

## 論文審査の結果の要旨

### Age-related alterations in hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons and in pulsatile LH release in female and male rats

ラット視床下部キスペプチン、ニューロキニン B、ダイノルフィンニューロンの発現とパルス状 LH 分泌の加齢に伴う変化に関する研究

日本医科大学大学院医学研究科 解剖学・神経生物学分野  
大学院生 國村 有弓  
Neurobiology of Aging 2016 年 掲載済み

Kisspeptin ニューロンは性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の上位中枢ニューロンとして GnRH 分泌制御に大きな役割を果たす。Kisspeptin ニューロンは視床下部の前腹側室周囲核 (AVPV) と弓状核 (ARC) の 2 ヶ所に存在し、AVPV の kisspeptin ニューロンは GnRH, 黄体形成ホルモン (LH) のサージジェネレーターとして、一方、ARC の kisspeptin ニューロンは neurokinin B (NKB), dynorphin を共発現することから KNDy ニューロンと称され、これらの協働により KNDy ニューロンが GnRH, LH のパルスジェネレーターとして働くことが知られつつある。

本研究においては、老化に伴う視床下部弓状核の kisspeptin, NKB, dynorphin ニューロンの変化と、それが下垂体前葉からの LH のパルス状分泌にどのような様に関わるかについて検索した。2~3 ヶ月齢 (Young)、12~13 ヶ月齢 (Young-Middle)、19~22 ヶ月齢 (Late-Middle)、24~26 ヶ月齢 (Old) の雌雄 Wistar rat を用い、内因性性ホルモンの影響を取り除くため、実験 2 週間前に性腺摘除 (GDX) を行い、実験に用いた。右心房内に留置したカテーテルから 6 分間隔で 3 時間の連続採血を行い、RIA による血中 LH 濃度の測定を行った。採血後、深麻酔下にて 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳を剖出、50  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製し、弓状核の *Kiss1* (kisspeptin 遺伝子)、*Tac3* (NKB 遺伝子)、*Pdyn* (dynorphin 遺伝子) の *in situ* hybridization および kisspeptin, NKB, dynorphin A, GnRH の特異的抗体を用いた免疫組織化学を行い、陽性細胞数を計測、統計解析した。また、下垂体の GnRH への反応性の変化を検証するため、連続採血中に GnRH アゴニストを静脈内投与し血中 LH 濃度の変化を調べた。

雌では、LH パルス分泌は Young-Middle 以降、有意に低下した。弓状核の遺伝子発現は Young-Middle 以降に *Tac3* と *Pdyn* 発現細胞が有意に減少、Late-Middle 以降に *Kiss1* 発現細胞が有意に減少した。*Tac3* は *Kiss1* と *Pdyn* に比べ老齢期でも比較的高い割合でその発現が維持されていた。Kisspeptin, NKB, dynorphin A 免疫陽性細胞数は Young-Middle 以降、有意に低下した。雄では、その時期において、若干の違いがあるが、雌と同様の傾向を示した。一方、雌雄共に、GnRH 免疫陽性細胞数に有意差は認められなかった。全ての群において GnRH アゴニスト投与により血中 LH 濃度は有意に増加したが、雌雄共にその濃度は若齢と比べて Young-Middle 以降では有意に低下していた。雌雄共に、kisspeptin, NKB, dynorphin A 免疫陽性細胞数が低下した群では LH 分泌量が低下していた。

これらの結果から、弓状核 kisspeptin, NKB, dynorphin ニューロンの 3 つの神経ペプチドは加齢によって別々の発現低下パターンを示すことから、それぞれが独立して発現調節され、この発現変化の違い及び下垂体レベルでの GnRH への反応性の変化が、加齢に伴う LH パルス分泌低下の原因となる可能性が示唆された。本研究は加齢による生殖機能変化、閉経や更年期障害のメカニズム解明につながる重要な機能形態学的知見を見出したと言える。

二次審査では、老化に伴う kisspeptin 受容体の変化、kisspeptin ニューロンの軸索と GnRH ニューロンの接触状態、GnRH アゴニスト投与による下垂体 LH 分泌の変化の違いが生じるメカニズム、副腎皮質ホルモンの関与の可能性、ヒトの生殖機能研究への応用等について、多岐にわたる質疑が行われたが、何れも適切な回答がなされた。

本研究は、老化、閉経、更年期といった生殖機能の終焉の時期における kisspeptin ニューロンの変化と生殖機能調節への役割を世界で初めて調べ、報告した貴重な研究であり、基礎生殖生理学のみならず、臨床医学的研究への応用性も有する重要な知見を提供し、博士(医学)の学位論文として十分に価値あるものと認定した。