

オキシトシンによる雄性交尾行動の 新たな制御メカニズム（ボリューム伝達）の解明

岡山大学 学術研究院環境生命自然科学学域（理）・神経制御分野（神経行動研究室）

坂本 浩隆

はじめに

哺乳類において、雄の性機能を調節している神経ネットワークは脳や脊髄の多くの部位から成り立っている。われわれはこれまでに、げっ歯類であるラット・マウス、真無盲腸類のスンスおよび霊長類のニホンザルといった哺乳類において、脊髄に存在するガストリン放出ペプチド（GRP）系が雄優位な性差神経回路を形成し、勃起や射精などの雄の性機能を調節する（性機能センター）ことをこれまでに報告してきた。しかしながら、脳からどのようにして脊髄の性機能センターを調節しているのかは不明であった。一方、ヒト男性において、射精後に「母性のホルモン」として知られるオキシトシンの血中量が増加することが知られているが、その動作メカニズムは未解明である。そこで本研究では、脳で合成されたオキシトシンが脊髄における雄の性機能センターを調節すると考え、研究を行った。今回、間脳視床下部に存在するオキシトシン・ニューロンが、脳から遠く離れた脊髄まではたらきかけ、脊髄レベルで雄の交尾行動を促進させることを明らかにした。

1. 神経ペプチドホルモン、ガストリン放出ペプチド（GRP）

1-1. 雄優位の性的二型である脊髄 GRP ニューロン系の発見

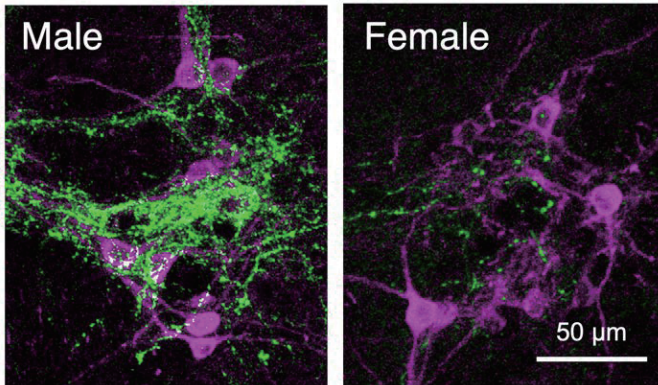
本項ではまず、本研究の背景となる神経ペプチドの一種であるガストリン放出ペプチド（GRP）について紹介する。GRP は、ボンベシンファミリーに属する神経ペプチドの一種である¹⁾。ボンベシンとは、1971年にヨーロッパスズガエル (*Bombina bombina*) の皮膚から単離・精製された抗菌ペプチドである²⁾。哺乳類では、1979年にブタの消化管から GRP が精製され¹⁾、1983年にブタの脊髄からニューロメジン B (NMB) が単離・精製さ

れた³⁾。GRP、NMB はともに C 末端部の 10 アミノ酸配列がボンベシンと高い相同性をもつことから、ボンベシン様ペプチドとされた。その後、ヒト、ラットを含む多くの哺乳類で、GRP の存在が確認、同定されている⁴⁾。ラットの GRP は 29 アミノ酸からなる神経ペプチドで、中枢神経系に広く分布し、摂食行動⁵⁾、概日リズム⁶⁾、搔痒感⁷⁾、情動反応⁸⁻¹⁰⁾ など、多くの生理現象に関与することが知られている。また、哺乳類におけるボンベシン様ペプチドは、生体内で膜を 7 回貫通する G タンパク質共役型受容体を介して作用することが知られており、GRP に親和性の高い GRP 受容体 (GRP-R)¹¹⁾、NMB に親和性の高い NMB 受容体 (NMB-R)¹²⁾ がそれぞれ報告されている。さらに、両者に相同性を示すものの、内在性の親和性リガンドがまだ判明していないオーファン受容体として、ボンベシン受容体サブタイプ-3 (BRS-3) も同定されている¹³⁾。われわれは、雄の性機能を司る神経回路系を明らかにする目的で、ラット腰髄における GRP および GRP 受容体の発現と、それらの機能解析を行った^{14,15)}。ラット腰髄における GRP 発現とその局在を免疫組織化学的に解析した結果、腰髄 L3-L4 レベルの中心灰白質、中心管背側部には、多数の GRP 免疫陽性ニューロンの細胞体が観察された¹⁴⁾。その染色強度は雌に比べ雄に強く、雄優位の性差を認めた¹⁴⁾ (図 1 A)。また、これらの GRP 免疫陽性の細胞体の数を、雌雄で比較したところ、雌より雄が有意に多かった¹⁴⁾。さらに、雄の腰髄 L5-L6 レベルにおいては、GRP 免疫陽性線維は背側灰白交連 (DGC) に密に分布し、仙髄副交感神経核 (SPN)^{14,16)} および球海綿体脊髄核 (SNB)¹⁷⁾ にまで投射していたが、雌ではほとんど存在していなかった (図 1 A)。これら全ての投射核には GRP に対する高親和性結合能および GRP 受容体様の免疫陽性反応を認めた^{14,18)}。

