

室傍核ダイノルフィンニューロンがグルコース利用阻害による生殖機能抑制を仲介する

土田 仁美, 井上 直子, 上野山 賀久, 東村 博子

名古屋大学大学院生命農学研究科

はじめに

哺乳類では、低栄養や飢餓の状態になると生殖機能が抑制されることが知られている。この抑制は、著しいエネルギー不足などにより個体の生存が困難な場合に、妊娠や出産・授乳などを回避するために哺乳類に備わった戦略であると考えられる^{1,2)}。実際、ヒトでも極度な栄養不足は思春期遅発症をもたらすことが知られており³⁾、また動物においても低栄養時の妊娠の抑制や出生率の低下が報告されている⁴⁾。低栄養状態の動物では、黄体形成ホルモン(LH)のパルス状分泌が抑制される^{1,5,6)}。これは低栄養の情報が脳内で感知され、LHパルスを駆動する性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)のパルス状分泌が抑制されることによると考えられる。近年の研究により、視床下部のキスペプチンニューロンが、GnRH分泌を第一義的に制御することが明らかとなっている。そこで本稿では、低栄養による生殖機能抑制を担う脳内メカニズムについて、とくに視床下部室傍核を起始核とするダイノルフィンニューロンの弓状核キスペプチンニューロンに及ぼす抑制作用に焦点をあてて概説する。

キスペプチンニューロンによる哺乳類の生殖制御

キスペプチンは、2001年にGPR54(孤児GPCRの1つ)の内因性リガンドとして発見された(当初はメタスチンと命名)⁷⁾。2003年に、性成熟に至らないヒトの原因遺伝子としてGPR54の突然変異が示されて以来、哺乳類の生殖におけるキスペプチンの役割が次々と明らかにされた⁸⁾。現在では、視床下部に分布するキスペプチンニューロンがGnRHニューロンを直接刺激する上位因子として、哺乳類の生殖機能を第一義的に制御することが明らかにされている。キスペプチンニューロンの細胞

体は、視床下部の前方の前腹側室周囲核(AVPV, 種によってはAVPVの相同核である視索前野)および視床下部内側基底部の下方に位置する弓状核に分布している。そのうち弓状核キスペプチンニューロンは、GnRHのパルス状分泌を制御するGnRHパルスジェネレーター本体であることを最近われわれの研究グループが証明した⁹⁾。弓状核キスペプチンニューロンは、卵巣由来のエストロゲンの負のフィードバック作用部位であると考えられている。GnRH/LHがキスペプチンニューロンによってパルス状に分泌され、エストロゲンの負のフィードバックをうける意義は、末梢の性腺刺激ホルモン濃度を適正なレベルに保ち、卵胞を正常に発育させるためである。

弓状核のキスペプチンニューロンは、キスペプチンのほかにニューロキニンB(NKB)およびダイノルフィンAを発現していることから、それらの頭文字をとってKNDyニューロンとも呼ばれる^{10,11)}。NKBは促進性、ダイノルフィンAは抑制性の神経ペプチドであることから、これらのペプチドの相互作用により、キスペプチンがパルス状に分泌されると提唱されている(図1)。このため、ダイノルフィンはこれまで弓状核のKNDyニューロンを構成する神経ペプチドの1つとして着目されてきたが、本研究は、弓状核の背側前方に位置する視床下部室傍核を起始核とするダイノルフィンニューロンが低栄養シグナルにより活性化され、KNDyニューロンを抑制する役割を担うことを明らかにした点でも意義深い。

低栄養による生殖機能抑制を担うダイノルフィンニューロンの役割

低栄養による生殖機能抑制を担うメカニズムの解明のために、グルコース利用阻害剤である2-デオキシ-D-グルコース(2DG)を投与したモデル動物を用いることが有用である。実際に、成熟メスラットの静脈内に2DGを投与し、全身性にグルコース利用を阻害すると、GnRHパルスの指標であるLHのパルス状分泌が著しく抑制される⁵⁾。また、2DGによるLHパルス抑制は負のフィー

