

主論文の要約

The role of preoptic area (POA)/
anteroventral periventricular nucleus (AVPV)
kisspeptin neurons in mammalian reproduction
(視索前野 (POA)／前腹側室周囲核 (AVPV)
キスペプチンニューロンの哺乳類の生殖における役割)

名古屋大学大学院生命農学研究科
生命技術科学専攻
生物機能技術科学講座
生殖科学

渡辺雄貴
2016 年 3 月

【第一章：緒言】

近年、農作物に甚大な損害をもたらすサル被害が全国で多発しており、その被害額は年間 16 億円にもものぼる（農林水産省：平成 23 年度全国の野生鳥獣による農作物被害状況について）。こうしたサルによる農作物被害を軽減するために、被害を起こすサルの個体数調節が望まれている。一方で、畜産の現場において、ウシの卵巢嚢腫などの排卵障害の多発による受胎率低下が、家畜の空胎率をあげ、結果として畜産経営を圧迫する要因のひとつとなっており、受胎率向上に向けさまざまな角度からの繁殖技術の向上が必要とされる。こうしたサル被害を軽減するためのサルの個体数調整や、家畜の繁殖技術を向上するための解決策のひとつに繁殖機能をコントロールする方法が考えられる。繁殖機能をコントロールするためには、雌雄哺乳類の繁殖機能中枢の制御メカニズムの解明が必要である。

哺乳類の繁殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸で高度に制御されている。視床下部内に細胞体をもつ性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）ニューロンは、下垂体門脈にその軸索を伸ばし、正中隆起部の下垂体門脈血中に GnRH を分泌する。下垂体門脈中に分泌された GnRH は下垂体前葉へ運ばれ、性腺刺激ホルモン産生細胞に作用し、黄体形成ホルモン（LH）と卵胞刺激ホルモン（FSH）の分泌を促す。これら性腺刺激ホルモンは、卵巢または精巣に作用し、性ステロイド（エストロジェン、プロジェステロン、アンドロジェン）の分泌を促す。これら性ステロイドは、視床下部へフィードバック作用を及ぼし、卵胞発育や排卵、精子形成を制御する。

Kiss1 遺伝子によってコードされるキスペプチンは、GnRH、ひいては LH の分泌を強力に促す神経ペプチドである。キスペプチンニューロンには、エストロジェン受容体 α が発現していることから、同ニューロンが、エストロジェンの GnRH/性腺刺激ホルモン分泌へのフィードバックを仲介すると考えられる。キスペプチンニューロンは、哺乳類の視床下部前方部および後方部の 2 カ所に局在している。視床下部前方部のキスペプチンニューロン細胞体は、サルでは視索前野（POA）に、ラットやマウスなどでは前腹側室周囲核（AVPV）に局在する。一方、後方部の同ニューロン細胞体は、いずれの哺乳類においても弓状核（ARC）に局在している。

本学位論文では、ニホンザルおよびラットを用いて、POA/AVPV のキスペプチンニューロンの雌雄哺乳類の生殖における役割を明らかにすることを目的とする。

【第二章：雌雄ニホンザルにおけるエストロジェンによる POA キスペプチンニューロンの活性化および LH サージの発生】

第二章では、ニホンザルの LH サージ制御機構を解明することを目的として、雌雄ニホンザルにおける LH サージ、*KISS1* 遺伝子発現およびキスペプチンニューロンの活性化におよぼすエストロジェンの影響、およびその性差について検討した。成熟雌雄ニホンザルの性腺を除去し、エストラジオールベンゾエイト (EB) を投与すると、投与後 24-36 時間後をピークとする明瞭な LH サージが観察された。EB 投与の 24 時間後に灌流固定をおこない、視床下部を採取した。凍結切片を作製後、*in situ* hybridization 法により *KISS1* 遺伝子発現細胞を検出するとともに、免疫組織化学法により c-Fos 発現を検出した。対照群である性腺除去群および EB 投与群において、POA と ARC に *KISS1* 遺伝子発現細胞が確認された。雌雄ともに POA における *KISS1* 遺伝子発現細胞数および c-Fos 共発現細胞数は、EB 投与により 6 倍以上に増加した。一方、ARC における *KISS1* 遺伝子発現細胞数は、EB 投与により変化しなかった。以上の結果から、ニホンザルにおいて、雌雄ともに POA のキスペプチンニューロンがエストロジェンの正のフィードバック作用を仲介し、LH サージを誘起する可能性が示唆された。

【第三章：オス由来の嗅覚刺激によるメスラット AVPV キスペプチンニューロンの活性化および LH 分泌の増加】

第三章では、嗅覚刺激が繁殖機能に及ぼす影響を明らかにするために、嗅覚刺激としてオスラットを飼育していた床敷、またはメスラットを飼育していた床敷を用い、他個体由来の床敷き曝露が、メスラットのキスペプチンニューロンおよび LH 分泌に及ぼす影響を検討した。Wistar-Imamichi 系統成熟メスラットを卵巣除去し、高濃度エストロジェン処置を施した (OVX+E2 処置)。オスラットを 1 週間飼育したケージ、またはメスラットを一週間飼育したケージからそれぞれラットを取り除いたケージを、それぞれオス床敷曝露群、メス床敷曝露群とした。また、対照群として未使用床敷をいれたケージを用意した。各ケージへ OVX+E2 処置メスラットを移し、その 1 時間後に、メスラットの脳を採取した。凍結切片を作製後、*in situ* hybridization 法により *Kiss1* 遺伝子発現細胞を検出するとともに、免疫組織化学法により c-Fos 発現を検出した。さらに、同様の処置および各ケージへ曝露したメスラットを用い、各ケージへの曝露後から 1 時間間隔で 8 時間採血し、LH 分泌への効果を検証した。オス床敷き曝露により、メスラットの AVPV において c-Fos を共発現したキスペプチンニューロン数は、未使用床敷の入ったケージおよびメス床敷曝露に移したメスと比較し、有意に増加した。一方、メス床敷曝露群では、未使用床敷およびオス床敷曝露群よりも有意に少ない c-Fos を共発現したキスペプチンニューロン数を示した。弓状核では、c-Fos を共発現するキスペプチンニューロン数は、3 群間において有意な差は認め

