

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 性機能を調節する脊髄射精発生器ニューロンの脳への投射

越智拓海<sup>1,2,3,4</sup> 篠崎和歌子<sup>1</sup> 石割隆輔<sup>1</sup> 立石沙也加<sup>2</sup> 坂本浩隆<sup>2</sup> 小谷 享<sup>1,2</sup>

### Projection of Spinal Ejaculation Generator Neurons to the Brain

Takumi Oti<sup>1,2,3,4</sup>, Wakako Shinozaki<sup>1</sup>, Ryusuke Ishiwari<sup>1</sup>, Sayaka Tateishi<sup>2</sup>,  
Hirotaka Sakamoto<sup>2</sup> and Susumu Kotani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>3</sup> Ushimado Marine Institute (UMI), Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Setouchi City, Okayama 701-4303, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: oti-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** A spinal ejaculation generator (SEG) exists in the X layer of the rat spinal cord (lumbar spinal cord) at the L3-L4 level. SEG neurons express gastrin-releasing peptide (GRP) and oxytocin receptor (OXTR). We have previously reported that sexual experience induced the expressions of GRP and OXTR in SEG neurons. While SEG neurons project to the thalamic region and are thought to signal the completion of sexual behavior to the brain, it is still unclear where SEG neurons project to in the brain. The purpose of this study was to clarify the projection area of SEG neurons in the brain. Firstly, we analyzed the localizations of GRP-positive fibers in the brains of sexually experienced and naive male rats. GRP-positive fibers were observed in the parafascicular nucleus (PF), subparafascicular nucleus (SPF), and medial amygdala nucleus, posterodorsal part (MePD). In all cases, more GRP fibers were observed in sexually experienced males than in naive males. Secondly, we specifically lesioned SEG neurons using OXTR human diphtheria toxin receptor (Dtxr)-2A-channelrhodopsin-2-(ChR2)-EYFP transgenic rats. The number of SEG neurons was reduced by half compared with controls. GRP- and YFP-positive fibers in the MePD were significantly reduced in rats with a loss of SEG neurons compared with controls. No differences were found in other brain regions, suggesting that SEG neurons project to the MePD and that sexual experience enhances input from the SEG neurons to the MePD. In addition, sexual experience might increase the GRP expression not only in the SEG neurons but also in GRP neurons of the brain.

**Keywords:** lumbar-spinothalamic, gastrin-releasing peptide, oxytocin receptor, spinal cord, male sexual function

## 序論

ラット脊髄（腰髄）L3-L4 レベルの X 層に存在するガラニン発現ニューロンを特異的に破壊すると射精のみがなくなることから、腰髄には脊髄射精発生器 (SEG) ニューロンが存在することが知られている<sup>1)</sup>。SEG ニューロンではガラニン、コレスチキニン、エンケファリン、ガストリン放出ペプチド (GRP) といった神経伝達物質が発現する<sup>2,3)</sup>。我々はこれまでに SEG ニューロンにおける GRP 発現が男性ホルモ

ン・アンドロゲン依存的に調節され、下部腰髄で放出される GRP が勃起や射精といったオスの性機能を制御することを報告している<sup>4)</sup>。GRP ニューロンは雄優位な性的二型を示し、下部腰髄に存在する仙髄副交感神経核や球海綿体脊髄核へと投射する<sup>4,5)</sup>。球海綿体脊髄核 (SNB) はペニスの基部に存在し勃起に関わる筋肉（球海綿体筋）を支配する運動ニューロンで、脊髄での代表的な性的二型核として知られる。我々は、