連絡先: 土田仁美
名古屋大学大学院生命農学研究科
〒464-8601 愛知県名古屋千種区不老町
TEL: 052-789-4074
FAX: 052-789-4072
E-mail: tsuchida.hitomi@a.mbox.nagoya-u.ac.jp

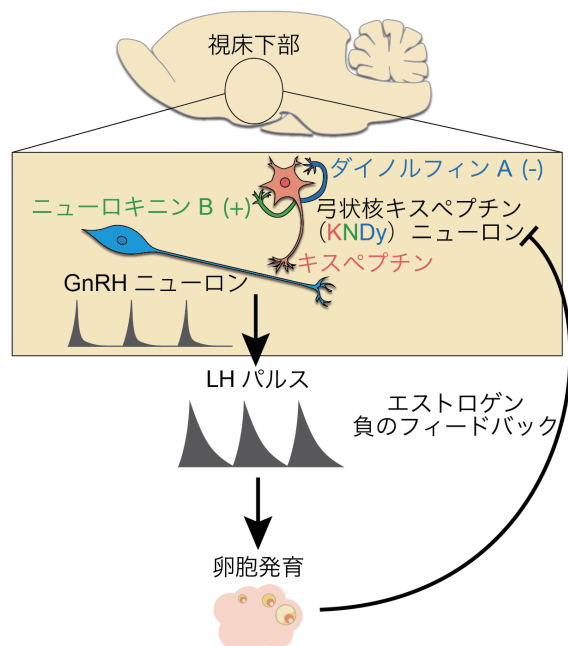


図1 視床下部-下垂体-性腺軸における性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) パルス発生機構とエストロゲンの負のフィードバックメカニズム

視床下部弓状核のキスペプチンニューロン (別名 KNDy ニューロン) は, GnRH/性腺刺激ホルモンのパルス状分泌を制御する GnRH パルスジェネレーターとして機能し, 卵胞発育を制御する. ニューロキニン B は KNDy ニューロンに促進的に, ダイノルフィン A は抑制的に作用することで, KNDy ニューロンのパルス状の活動が制御されると提唱されている. 黄体形成ホルモン (LH) パルスは, GnRH パルスの指標として用いられる. 卵胞からのエストロゲンは, KNDy ニューロンに対して負のフィードバック作用を示し, GnRH/LH パルスを適正なレベルに保つと考えられる.

ドバック (発情休止期) レベルのエストロゲンにより増強される⁵⁾. このことは, 48時間の絶食負荷が卵巣除去ラットでは LH パルスを抑制せず, 一方で発情休止期レベルのエストロゲンを代償投与した卵巣除去ラットでのみ顕著に LH パルスを抑制することと一致する¹²⁾. われわれは以前, ダイノルフィンニューロンが雌ラットにおいてエストロゲン依存的に LH パルスの抑制を仲介することを示唆しており¹³⁾, このことは低栄養時の生殖機能抑制がエストロゲン依存的であることと一致している. そこで本研究では, 卵巣除去後に発情休止期レベルのエストロゲンを代償投与したラット (OVX + low E2ラット) を用い, 2DG 投与による LH パルス抑制に, ダイノルフィンとその受容体である κ オピオイド受容体シグナリングが関与するかどうかを検討した.

