぞれ高閾値、低閾値の電位依存性カルシウムチャンネルが存在し、GnRHの合成、分泌

に関るとされてきた。電位依存性カルシウムチャンネルには、この他にP/Q型、N型、R型がある。われわれは最近、GT1細胞の一系統であるGT1-7を用いて、R、L、N、T型チャンネルの存在を確認し、GT1-7細胞の特色として、R型の発現量がきわめて多く、カルシウム電流の75.6%がR型のブロッカー-SNX-482により阻止されることを見出した。L型のブロッカーで阻止される電流は17.9%であった。これらのブロッカーはともに脱分極による細胞内カルシウム濃度の上昇を阻止し、GnRHの分泌を抑制した [11]。GT1-7細胞にはATPをリガンドとするプリン受容体 (P2XR) も存在する。P2XRはカルシウムイオンをはじめとする陽イオンの流入を起こし、二次的に電位依存性カルシウムチャンネルを活性化する [12]。なお、GT1細胞は細胞内塩素イオンを駆出する膜タンパクであるKCC-2共輸送体やCLC-2チャンネルを欠く一方で、塩素イオンを取り込むNa-K-Cl共輸送体の1つであるNKCC1の発現のため細胞内塩素イオン濃度が平衡電位で決まる濃度より高く、GABAの急性投与では脱分極が起こる [13]。この現象はGABA_A受容体を介するもので、発生途上のGnRHニューロン [6] やGnRHニューロンでも認められる [14]。GT1-7細胞にGABAが共存し、興奮に伴って分泌されることから、GABAによるオートクリン調節の存在も考えられている [15]。異常が嚢胞性線維症を起こすcAMP活性化陰イオンチャンネルCFTRもGT1-7細胞に発現しており、cAMPに反応して塩素イオンの流出による脱分極とGnRH分泌を起こす [16]。

1999年になって複数のグループがGnRHプロモータにリポータ遺伝子を結合したトランスジェニックマウスを作出し、活きた状態でのGnRHニューロンの可視化に成功した。性周期、産仔数などからみて、これらのトランスジェニックマウスのGnRH分泌に異常はないと考えられた。Spergelら [17] は蛍光タンパクgreen fluorescent protein (GFP) をリポータとして用い、内側中隔、対角帯野、終板器官、視索前野などの部位でGnRHニューロンが標識されることを確認したうえでパッチ記録を行い、GnRHニューロンの活動電位波形が特異な後過分極を示すこと、GABAの急速な投与に対して大きな電流を生じること、グルタメートはAMPA受容体を介してほとんどの細胞が反応するが、NMDA受容体による反応

は2割に留まることなどを示した。これらの所見は胎児期から生後6ヵ月に至る雌雄マウスに共通であったという。Herbisonら [18] はLacZ遺伝子をリポータとして用い、上記の組織化学によりGnRHニューロンの分布が知られている部位に加え、外側中隔、分界条床核や視蓋などニューロンも標識されたと述べ、発生起源の異なるGnRHニューロンの存在を示唆したが、この所見は同じグループが後にGFPにより標識したトランスジェニックマウスでは認められていない [19]。また、グルタミン酸がLacZ標識GnRHニューロンの移動に関与し、胎生期の嗅上皮からの移動にはAMPA受容体が、対角帯野や視索前野への定着にはNMDA受容体が関与する可能性を述べた [20]。2002年にはLacZ標識ニューロンに対するGABAの作用を調べ、生後10~17日令の幼若マウスではGABA_A受容体を介して興奮が起こるが、思春期にはGABAにより脱分極を起こすものと過分極を起こすものがほぼ同数となり、成熟メスではすべてが過分極反応を起こすと報じた [21]。GFPで標識したGnRHニューロンにおいても同様の結果が得られるので、この現象はLacZによる標識に伴う人工的なものでないと述べているが [19]、この点は他のグループでも、後述のわれわれのラットでも確認されていない。GFPで標識したマウスGnRHニューロンを用いて詳細なカルシウム電流の解析を行っているMoenterらによると、成熟マウスでは低閾値型の電位依存性カルシウムチャンネルは存在せず、高閾値型ではL型が25%にとどまり、GT1細胞と異なるという [22]。これらのニューロンのスライス記録では、GnRHのパルス様分泌に対応するとみられる10Hz前後の高頻度放電が持続的に起こる [23]。成熟マウスと生後4~10日の幼若マウスの比較では、成長に伴いL型を介する電流が減少し、N型を介するものが増加するという、成長に伴うチャンネル発現の変化を示した [24]。彼らはアロプレグネロンやデヒドロエピアンドロステロンがGnRHニューロンのGABA_A受容体のそれぞれアゴニスト、アンタゴニストとして働く可能性も示している [25]。Moenterらは一貫してGABA_A受容体の急速な活性化によるGnRHニューロンの興奮を示しており、絶食時における生殖内分泌系の抑制がGABA作動性の電流の減少によること、この減少がレプチンの後シナプス作用により補償されることなどをみている [26]。