超高圧電子顕微鏡技術や経シナプスのなウイストレーザーを用いて、GRPニューロンがSNBや脊髄自律神経核にシナプス入力することを明らかにしている<sup>5,7)</sup>。また、脊髄GRP線維は胸髄に存在する交感神経系にも投射する<sup>8)</sup>。そのため、SEGニューロンは胸髄(側角)においても末端からGRPを放出し、同時に腰一仙髄では勃起を制御する運動神経や副交感神経系を調節し、胸髄では射精に関わる交感神経系を調節する脊髄内局所神経ネットワークを構築すると考えられている<sup>8,9)</sup>。最近、我々はSEGニューロンがオキシトシン受容体(OXTR)を発現し、オキシトシンによるSEGニューロンの活性化が雄の性行動を促進することを発見した<sup>10)</sup>。また、性経験を積んだ雄ではSEGニューロンにおけるGRP発現とOXTR発現が増加することも明らかにしている<sup>11)</sup>。一方で、腰髄L3-L4レベルに存在するガラニン発現ニューロンは視床領域、特にmedial portion of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus (mSPFp)にも投射することから腰髄視床路(LSt)ニューロンとしても知られる<sup>1,12)</sup>が、視床領域への投射が雄の性行動をどのように制御しているかはよくわかっていない。そこで本研究では性経験によるGRP発現の変化と、SEGニューロンの特異的な破壊による脳のGRP線維の変化に着目し、LStニューロンの投射先を調べることを目的とした。

## 材料と方法

### 実験動物

雌雄成熟ラット(Wistar系統; 7-11週齢)とOxtrヒトジフテリア毒素受容体(hDTR)・チャンネルロドプシン(ChR2)トランスジェニック(Oxtr-YFP Tg)ラット雄<sup>10)</sup>(Wistar系統; 8-10週齢[岡山大学より供与])を用いた。明期12時間/暗期12時間の環境で、餌と水は自由に摂取できる状態で飼育した。動物実験は、文部科学省の「研究機関における動物実験に関する基本指針」に基づいて行い、岡山大学動物実験委員会、神奈川大学理学部動物実験安全要綱、神奈川大学理学部動物実験管理委員会の承認を受けて実施した。

### 性行動試験

先行研究に従い<sup>10)</sup>、人為的に発情させた雌ラットと雄ラットを性行動観察ケージに入れ、30分間の性行動実験を行い、複数週の射精(交尾)経験を持つ群を経験雄、飼育ケージに雄のみを入れた群を未経験雄とした。

### 腰髄L3-L4レベルX層へのジフテリア毒素投与

ヒトジフテリア毒素受容体を介した標的細胞ノックアウト法(toxin receptor-mediated cell knockout: TRECK法)を用いて、腰髄L3-L4レベルX層(図1)に局在するOXTR発現ニューロンの特異的な破壊を試みた。OXTR-YFP Tgラットをイソフルラン(1.5%, 1L/min)で吸入麻酔後、脳定位固定装置(ST-7R-HT, Narishige, Tokyo)および脊髄固定装置(STS-B, Narishige)に保定し、椎弓切除術を行い、脊髄表面を露出させた。脊髄正中線上の脊髄表面から1-1.5mmの位置にマイクロシリンジを刺入し、ジフテリア毒素(10 ng/ $\mu$ l)(01-517, Cosmo Bio CO.LTD, Tokyo, Japan)を0.4  $\mu$ l投与した。

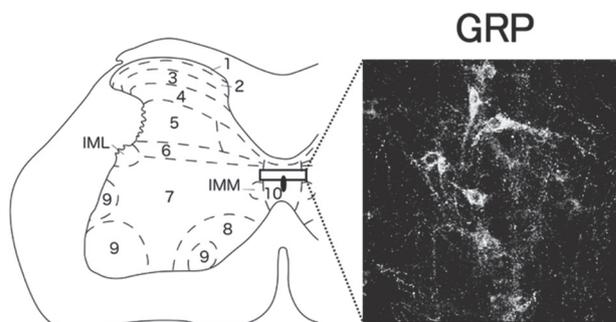


図1. ラット脊髄L3レベル横断面の模式図と脊髄GRPニューロン。脊髄は10の層に分けられ、性機能を制御する脊髄GRPニューロンは10(X)層の中心管背側部(四角)に存在する。IML, 中間質外側柱。IMM, 中間質内側柱。