ダイノルフィンニューロンが低栄養によるパルス状 LH 分泌の抑制を仲介するかどうかを検討するため, OVX + low E2ラットの第3脳室内にダイノルフィン受容体拮抗剤である nor-binaltorphimine (nor-BNI) を投

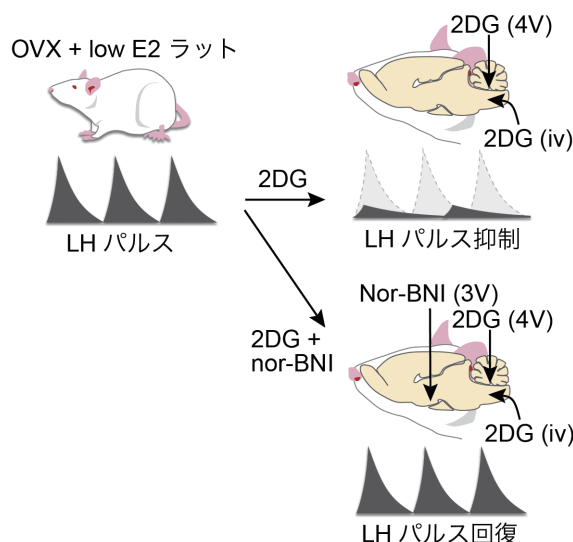


図2 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) の静脈内 (iv) および第4脳室 (4V) 投与による LH パルス抑制に対する第3脳室 (3V) へのダイノルフィン受容体拮抗剤投与の効果
卵巣除去ラットに負のフィードバックレベルのエストロゲンを処置した (OVX + low E2) ラットの静脈内あるいは第4脳室への 2DG を投与すると LH パルスが抑制されるが, 2DG 投与の直前に, ダイノルフィン受容体拮抗剤 (nor-BNI) を第3脳室に投与することにより LH パルスの抑制は阻害される.

与した. Nor-BNI 投与直後にグルコース利用阻害剤 2DG を静脈内に投与し, 無麻酔無拘束下で 3 時間 6 分間隔の頻回採血を行うことでパルス状 LH 分泌動態を確認した. 対照群では, 第3脳室へ溶媒 (滅菌水) を, 静脈内へキシロース (ラットがエネルギーとして利用できない糖) を投与した. その結果, 2DG 投与群では LH パルスが顕著に抑制された一方で, 2DG 投与の直前に第3脳室へ nor-BNI を投与した群では LH パルスの抑制が解除され, 血中 LH 濃度や LH パルス頻度は, 静脈内へ 2DG を投与した群と比べて有意に増加した (図2).

ダイノルフィンニューロンの細胞体は, 視床下部において室傍核, 弓状核, 視索上核などの複数の神経核に存在するため, どの神経核に存在するダイノルフィンニューロンがグルコース利用阻害によるパルス状 LH 分泌の抑制を仲介するかを組織学的に検討した. 2DG を静脈内へ投与した 1 時間後に脳を採取し, 室傍核, 弓状核および視索上核について, ダイノルフィン遺伝子とニューロン活性化マーカーである Fos 遺伝子を二重 *in situ* hybridization により可視化し, 神経核ごとにダイノルフィンニューロンの活性化を定量的に観察した. すると, 2DG を投与したラットの室傍核でのみ, ダイノルフィン遺伝子と Fos 遺伝子の共発現細胞数が対照群に比べて有意に増加した. これらの結果から, 室傍核のダイノルフィンニューロンが低栄養に反応して特異的に活