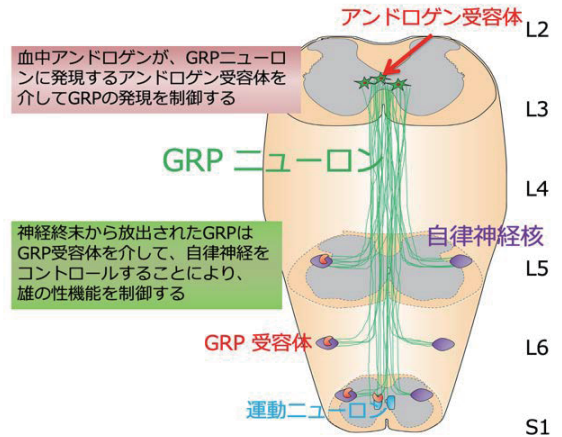
本研究ではさらに、ストレスと心因性勃起障害の関係

A

GRP/自律神経核



B



Sakamoto et al., Nature Neuroscience 2008より改変.

図1 脊髄ガストリン放出ペプチド (GRP) ニューロン系は雄優位な性的二型であり、雄の性機能を制御している

A: 自律神経核において、GRP線維投射に雄優位な性差がある。

B: 雄の性機能センターの概略図。脊髄にあるGRPニューロン系が雄優位な神経回路系を脊髄内に形成し、アンドロゲン依存的に勃起や射精などの雄の性機能を調節している。

性の観点から研究を進めた結果、ストレスホルモンであるコルチコステロンへの慢性曝露が、脊髄 GRP ニューロン系を介して雄の性機能障害を引き起こすことも見いだしている¹⁹⁾。また、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の動物モデルであるトラウマのストレス負荷実験系によって、脊髄 GRP ニューロン系が機能低下し、GRP アゴニストの投与によって減弱した雄性性機能が回復することも明らかにした²⁰⁾。

1-2. 脊髄 GRP ニューロン系は雄性性機能を調節する

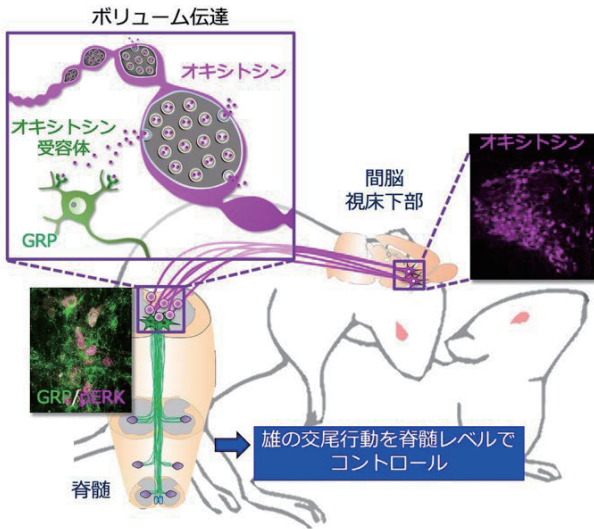
次に、これらの分子・形態学的解析結果をもとに、*in vivo* における機能解析を行った。まず、成熟雄を去勢することにより、雄性・性機能を減弱させ、GRP アゴニストの腹腔内投与による雄性・性機能への作用を解析した。その結果、去勢雄は有意な反射性勃起能をはじめ、計測したすべてのパラメーターにおいて機能低下を示したが、GRP アゴニスト投与により、反射性勃起の回数と自発的に起こる射精反射の発現率は濃度依存的に有意に増加した¹⁴⁾。さらに、正常成熟雄の腰髄クモ膜下腔へ GRP アンタゴニストである RC-3095 を投与して同様の解析を行った。その結果、GRP アンタゴニストの腰髄への局所投与により、反射性勃起の回数と自発的に起こる射精反射の発現率を濃度依存的に有意に減衰させた¹⁴⁾。以上の結果から、脊髄にある GRP ニューロン系が雄優位な神経回路系を脊髄内に形成し、勃起や射精な