われわれの研究室の加藤昌克助教授は、生殖神経内分泌学の多くの基礎的データがラットで蒐集されてきたことを考え、enhanced GFP (EGFP) をリポータとしてGnRHニューロンを標識したトランスジェニックラットを作成した [27]。ラット新生仔から得た初代GnRHニューロンでは低閾値型電位依存性カルシウムチャンネルは認められず、高閾値型ではL型とN型を介する電流がそれぞれ20%、R型が55%を占め、P/Q型の関与は少なかった。思春期前後になると、T型低閾値型チャンネルとP/Q型高閾値チャンネルを介する電流が増し、成長に伴うチャンネル発現のスイッチングが判明した。また、R型がこれほど多く発現しているニューロンは他に例がなく、なんらかの特異な生理的意義があると考えられる。Moenterらがマウスで観察したように、成熟ラットのGnRHニューロンでもGABA_A受容体の急速な活性化では脱分極が起こり、持続的な投与に対する抑制反応とは異なった効果がみられる。以上みてきたように、GnRH細胞の性質や調節機構に関する研究は最近数年で長足の進歩を遂げており、対象とする細胞、種差や性差などある意味では、混乱のただなかにある。マウスとラットでは生殖行動パターンにかなりの相違があり、ホルモン定量のための連続採血や脳定位手術など手技的な面でも改めてラットが注目され、ゲノムの解読やクローンラットの開発など、ポジショナルクローニングの可能性も視野に入ってきたという [28]。今後エストロゲンによる正負のフィードバック機構に関わる神経回路の同定やステロイドホルモンの作用機序などの研究、GnRHニューロンの移動や定着における種差の解明に、われわれのラットが有用と考えている。

文 献

1. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338, 161-164.
2. Wrey S, Grant P, Gainer H (1989) Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Nat Acad Sci USA* 86, 8132-8136.
3. Daikoku-Ishido H, Okamura Y, Yanaihara N, Daikoku S (1990) Development of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone-containing neuron system in the rat: In vivo and in transplantation studies. *Dev Biol* 140, 374-387.

4. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW (1989) Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol Brain Res* 6, 311-326.
5. Oka Y (2002) Physiology and release activity of GnRH neurons. *Prog Brain Res* 141, 259-281.
6. Kusano K, Fueshko S, Gainer H, Wray S (1995) Electrical and synaptic properties of embryonic luteinizing hormone-releasing hormone neurons in explant cultures. *Proc Nat Acad Sci USA* 92, 3918-3922.
7. Parhar IS (2002) Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. *Prog Brain Res* 141, 3-17.
8. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H (1984) Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Nat Acad Sci USA* 81, 3874-3878.
9. Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, Leng G (2002) Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* 418, 85-89.
10. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5, 1-10.
11. Watanabe M, Sakuma Y, Kato M (2004) High expression of the R-type voltage-gated Ca^{2+} channel and its involvement in Ca^{2+} -dependent gonadotropin-releasing hormone release in GT1-7 cells. *Endocrinology* 145, 2375-2383.
12. He ML, Zemkova H, Koshimizu TA, Tomic M, Stojilkovic SS (2003) Intracellular calcium measurements as a method in studies on activity of purinergic P2X receptor channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C467-C479.
13. Hales TG, Sanderson MJ, Charles AC (1994) GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. *Neuroendocrinology* 59, 297-308.
14. DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM (2002) Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 16, 2872-2891.
15. Ahnert-Hilger G, John M, Kistner U, Wiedenmann B, Jarry H (1998) Immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons secrete gamma-aminobutyric acid: Evidence for an autocrine regulation. *Eur J Neurosci* 10, 1145-1152.
16. Weyler RT, Yurko-Mauro KA, Rubenstein R, Kollen WJW, Reenstra W, Altschuler SM, Egan M, Mulberg AE (1999) CFTR is functionally active in GnRH-expressing GT1-7 hypothalamic neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 277, C563-C571.
17. Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH (1999) GABA⁻ and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19, 2037-2050.
18. Skynner MJ, Slater R, Sim JA, Allen ND, Herbison AE (1999) Promoter transgenics reveal multiple gonadotropin-releasing hormone-I-expressing cell populations of different embryological origin in mouse brain. *J Neurosci* 19, 5955-5966.
19. Han SK, Todman MG, Herbison AE (2004) Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 145: 495-499.
20. Simonian SX, Herbison AE (2001) Differing, spatially restricted roles of ionotropic glutamate receptors in regulating the migration of GnRH neurons during embryogenesis. *J Neurosci* 21, 934-943.
21. Han SK, Abraham IM, Herbison AE (2002) Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology* 143, 1459-1466.
22. Nunemaker CS, DeFazio RA, Moenter SM (2003) Calcium current subtypes in GnRH neurons. *Biol Reprod* 69, 1914-1922.
23. Suter KJ, Wuarin JP, Smith BN, Dudek FE, Moenter SM (2000) Whole-cell recordings from preoptic/hypothalamic slices reveal burst firing in gonadotropin-releasing hormone neurons identified with green fluorescent protein in transgenic mice. *Endocrinology* 141, 3731-3736.
24. Nunemaker CS, DeFazio RA, Geusz ME, Herzog ED, Pitts GR, Moenter SM (2001) Long-term recordings of networks of immortalized GnRH neurons reveal episodic patterns of electrical activity. *J Neurophysiol* 86, 86-93.
25. Sullivan SD, Moenter SM (2003) Neurosteroids alter gamma-aminobutyric acid postsynaptic currents in gonadotropin-releasing hormone neurons: A possible mechanism for direct steroidal control. *Endocrinology* 144, 4366-4375.
26. Sullivan SD, DeFazio RA, Moenter SM (2003) Metabolic regulation of fertility through presynaptic and postsynaptic signaling to gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci* 23, 8578-8585.
27. Kato M, Ui-Tei K, Watanabe M, Sakuma Y (2003) Characterization of voltage-gated calcium currents in gonadotropin-releasing hormone neurons tagged with green fluorescent protein in rats. *Endocrinology* 144, 5118-5125.
28. Abbott A (2004) The Renaissance rat. *Nature* 428, 464-466.