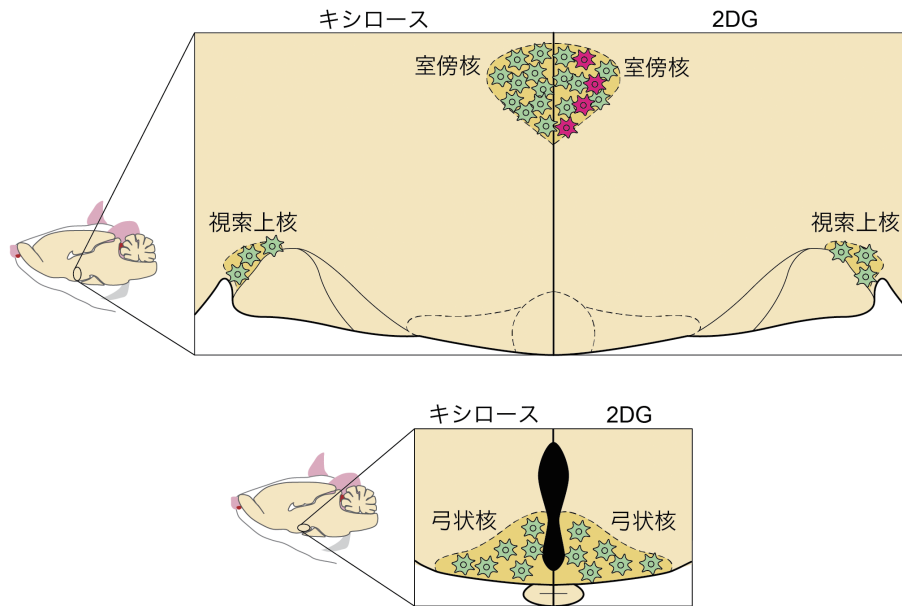


図3 2DG投与によって活性化される視床下部ダイノルフィンニューロンの探索
 ダイノルフィン遺伝子発現細胞（緑）は、室傍核、視索上核および弓状核に局在するが、静脈あるいは第4脳室への2DG投与により、室傍核ダイノルフィンニューロンにのみ Fos 遺伝子（ニューロン活性化マーカー、赤）発現が増加することから、2DG投与により室傍核ダイノルフィンニューロンが特異的に活性化し、LHパルスの抑制に関与すると考えられる。

性化することが示唆された（図3）。

後脳からの低栄養シグナルによる室傍核ダイノルフィンニューロンを介した生殖機能抑制

後述するように、後脳には低栄養を感知するシステムが備わっている。そこで、本研究ではダイノルフィンが後脳からの低栄養シグナルによる LH パルスの抑制を仲介するかどうかを検討した。OVX + low E2ラットの第3脳室に nor-BNI を投与した直後に、2DG を第4脳室へ投与し、パルス状 LH 分泌の動態を確認した。対照群では、第3脳室に溶媒（滅菌水）を、第4脳室にキシロースを投与した。その結果、第4脳室に2DGを投与した群では LH パルスが顕著に抑制された一方で、2DGを投与する直前に第3脳室へ nor-BNI を投与した群では、2DG による LH のパルス状分泌の抑制は解除され、血中 LH 濃度や LH パルス頻度は、第4脳室に2DG、第3脳室に溶媒を投与した対照群と比べて有意に増加した（図2）。

さらに、第4脳室2DG投与によって室傍核のダイノルフィンニューロンが活性化するかどうかを組織学的に検討したところ、2DGを第4脳室へ投与したラットでは、室傍核においてダイノルフィン遺伝子と Fos 遺伝子の共発現細胞数が対照群に比べて有意に増加した。一方、弓状核と視索上核のダイノルフィン遺伝子発現細胞

では、第4脳室2DG投与による Fos 遺伝子発現への効果は見られなかった。これらの結果から、後脳で感知された低栄養シグナルは、室傍核ダイノルフィンニューロンを特異的に活性化し、LH パルスを抑制することが示唆された（図3）。

ダイノルフィンの作用部位を明らかにするため、弓状核キスペプチンニューロンにダイノルフィン受容体遺伝子が発現するかどうかを検討した。OVX + low E2ラットの脳切片を用いて、キスペプチン遺伝子とダイノルフィン受容体遺伝子の二重 *in situ* hybridization を行ったところ、弓状核のキスペプチン遺伝子発現細胞の約60%にダイノルフィン受容体遺伝子が共発現していることが明らかとなった。このことから、ダイノルフィンは弓状核キスペプチンニューロンに直接作用することによりキスペプチンニューロンの活動を抑制し、GnRH/LH パルスを抑制することが明らかとなった（図4）。