どの雄の性機能を調節していることを明らかにした¹⁴⁾ (図1 B)。

2. 間脳視床下部オキシトシン・ニューロンの脊髄 GRP ニューロン系への関与

われわれは、この新規に同定した脊髄 GRP ニューロン系と、脳との機能連関に焦点を合わせて研究を進めた。中でも脳からの下行性の制御因子として、下垂体後葉ホルモンの一つであるオキシトシンに着目した。オキシトシンは、ヒト女性において分娩時の子宮筋収縮や乳汁放出への関与で知られるが、男性では射精等の性機能に深く関与する可能性が報告されている²¹⁾。ラットの脳内において、オキシトシン・ニューロンは間脳視床下部の室傍核 (PVN) と視索上核 (SON) に細胞体が存在するが、そのうち、PVN ニューロンのみを特異的に薬物破壊すると射精機能が減衰する²²⁾。また、脊髄において、オキシトシン免疫陽性の神経線維は GRP ニューロンの細胞体が多数存在する腰髄 L3-L4 レベルの DGC に密に分布する²³⁾。ことから、視床下部のオキシトシン・ニューロンが GRP ニューロン系を脳から遠心性に制御している可能性が示唆される。しかしながら、ラット腰髄において、オキシトシン陽性線維の投射先やその制御メカニズムに関してはいまだ不明な点が多い。本研究では、雄の性機能を司る神経回路系を明らかにする目的で、

A



B

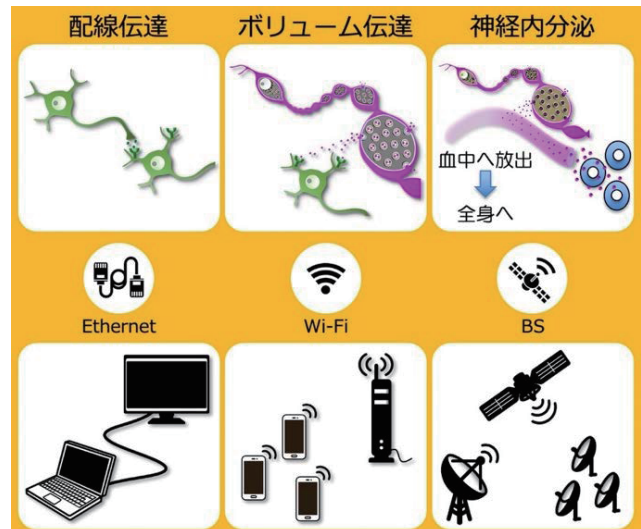


図2 オキシトシンが雄の交尾行動を脊髄レベルで促進する新たな局所神経機構「ボリューム伝達」を解明

- A: オキシトシン・ニューロンが脳から脊髄へはたらきかけ、ボリューム伝達を介して脊髄レベルで雄の交尾行動を促進させることを明らかにした。作用部位まで軸索突起をのばし、脳から遠く離れた脊髄で局所的に放出・拡散されることによってコミュニケーションする新たな脊髄内局所神経機構「ボリューム伝達」を明らかにした。
- B: ボリューム伝達を説明するアナロジー。ボリューム伝達は、配線伝達(シナプス系)と神経内分泌系の両者の要素をあわせ持っていると考えられる。ホルモンによる神経内分泌は、血流を介して全身に作用するシステムで、いわば「BS (Broadcasting Satellite) 放送」のようなものと喩えられる。シナプスによる「配線伝達」を「Ethernet」と喩えるならば、「ボリューム伝達」は、「Wi-Fi」と喩えることができるかもしれない。