### 免疫染色

ラットに三種混合麻酔(ドミトール0.3 mg/kg、ミダゾラム4.0 mg/kg、ベトルファール5.0 mg/kg)を腹腔内投与し、深麻酔下で左心室から生理食塩水を灌流して脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Phosphate-buffer (PB) (pH 7.4) 溶液を灌流し、固定した。脳と脊髄を摘出した後、4% PFA in 0.1 M PBを用いて4°C、一晩で後固定を行なった。25%スクロース in Phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) 溶液に移し、4°C、48時間以上かけて置換し、凍結保護を行った。トリミング後、炭酸ガスで急速冷凍し、クリオスタット(CM1850, Leica, Nussloch, Germany)を用いて、30- $\mu$ m厚の凍結切片を作製した。切片をPBSで洗浄した後、内因性ペルオキシダーゼを失活させるために、1.0%過酸化水素/60%メタノール溶液に20分間浸漬し、その後PBSで洗浄した。さらに、0.3% Triton X-100、1%正常ヤギ血清、1%ウシ血清アルブミン、0.05% Na<sub>3</sub>Nを用いて室温で30分反応させ、ブロッキングした。抗ラット Neuromedin-C (GRP) 抗体(ウサギ、11081; AssayPro, St. Charles, MO, RRID:

AB\_2571636 ; ブロッキングバッファーで 1:2,000 に希釈) を用いて室温で 1 時間反応させたのち、4°C で 1 晩反応させた。免疫反応産物は streptavidin-biotin kit (Nichirei, Tokyo, Japan) と 3'-ジアミノベンジジン (DAB) を用いて可視化した。脱水透徹を行ったのち、マウントクイック (Daido Sangyo CO., LTD. Japan) で封入した。光学顕微鏡 (BX53; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて画像を取得した。

YFP シグナルと GRP 免疫蛍光を検出する目的で、green fluorescent protein (GFP) に対する抗体 (chicken, 600-901-215; Rockland, Gilbertsville, PA, RRID: AB\_1537402, 1:2000 希釈) と抗 GRP 抗体 (1:1000 希釈) を使用し、Alexa Fluor 488-linked anti-chicken IgG raised in goats (1:1,000 希釈; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) と Alexa Fluor 555-linked anti-rabbit IgG raised in goats (1:1,000 希釈; Molecular Probes) を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) を用いて封入した。染色した切片は蛍光顕微鏡 (BX53, Olympus) または共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察し、画像を取得した。

### 画像解析

未経験雄 (n = 5) と経験雄 (n = 6) の横断脳切片に対し、GRP に対する免疫染色を行い、束傍核 (parafascicular nucleus: PF)、視床中心傍核 (subparafascicular nucleus: SPF)、扁桃体内側核尾部腹側部 (medial amygdala nucleus, posterodorsal part: MePD) の写真を 1 個体当たり 10 枚撮影した。撮影した画像を白黒反転させ、画像解析ソフト ImageJ (Version 1.45p; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて GRP 免疫陽性を黒色、それ以外の部分を白色化して表した。黒色のシグナルのみを検出し、そのピクセル数を数値化し、未経験雄の GRP 免疫陽性強度の平均を '1' とした相対値を用いて GRP 免疫陽性強度を比較した。また、蛍光画像の解析では、PBS を投与した OxTR2 ラット (コントロール; 3 匹) およびジフテリア毒素投与を投与した OxTR2 ラット (3 匹) の横断脳切片に対し、GRP と GFP に対する免疫染色を行い、MePD 領域の写真を 1 個体あたり 10 切片撮影した。撮影した画像を白黒反転させ、画像解析ソフト ImageJ (Version 1.45p; National Institutes of Health) を用いて GRP あるいは GFP 免疫陽性を黒色、それ以外の部分を白色化して表した。黒色のシグナルのみを検出し、そのピクセル数を数値化し、PBS を投与したコントロール群の GFP 免疫陽性強

度を '100%' とした相対値を用いてジフテリア毒素投与群での GFP 免疫陽性強度を比較した。

### 定量解析

各群のデータを平均値±標準誤差で示し、対応のない *t* 検定を用いて解析した。

## 結果

### 性経験による視床・視床下部領域での GRP 線維の変化

性経験のない雄ラットと性経験を積んだ雄ラットの前脳において、GRP 陽性線維の局在を解析した (図 2)。その結果、束傍核 (parafascicular nucleus: PF)、視床中心傍核 (subparafascicular nucleus: SPF)、扁桃体内側核尾部腹側部 (medial amygdala nucleus, posterodorsal part: MePD) において GRP 陽性線維が観察され、3 領域全てにおいて経験雄の方が未経験雄に比べて GRP 線維が多く観察された (図 1)。これらを定量的に解析した結果、GRP 陽性