前述のように、絶食や2DG投与によるパルス状 LH 分泌の抑制は、雌ラットにおいて性ステロイドホルモンの存在下でより顕著となる^{5,12)}。そこで、エストロゲンがダイノルフィン遺伝子発現へ及ぼす影響を検討した。OVXラットとOVX + low E2ラットの脳切片を用いて、室傍核、弓状核および視索上核におけるダイノルフィン遺伝子発現細胞数や発現量を解析したところ、弓状核と視索上核では両群間に有意な差がなかった一方で、室傍核ではOVX + low E2ラットのダイノルフィン遺伝子発

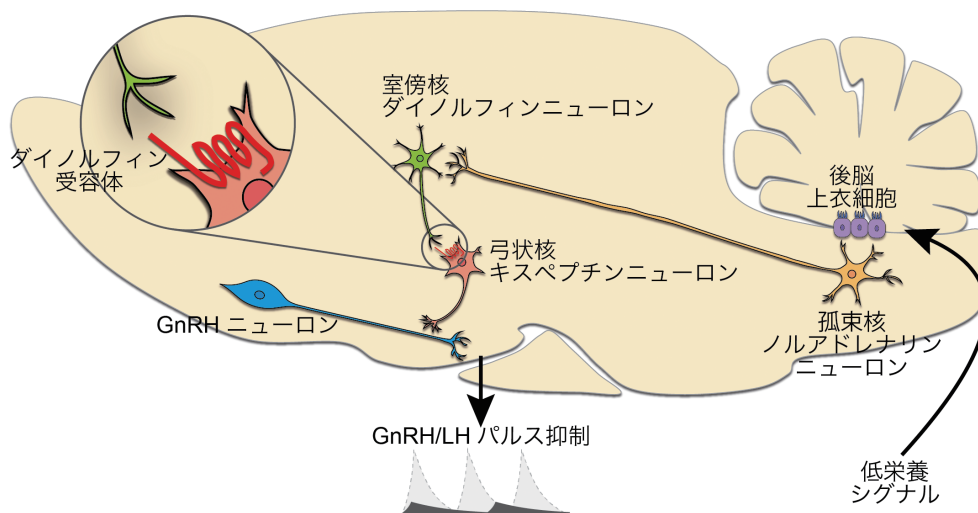


図4 低栄養時の脳内での生殖機能抑制メカニズム (仮説)

後脳の上皮細胞で感知された低栄養シグナルは、孤束核ノルアドレナリンニューロンにより室傍核へと伝達され、ダイノルフィンニューロンを活性化する。ダイノルフィンは弓状核キスペプチンニューロン (GnRH/LH パルスジェネレーター) に発現するダイノルフィン受容体を介して同ニューロンを直接抑制する。その結果、パルス状 GnRH/LH 分泌が抑制されると考えられる。

現量が OVX ラットと比べて有意に高かった。このことから、発情休止期レベルのエストロゲンは、室傍核のダイノルフィンの発現を特異的に増加することが示された。

後脳上皮細胞の低栄養センサーとしての役割と視床下部への神経経路

これまでの研究から、われわれは第4脳室周囲に存在する上皮細胞が低栄養シグナルを感知する栄養センサーであることを示唆してきた⁸⁾。後脳の上皮細胞には膜型グルコキナーゼやグルコーストランスポーター2が発現しており、脳内のグルコースセンサーとしての役割があることが示唆される¹⁴⁾。実際に、*in vitro*において後脳由来の上皮細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度が低グルコースに反応して上昇する¹⁴⁾。また、低栄養シグナルとして2DG、ケトン体、AMP 活性化プロテインキナーゼ活性化剤、脂肪酸 β 酸化阻害剤などを第4脳室に投与すると、LH パルスが顕著に抑制される¹⁵⁻¹⁷⁾。よって、低栄養シグナルは第4脳室周囲の上皮細胞により感知され、視床下部にその情報が伝達され、生殖を調節すると示唆される。さらに、われわれは以前、第4脳室に投与した順行性の神経トレーサーが孤束核ノルアドレナリン作動性ニューロン、室傍核の何らかのニューロンおよび弓状核のキスペプチンニューロンに観察されることを示した¹⁸⁾。第4脳室周囲の上皮細胞の近傍の孤束核に細胞体をもつノルアドレナリン作動性ニューロンは、室傍核に投射するこ