オキシトシン・ニューロンの GRP ニューロン系への関与を分子・神経解剖学的に解析した。

2-1. 腰髄におけるオキシトシンニューロンの線維分布と局所濃度

まず、競合酵素免疫測定 (ELISA) 法によりラット腰髄 L3-L4 レベルにおけるオキシトシンの局所濃度を測定した。その結果、雌に比べ雄の腰髄においてオキシトシンの含有量が有意に多いことが明らかになった²⁴⁾。次に、ラット腰髄 L3-L4 レベルにおけるオキシトシンと GRP に対する二重免疫組織化学的解析を行った。その結果、ラット腰髄におけるオキシトシン線維分布に雄優位の性差が観察された²⁵⁾ (図 2 A)。さらに、これらのオキシトシン線維の分布は、GRP ニューロンの細胞体が存在する領域に多い傾向があり、機能的な強い結びつきも示唆された。

2-2. 脊髄 GRP ニューロンにおけるオキシトシンに対する応答性

本研究ではさらに、脊髄 GRP ニューロンにおけるオキシトシンに対する応答性について解析した。GRP ニューロンの細胞体が存在する L3-L4 レベルの腰髄の

ラフィン切片を作製し、ビオチン標識したオキシトシンと反応させることにより、オキシトシン特異的に結合する領域を可視化する *in situ* receptor binding 解析を行った。その結果、雄ラット腰髄 L3-L4 レベルの中心管背側のニューロン群にオキシトシンに対する強い結合能が観察された²⁴⁾。なお、本実験では、オキシトシン結合能実験を行った切片を予め、GRP 免疫染色を施すことにより、結合能を示したニューロンが GRP ニューロンであることを確認している²⁴⁾。

脊髄 GRP ニューロンがオキシトシンに対する強い結合能をもつことから、GRP ニューロンはオキシトシン受容体を発現していることが示唆された。しかしながら、免疫組織化学的解析を行うにあたり、オキシトシン受容体をタンパク質レベルで解析する良い抗体がないという問題点がある。そこで、ラット脊髄 GRP ニューロンにオキシトシン受容体が発現しているかどうかを調べるために、オキシトシン受容体プロモータ活性を利用して eYFP を発現するトランスジェニック (Tg) ラットを作成した。本 Tg ラットは、オキシトシン受容体プロモータ下流に改変黄色蛍光タンパク質 (eYFP) 遺伝子がノック

クインされたトランスジーンが挿入されており、オキシトシン受容体が発現する神経細胞を eYFP 蛍光で可視化することができる。この Tg ラット脊髄を用いて、GRP に対する免疫染色を行った。その結果、脊髄 GRP ニューロンの細胞体は、高い確率でオキシトシン受容体を共発現することを明らかにした²⁵⁾。

次いで、性行動後、雄ラットにおける脊髄 GRP ニューロンの神経活性を、phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) 発現を指標に解析した。結果、性行動後、脊髄 GRP ニューロンにおける pERK 発現が有意に増加した。次に、ラット腰髄クモ膜下腔にオキシトシンを局所・微量投与し、脊髄 GRP ニューロンにおける pERK 発現へのオキシトシンの作用を解析した。結果、オキシトシン投与は脊髄 GRP ニューロンにおいて pERK 発現率を上昇させた²⁵⁾。これらのことから、雄の性行動時に腰髄で放出されたオキシトシンは、脊髄 GRP ニューロンにおける pERK 発現を誘起し、脊髄 GRP 系を活性化するものと考えられた。以上の結果から、視床下部オキシトシン・ニューロンの投射先の1つである腰髄で放出されるオキシトシンは、脊髄 GRP 系を活性化することで雄の性機能を調節していることが示唆された (図 2 A)。