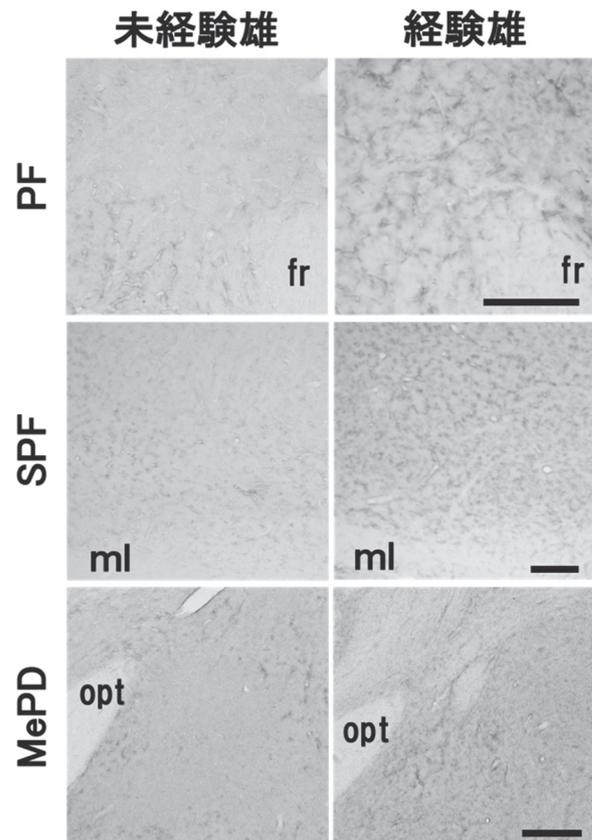


図 2. 雄ラット前脳におけるガストリン放出ペプチド (GRP) 線維の局在と交尾経験差。束傍核 (parafascicular nucleus: PF)、視床中心傍核 (subparafascicular nucleus: SPF)、扁桃体内側核尾部腹側部 (medial amygdala nucleus, posterodorsal part: MePD) において GRP 陽性線維が観察され、3 領域全てにおいて経験雄の方が未経験雄に比べて GRP 線維が多く観察された fr: 反屈束, ml: 内側毛帯, opt: 視索。スケールバー, 200  $\mu$ m。

強度は、PFにおいて未経験雄(n=5)で $1.00 \pm 0.12$ 、経験雄(n=6)で $3.90 \pm 0.58$ 、SPFでは未経験雄で $1.00 \pm 0.08$ 、経験雄で $2.72 \pm 0.51$ 、MePDでは未経験雄で $1.00 \pm 0.05$ 、経験雄で $2.65 \pm 0.23$ と有意に増加し( $P < 0.05$ )、交尾経験により、各領域におけるGRP陽性線維は2倍から4倍に増化することを明らかにした(表1)。

領域	未経験雄 (n=5)	経験雄 (n=6)	P値
PF	$1.00 \pm 0.12$	$3.90 \pm 0.58$	0.0034
SPF	$1.00 \pm 0.08$	$2.72 \pm 0.51$	0.033
MePD	$1.00 \pm 0.05$	$2.65 \pm 0.23$	0.0012

PF: 束傍核, SPF: 視床中心傍核, MePD: 扁桃体内側核尾部腹側部.

表1. 各脳領域における未経験雄のGRP陽性強度を‘1’とした時の経験雄のGRP染色強度.

### SEGニューロン破壊後のMePDにおけるGRP線維とOXTR線維の変化

ジフテリア毒素投与によるSEGニューロンの破壊を確認する目的で、脊髄においてGRPに対する免疫染色を行った。脊髄におけるYFP陽性ニューロンはコントロール群で $518 \pm 36$ 個、毒素投与群で $289 \pm 24$ 個と毒素投与によりYFPニューロンが半減した。また、GRP陽性ニューロン数はコントロール群で $520 \pm 18$ 個、毒素投与群で $265 \pm 26$ 個と、毒素投与によりGRP陽性ニューロンも半減した。次に、脳において、GRPに対する免疫染色を行い、ジフテリア毒素投与によりGRP線維が減少する領域を調べた。その結果、MePDにおいてYFP陽性線維、GRP陽性線維が観察され、毒素投与群ではコントロール群に比べてYFP陽性線維、GRP陽性線維が減少していた(図3)。これらの画像をもとにMePDにおけるYFP蛍光強度とGRP陽性強度を定量化した。結果、YFP蛍光強度は毒素投与群ではコントロール群の約75%まで減少していた(図4)。同様に、GRP陽性強度は毒素投与群ではコントロール群の約52%まで減少していた(図4)。また、今回観察した限りでは、MePD以外の領域でYFP陽性線維、GRP陽性線維の変化はみられなかった。