とが報告されている¹⁹⁾。さらに、雌ラットの室傍核へのカテコールアミン合成阻害剤の投与は、絶食時や2DG 投与による LH パルスの抑制を阻害する^{20,21)}。これらの知見から、第4脳室周囲の上皮細胞によって感知された低栄養シグナルが、孤束核ノルアドレナリン作動性ニューロンを介して室傍核に伝達されることで、最終的に LH パルスが抑制されると考えられる (図4)。すなわち、後脳で感知された低栄養シグナルは、孤束核ノルアドレナリンニューロンにより室傍核へと伝達され、ダイノルフィンニューロンを活性化し、ダイノルフィンは GnRH/LH パルスジェネレーターである弓状核キスペプチンニューロンを直接抑制し、その結果パルス状 LH 分泌を抑制すると考えられる (図4)。

低栄養シグナルによる血糖値および摂食量の増加にダイノルフィンニューロンは関与しない

2DG 投与によるグルコース利用阻害時には、生体では低栄養状態に反応して血糖値の上昇や、摂食量の増加が引き起こされる。そこで本研究では、脳内のダイノルフィン-ダイノルフィン受容体シグナリングが2DG による血糖値上昇や、摂食量の増加を仲介しているかどうかを検討した。Nor-BNI を第3脳室へ投与した直後に2DG を静脈内あるいは第4脳室へ投与し、その後、3時間にわたり血糖値の変化を測定した。さらに、その後30分間自由に摂食させ、摂食量を測定した。キシロースを投与した対照群では、血糖値に変化がないのに対し、2DG

を投与した群では血糖値は対照群に比べて有意に増加した。2DG 投与前の脳内への Nor-BNI 投与は、2DG による血糖値増加効果を阻害することはなく、血糖値は有意に増加した。摂食量に関しては、対照群では摂食行動はほとんど観察されなかった一方で、静脈内あるいは第4脳室に2DGを投与した群では対照群と比べて有意に摂食量が増加した。2DG 投与前に第3脳室へ Nor-BNI を投与した群においても対照群と比べて有意に摂食量が増加し、ダイノルフィン受容体阻害は、摂食量の増加に影響を及ぼすことはなかった。これらの結果から、ダイノルフィンニューロンは、低栄養時の糖新生や摂食量の増加に関与することではなく、GnRH/LH パルスの抑制を特異的に仲介することが示された (図4)。

終わりに

本研究では、室傍核を起始核とするダイノルフィンニューロンが低栄養時のパルス状 GnRH/LH 分泌の抑制を特異的に仲介することが明らかとなった。本研究内容は *Endocrinology* 誌に掲載されているので、ご参照いただければ幸いです²²⁾。筆者は、本研究が低栄養による生殖機能抑制メカニズム解明の一助となり、さらに本稿で述べたような基礎的知見が臨床の現場で役立つことを願っている。

