

論文内容の要旨

The increase in the number of spines on gonadotropin-releasing hormone neuron  
across pubertal development in rats

思春期発達にともなう性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)  
ニューロンのスパイン数の増加

日本医科大学大学院医学研究科 生体制御形態科学分野

大学院生 李 松子

Cell and Tissue Research (2015) 掲載予定

## 【背景及び目的】

思春期は個体が生殖能力を持つようになる発達時期で、生殖機能を制御する視床下部—下垂体—性腺軸の神経内分泌機能が成熟する。思春期の開始は視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone (GnRH))の分泌増加によって引き起こされるが、GnRH を分泌する GnRH ニューロンの活動がどのようなメカニズムにより変化するのは未だ明らかではない。

これまで様々な動物において GnRH ニューロンへの興奮性神経入力と思春期の開始に必要な働きをもつ可能性が示唆されてきた。スパインは神経細胞表面にみられる小突起で、興奮性神経入力のほとんどがスパイン上にあることが知られており、基本的にスパインの数はそのニューロンが受けている興奮性入力の数と相関すると考えられている。

我々は、性成熟に伴う GnRH ニューロンへの興奮性神経入力の変化を明らかにするため、思春期前後の GnRH ニューロンにおけるスパインの数と形態の変化を解析した。更に、スパインの変化と性成熟との関係性を明らかにするため、性成熟を障害する処置として知られる新生仔期高濃度エストロゲン処置を受けたラットについても同様の解析を行い、この場合に生じる GnRH ニューロンの形態変化について観察した。

## 【方法】

実験動物として、GnRH のプロモーターの制御下で GFP を発現する GnRH-EGFP トランスジェニックラットの思春期前の幼若個体 (3 週齢) と思春期後の成体 (8 週齢) を用いた。ペントバルビタールナトリウム (100mg/kg 以上) による深麻酔下で開胸、心臓より生理塩水、4%パラホルムアルデヒドを含む固定液の灌流による固定後、脳を凍結し、厚さ 50 $\mu$ m の凍結切片を作成した。

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて GnRH-EGFP 細胞を観察、撮影し、スパインの数と形態を解析した。スパインのヘッドの直径が 0.65 $\mu$ m 以下のものを small-type、0.65 $\mu$ m 以上を large-type、large-type の中で特に大きい 0.9 $\mu$ m 以上のヘッドを持つものを giant-type と分類し、それぞれの数の変化を解析した。

次に、新生仔期に高濃度エストロゲン (estradiol benzoate (EB)、雄: 500 $\mu$ g、雌: 100 $\mu$ g) の皮下投与を受けたラットの成体で同様の解析を行った。

## 【結果】

スパインの数は、雌雄ともに細胞体から 50 $\mu$ m 以内の樹状突起区間で最も多く、細胞体から離れるほど減少した。細胞体のスパイン数は、雄においては 3 週齢より 8 週齢で有意に増加した。また、雌においても増加する傾向が見られた。細胞体から 50 $\mu$ m 以内の樹状突起区間では、雄雌ともに 8 週齢でスパインの数が有意に増加した。50 $\mu$ m 以上離れた樹状突起区間では、雄雌ともに 3 週齢と 8 週齢の間で有意な差は見られなかった。

スパインの形態、特にヘッドの大きさは受けている神経入力の強度と密接に関連するた

め、スパインのヘッドのサイズによる分類を行った結果、**small-type** スパインは雄において細胞体で、**large-type** スパインと **giant-type** スパインは、雌雄ともに細胞体と 50 $\mu$ m 以内の樹状突起区間で有意に増加した。

EB 処置群においてスパインの分布パターンは対照群同様であった。一方、細胞体と 50 $\mu$ m 以内の樹状突起区間のスパイン数は、雌雄いずれでも EB 処置群において対照群と比して有意に減少した。そして、スパインのヘッドによる分類においては、EB 処理群で全ての種類のスパインの数が細胞体と 50 $\mu$ m 以内の樹状突起区間において有意な減少を示した。

### 【考察】

幼若個体に比べ成体で、細胞体と近位樹状突起においてスパイン数の増加がみられた。これはマウスを用いた先行研究と一致する結果であった。また、スパインの形態的特徴を用いた分類を行い、解析したところ、成体では大きなヘッドを持つスパインの数が細胞体と近位樹状突起で増加していることが明らかとなった。これらの結果は、**GnRH** ニューロンは性成熟にともない細胞体と近位樹状突起により多く、より大きな興奮性入力を受けるようになる可能性を示すものである。また、新生仔期の EB 処置により性成熟が障害されたラットでは通常の発達でみられるスパイン数の増加が見られなかった。このことは、正常な性成熟における神経性入力の変化の重要性を示唆している重要な知見と言える。

本研究により、**GnRH** ニューロンの細胞体と近位樹状突起における興奮性入力は性成熟にともない、より多く、より大きくなるという発達変化を示し、思春期開始時期の **GnRH** ニューロンの活動変化と密接な関連を持つ可能性が示唆された。