### 討論

今回、交尾経験雄ラットを用いることで、これまで交尾未経験雄ではほとんど観察されなかった前脳領域におけるGRP線維の投射を明らかにすることに成功した。脊髄に存在するGRPニューロンも交尾経

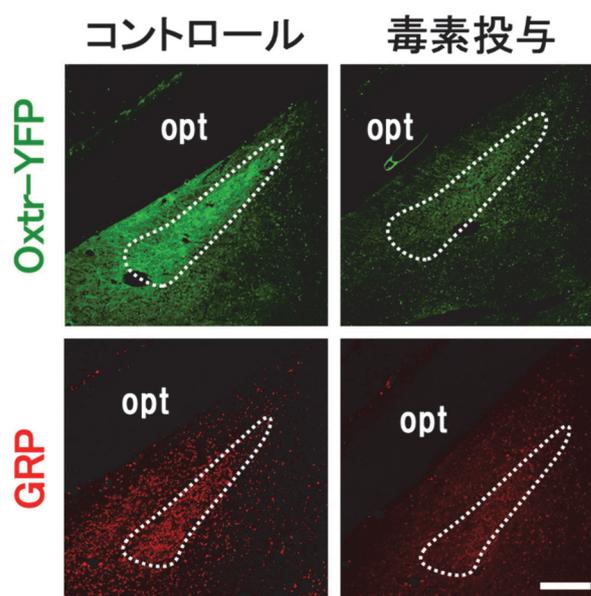


図3. SEGニューロンの破壊と脳におけるSEGニューロン線維. MePDにおいて、脊髄に毒素を投与した群ではコントロール群に比べて、YFP陽性(OXTR)線維とGRP陽性線維が減少した. Opt, 視索. スケールバー, 200  $\mu$ m.

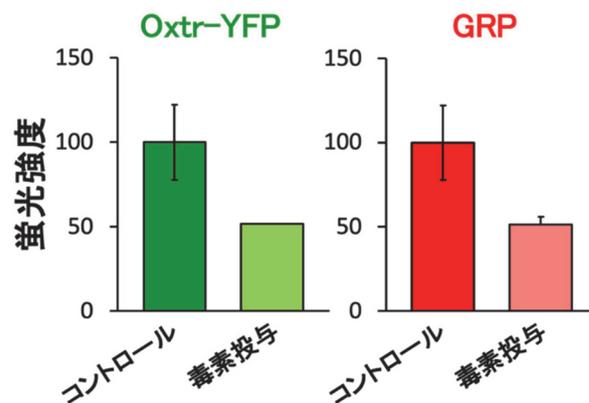


図4. 毒素投与によるYFP陽性(OXTR)線維とGRP陽性線維の蛍光強度の変化. コントロール群の蛍光強度の平均を100とし、平均±標準誤差で示した.

験によりGRP発現が増加する<sup>11)</sup>ことから、今回発見したPF、SPF、MePDのGRP線維は脊髄GRPニューロン由来である可能性が高い。また、ジフテリア毒素により、脊髄GRPニューロンが半減し、MePDにおけるGRP陽性線維が減少した。YFP陽性(OXTR)ニューロンでも同様の結果が得られたことから、MePDが脊髄GRPニューロンの投射先である可能性が高い。

交尾経験を積んだ雄では性行動が活発になる<sup>13)</sup>。また、交尾経験は、視床下部の性行動に関わる視床下部視索前野に存在するニューロン樹状突起の棘突起を成熟させることが知られている<sup>14)</sup>。また、脊髄GRPニューロンにおいて、交尾経験はGRPや