謝辞

本稿は、第25回日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものである。本稿を執筆する機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事長 杉野法広先生、第25回学術集會会長 伊藤潔先生、ならびに本誌編集委員の先生方に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Cagampang FRA, Maeda K, Yokoyama A, Ota K (1990) Effect of food deprivation on the pulsatile LH release in the cycling and ovariectomized female rat. *Horm Metab Res*, 22, 269-272.
2. Minabe S, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI (2011) Analysis of pulsatile and surge-like luteinizing hormone secretion with frequent blood sampling in female mice. *J Reprod Dev*, 57, 660-664.
3. Pozo J, Argente J (2002) Delayed puberty in chronic illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16, 73-90.
4. McClure TJ, Saunders J (1985) Effects of withholding food for 0-72 h on mating, pregnancy rate and pituitary function in female rats. *J Reprod Fertil*, 74, 57-64.
5. Nagatani S, Bucholtz DC, Murahashi K, Estacio MA, Tsukamura H, Foster DL, Maeda KI (1996) Reduction of glucose availability suppresses pulsatile luteinizing hormone release in female and male rats. *Endocrinology*, 137, 1166-1170.
6. Tsukamura H, Yamada S, Maeda KI (2000) Fasting-induced changes in pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in male rats: The role of testosterone and the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Reprod Dev*, 46, 227-234.
7. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Metastasis suppressor gene KISS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411, 613-617.
8. Tsukamura H (2021) Kobayashi Award 2019: The neuroendocrine regulation of the mammalian reproduction. *Gen Comp Endocrinol*, 113755.
9. Nagae M, Uenoyama Y, Okamoto S, Tsuchida H, Ikegami K, Goto T, Majorune S, Nakamura S, Sanbo M, Hirabayashi M, Kobayashi K, Inoue N, Tsukamura H (2021) Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 118, 1-11.
10. Khachaturian H, Watson SJ, Lewis ME, Coy D, Goldstein A, Akil H (1982) Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system. *Peptides* 3, 941-954.
11. Fallon JH, Leslie FM (1986) Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J Comp Neurol*, 249, 293-336.
12. Maeda K, Nagatani S, Estacio MA, Tsukamura H (1996) Novel estrogen feedback sites associated with stress-induced suppression of luteinizing hormone secretion in female rats. *Cell Mol Neurobiol*, 16, 311-324.
13. Mostari P, Ieda N, Deura C, Minabe S, Yamada S, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H (2013) Dynorphin-kappa opioid receptor signaling partly mediates estrogen negative feedback effect on LH pulses in female rats. *J Reprod Dev*, 59, 266-272.
14. Moriyama R, Tsukamura H, Kinoshita M, Okazaki H, Kato Y, Maeda KI (2004) In vitro increase in intracellular calcium concentrations induced by low or high extracellular glucose levels in ependymocytes and serotonergic neurons of the rat lower brainstem. *Endocrinology*, 145, 2507-2515.
15. Murahashi K, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL, Maeda KI (1996) Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology*, 137, 1171-1176.
16. Iwata K, Kinoshita M, Susaki N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI (2011) Central injection of ketone body suppresses luteinizing hormone release via the catecholaminergic pathway in female rats. *J Reprod Dev*, 57, 379-384.
17. Minabe S, Deura C, Ikegami K, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H (2015) Pharmacological and morphological evidence of AMPK-mediated energy sensing in the lower brain stem ependymocytes to control reproduction in female rodents.

- Endocrinology, 156, 2278-2287.
18. Deura C, Minabe S, Ikegami K, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H (2019) Morphological analysis for neuronal pathway from the hindbrain ependymocytes to the hypothalamic kisspeptin neurons. *J Reprod Dev*, 65, 129-137.
 19. Saphier D (1993) Electrophysiology and neuropharmacology of noradrenergic projections to rat PVN magnocellular neurons. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*, 264, 891-902.
 20. Maeda K, Cagampang FR, Coen CW, Tsukamura H (1994) Involvement of the catecholaminergic input to the paraventricular nucleus and of corticotropin-releasing hormone in the fasting-induced suppression of luteinizing hormone release in female rats. *Endocrinology*, 134, 1718-1722.
 21. Nagatani S, Tsukamura H, Murahashi K, Bucholtz D, Foster DL, Maeda KI (1996) Paraventricular norepinephrine release mediates glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 137, 3183-3186.
 22. Tsuchida H, Mostari P, Yamada K, Miyazaki S, Enomoto Y, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H (2020) Paraventricular Dynorphin A Neurons Mediate LH Pulse Suppression Induced by Hindbrain Glucoprivation in Female Rats. *Endocrinology*, 161, 1-18.