2-3. オキシトシンはボリウム伝達により雄の交尾行動を脊髄レベルで調節する

われわれは腰髄クモ膜下腔へオキシトシンやそのブロッカーを局所投与し、オキシトシンが雄の性機能センターを活性化すること、腰髄で局所的にオキシトシン作用を阻害すると射精能が減衰することを行動レベルで明らかにした^{24, 25)}。さらに、今回作出したオキシトシン受容体-eYFP Tg ラットは、チャンネルロドプシン遺伝子も同時に挿入されており、視床下部にあるオキシトシン・ニューロンを光刺激により活性化 (光遺伝学) できる。この遺伝子改変ラットを用いて、視床下部のオキシトシン・ニューロンを光遺伝学により活性化すると、雄脊髄の性機能センターが活性化されることを電気生理学的に個体レベルで明らかにした²⁵⁾ (図 2 A)。また、脊髄におけるオキシトシン放出を電子顕微鏡で調べた結果、脊髄におけるオキシトシン放出はシナプス領域以外でも観察された²⁵⁾。これらのことから、オキシトシンの作用はシナプス領域に限局しないという、オキシトシンによる脊髄での新たな局所神経機構「ボリウム伝達」³⁾を明らかにした²⁵⁾ (図 2 A)。これまで、オキシトシンをはじめと

する神経ホルモンの多くは、シナプスを介したニューロン-ニューロン間のコミュニケーションを担ったり、血流を介して循環・輸送され、全身性に作用すると考えられてきた。今回われわれは、オキシトシンを輸送するニューロンが軸索突起を遠く脊髄にまで伸ばし、血中へ放出するかのようにオキシトシンを脊髄にまき散らすことで、1対多に情報を伝えるシステムを見いだした。これは限られた場所・相手に1対多で情報を、遠隔地であっても、局所的に効率良く伝える新たなニューロン間コミュニケーションと考えられた。さらに、この脊髄におけるオキシトシンの作用は、いわゆるシナプス結合を介した「配線伝達」ではなく、オキシトシンによる新たな局所神経機構「ボリウム伝達」を介したものであることも明らかにした²⁵⁾。この新たな脊髄内局所神経機構は、Wi-Fi とシステムが似ており、シナプスによる「配線伝達」を「Ethernet」とたとえるならば、「ボリウム伝達」は「Wi-Fi」とたとえることができるかもしれない (図 2 B)。

3. 終わりに

オキシトシンは、下垂体後葉から血中に放出され、分娩時の子宮筋収縮や射乳など、母性に深く関わる神経ペプチドホルモンである。近年では、愛情ホルモン、絆ホルモンなどとして社会行動に深く関わることでも注目されている。今回の成果から、ペニス反射と勃起をコントロールしている脊髄内性機能センターを、脳内で合成されるオキシトシンが脊髄レベルで調節していることを発見した。若年 (20~30代) の性機能障害の大部分は心因性的のものと考えられている。今回、雄の性機能を制御する脳-脊髄ネットワークの動作メカニズムを明らかにしたことは、将来、ヒトにおける心因性の性機能障害の根本的な治療法の開発へもつながることが期待される。

さらに今回、脳に存在するオキシトシン・ニューロンが遠く離れた脊髄にまで軸索を配置し、シナプス領域に限らない「場」ではたらく新規の脊髄内局所神経機構「ボリウム伝達」を発見した。これらの成果は、未知なる神経機構の動作メカニズムの理解にも貢献することが期待される。

引用文献

- 1) McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V (1979) Characterization of a gastrin re-

- leasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 90, 227–233.
- 2) Anastasi A, Erspamer V, Bucci M (1971) Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia*, 27, 166–167.
 - 3) Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1983) Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 114, 541–548.
 - 4) Taché Y, Brown M (1982) On the role of bombesin in homeostasis. *Trends in Neurosciences*, 5, 431–433.
 - 5) Ladenheim EE, Taylor JE, Coy DH, Moore KA, Moran TH (1996) Hindbrain GRP receptor blockade antagonizes feeding suppression by peripherally administered GRP. *Am J Physiol*, 271, R180–184.
 - 6) Shinohara K, Tominaga K, Isobe Y, Inouye ST (1993) Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J Neurosci*, 13, 793–800.
 - 7) Sun YG, Chen ZF (2007) A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature*, 448, 700–703.
 - 8) Merali Z, Bedard T, Andrews N, Davis B, McKnight AT, Gonzalez MI, Pritchard M, Kent P, Anisman H (2006) Bombesin receptors as a novel anti-anxiety therapeutic target: BBl receptor actions on anxiety through alterations of serotonin activity. *J Neurosci*, 26, 10387–10396.
 - 9) Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER, Bolshakov VY (2002) Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell*, 111, 905–918.
 - 10) Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartsmann G (2004) Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci*, 19, 1041–1045.
 - 11) Battey JF, Way JM, Corjay MH, Shapira H, Kusano K, Harkins R, Wu JM, Slattery T, Mann E, Feldman RI (1991) Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 395–399.
 - 12) Wada E, Way J, Shapira H, Kusano K, Lebacqz-Verheyden AM, Coy D, Jensen R, Battey J (1991) cDNA cloning, characterization and brain region-specific expression of neuromedin B-preferring bombesin receptor. *Neuron*, 6, 421–430.
 - 13) Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, Viallet J, Sausville EA, Battey JF (1993) BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, 268, 5979–5984.
 - 14) Sakamoto H, Matsuda K-I, Zuloaga DG, Hongu H, Wada E, Wada K, Jordan CL, Breedlove SM, Kawata M (2008) Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal cord controls male reproductive functions. *Nat Neurosci*, 11, 634–636.
 - 15) Sakamoto H, Takanami K, Zuloaga DG, Matsuda K, Jordan CL, Breedlove SM, Kawata M (2009) Androgen regulates the sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord that mediates male sexual function. *Endocrinology*, 150, 3672–3679.
 - 16) Oti T, Satoh K, Saito K, Murata K, Kawata M, Sakamoto T, Sakamoto H (2012) Three-dimensional evaluation of the spinal local neural network revealed by the high-voltage electron microscopy: a double immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol*, 138, 693–697.
 - 17) Sakamoto H, Arie T, Kawata M (2010) High-voltage electron microscopy reveals direct synaptic inputs from a spinal gastrin-releasing peptide system to neurons of the spinal nucleus of bulbocavernosus. *Endocrinology*, 151, 417–421.
 - 18) Takanami K, Sakamoto H (2014) The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) in the spinal cord as a novel pharmacological target. *Curr Neuropharmacol*, 12, 434–443.
 - 19) Takanami K, Morishita M, Sakamoto T, Sakamoto H (2023) Chronic corticosterone exposure evokes itch hypersensitivity and sexual dysfunction in male rats: Relationship between the two distinct gastrin-releasing peptide systems in the spinal cord. *Gen Com Endocrinol*, 339, 114289.
 - 20) Sakamoto H, Matsuda K, Zuloaga D, Nishiura N, Takanami K, Jordan C, Breedlove S, Kawata M (2009) Stress affects a gastrin-releasing peptide system in the spinal cord that mediates sexual function: Implications for psychogenic erectile dysfunction. *PLoS One*, 4, e4276, 1–7.
 - 21) Thackare H, Nicholson HD, Whittington K (2006) Oxytocin –its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Hum Reprod Update*, 12, 437–448.
 - 22) Ackerman AE, Lange GM, Clemens LG (1997) Effects of paraventricular lesions on sex behavior and seminal emission in male rats. *Physiol Behav*, 63, 49–53.
 - 23) Wagner CK, Clemens LG (1993) Neurophysin-containing pathway from the paraventricular nucleus of the hypothalamus to a sexually dimorphic motor nucleus in lumbar spinal cord. *J Comp Neurol*, 336, 106–116.
 - 24) Oti T, Sakamoto T, Sakamoto H (2021) Systemic effects of oxytocin on male sexual activity via the spinal ejaculation generator in rats. *Commun Integr Biol*, 14, 55–60.
 - 25) Oti T, Satoh K, Uta D, Nagafuchi J, Tateishi S, Ueda R, Takanami K, Young LJ, Galione A, Morris JF, Sakamoto T, Sakamoto H (2021) Oxytocin influences male sexual activity via non-synaptic axonal release in the spinal cord. *Curr Biol*, 31, 103–114.