OXTR の発現を増加させる<sup>11)</sup>。今回、交尾経験がない雄では GRP 線維がほとんどみられない脳領域においても交尾経験を積んだ雄では GRP 線維が多数観察された。これらのことから、交尾経験による変化着目して解析を行うことで、新規の神経投射や行動制御メカニズムを明らかにできるかもしれない。

今回 GRP 線維が観察された PF、SPF、MePD では射精後に神経活性化マーカーの発現が増加することが知られている<sup>15,16)</sup>。また、交尾経験のある雄ラットにおいて、MePD は発情雌の匂いに応答する領域としても知られている<sup>15)</sup>。射精に至ったシグナルを脊髄 GRP ニューロンが MePD へと伝えることで、雌へのモチベーションを抑制し、性行動の完了を定義するのかもしれない。今後、MePD の GRP 受容体ニューロンを特異的に破壊したラットで脊髄 GRP ニューロンを活性化し、雄の性行動がどのように変化するかを解析することで、LSt ニューロンによる性行動時のフィードバックメカニズムを明らかにできると考えている。

## 謝辞

本研究は、2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202206) を受けて行われた。記して感謝する。

## 文献

- 1) Truitt WA and Coolen LM (2002) Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* **297**: 1566-1569.
- 2) Coolen LM (2005) Neural control of ejaculation. *J. Comp. Neurol.* **493**: 39-45.
- 3) Sakamoto H (2012) Brain-spinal cord neural circuits controlling male sexual function and behavior. *Neurosci. Res.* **72**: 103-116.
- 4) Sakamoto H, Matsuda K-I, Zuloaga DG, Hongu H, Wada E, Wada K, Jordan CL, Breedlove SM and Kawata M (2008) Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal cord controls male reproductive functions. *Nat. Neurosci.* **11**: 634-636.
- 5) Sakamoto H, Arai T and 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.
- 6) Dobberfuhl AD, Oti T, Sakamoto H and Marson L (2014) Identification of CNS neurons innervating the levator ani and ventral bulbospongiosus muscles in male rats. *J. Sex. Med.* **13**: 664-677.
- 7) Oti T, Satoh K, Saito K, Murata K, Kawata M, Sakamoto T and 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.
- 8) Kozyrev N, Lehman MN and Coolen LM (2012) Activation of gastrin-releasing peptide receptors in the lumbosacral spinal cord is required for ejaculation in male rats. *J. Sex. Med.* **9**: 1303-1318.
- 9) Sakamoto H (2014) Sexually dimorphic nuclei in the spinal cord control male sexual functions. *Front Neurosci.* **8**: 184 eCollection 2014.
- 10) Oti T, Satoh K, Uta D, Nagafuchi J, Tateishi S, Ueda R, Takanami K, Young LJ, Galione A, Morris JF, Sakamoto T, and Sakamoto H (2021) Oxytocin Influences Male Sexual Activity via Non-synaptic Axonal Release in the Spinal Cord. *Curr Biol.* **31**: 103-114 e105.
- 11) Oti T, Ueda R, Kumagai R, Nagafuchi J, Ito T, Sakamoto T, Kondo Y, and Sakamoto H (2021) Sexual Experience Induces the Expression of Gastrin-Releasing Peptide and Oxytocin Receptors in the Spinal Ejaculation Generator in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 10362.
- 12) Coolen LM, Veening JG, Wells AB, and Shipley MT (2003) Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: evidence for functional subdivisions. *J. Comp. Neurol.* **463**: 132-156.
- 13) Nutsch VL, Will RG, Hattori T, Tobiansky DJ, and Dominguez JM (2014) Sexual experience influences mating-induced activity in nitric oxide synthase-containing neurons in the medial preoptic area. *Neurosci. Lett.* **579**: 92-96.
- 14) Jean A, Bonnet P, Liere P, Mhaouty-Kodja S, and Hardin-Pouzet H (2017) Revisiting medial preoptic area plasticity induced in male mice by sexual experience. *Sci. Rep.* **7**: 17846.
- 15) Hosokawa N, and Chiba A (2005) Effects of sexual experience on conspecific odor preference and estrous odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in male rats. *Brain Res.* **1066**: 101-108.
- 16) Veening JG, and Coolen LM (1998) Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav. Brain Res.* **92**: 181-193.