られなかった。またオス床敷曝露開始直後より、メスラットにおける血中 LH 濃度が増加し、曝露開始から 8 時間までの LH 濃度曲線下面積および LH サージのピーク値は対照群と比べ有意に高かった。以上の結果より、オスラット由来の化学物質を介した嗅覚刺激によってメスラットの AVPV のキスペプチンニューロンが活性化することで LH サージが増強する可能性が示唆された。また、メス床敷曝露により、AVPV の活性化キスペプチンニューロンが抑制されることが明らかとなった。また、メス床敷曝露による LH 分泌への影響は認められなかった。

【第四章：メスラットとの同居刺激によるオスラットの *Kiss1* 発現】

第四章では、オスラットのキスペプチンニューロンに着目し、メス個体の有無によりオスラットの *Kiss1* 遺伝子発現が変化するか否かを検討した。オスラットの LH と、それに続くテストステロン分泌は、メスラットとの同居によって速やかに促進される。この現象は、オスの性行動を強化するのに寄与すると考えられる。実験には、未使用床敷をいれたケージ（未使用床敷曝露群）、OVX+E2 処置したメスラットを一週間飼育した床敷をいれたケージ（メス床敷曝露群）、および OVX+E2 処置したメスラットを一週間飼育した床敷に加え、OVX+E2 処置したメスラットを入れたケージ（メス同居群）の 3 種類の刺激を用意した。それぞれのケージへ、Wistar-Imamichi 系統の成熟オスラットを曝露し、その 5 分後にオスラットの脳を灌流固定した。脳内の *Kiss1* 遺伝子の発現は *in situ* hybridization により検討した。また、別の成熟オス個体を用い、先ほどと同様のケージへの曝露から 6 分間隔で 1 時間、血液を採取し、血中 LH 濃度を測定した。メスラットと同居させたすべてのオスラットが 5 分以内に、メス外生殖器への探索行動を示し、一部は交尾行動を示した。未使用床敷曝露群、メス床敷曝露群と比較して、メス同居群のオスラットの AVPV における *Kiss1* 遺伝子発現細胞数は 2 倍に増加し、有意に高い値を示した。一方、弓状核や扁桃体内側核における *Kiss1* 遺伝子発現細胞数は、メスラットとの同居により増加傾向にあったが、他 2 群との間に有意な差は認められなかった。また、メスラットとの同居開始直後よりオスの血中 LH 濃度が増加し、LH 総分泌量（メス個体との同居開始から 1 時間までの LH 分泌曲線下面積）は他 2 群と比べ有意に高かった。以上の結果より、メスとの同居によるオスラットの LH 分泌、ひいてはテストステロン分泌の上昇に、オスの AVPV における急激な *Kiss1* の発現増加が関わっていることが示唆された。オスにおける AVPV のキスペプチンニューロンの新たな役割として、性行動の強化に関与している可能性が示唆された。

【第五章：考察】

第二章では、メスニホンザルにおいて POA のキスペプチンニューロンがエストロジェンの LH サージを誘起するポジティブフィードバックの標的部位であることを示した。この結果は、これまで報告されてきたラットやマウス、交尾排卵動物のシンクスの結果とも一致し、動物種や排卵様式に依らず、視床下部前方部のキスペプチンニューロンが LH サージを誘起する中枢であることを示した。げっ歯類では、排卵を制御する視床下部前方部 AVPV のキスペプチンニューロンの発現には性差があり、発達期のオス個体でみられる性ステロイドの影響によってオスの AVPV のキスペプチンニューロンの数は、メスよりも有意に少ない。そのため、げっ歯類のオスでは外因性にエストロジェンを投与しても LH サージが誘起されない。一方で、本研究の結果より、ニホンザルは雌雄ともにエストロジェンにより POA のキスペプチンニューロンが活性化し LH サージを誘起することから、LH サージを司る脳機能に性差がないことが明らかとなった。霊長類のオス個体もげっ歯類のオス個体と同様に、発達期に性ステロイドの上昇がみられるが、本研究により、霊長類における LH サージ発生メカニズムは発達期の性ステロイドによる影響を受けていないことが示唆された。これはげっ歯類とは異なる知見であり、学術的にも意義深い結果を得た。

第三章では、オス由来の嗅覚刺激により、メスラットの AVPV キスペプチンニューロンにおける活性化細胞の数が増加し、GnRH/LH サージが増加したことを明らかにした。このことから、このキスペプチンニューロンが嗅覚刺激の標的部位として機能していることを示した。この機構は、オスと出会ったときに確実に排卵するための仕組みであると考えられる。

第四章では、メス個体との同居により、オスラットの AVPV の *Kiss1* 遺伝子発現細胞が増加し、血中の LH 濃度が増加することを示した。哺乳類のオスでは、血中 LH 濃度が増加すると、血中テストステロン濃度が増加する。テストステロン濃度の増加は、オスラットの性行動を亢進することが明らかにされている。オスにおける POA/AVPV のキスペプチンニューロンの役割として、血中 LH ひいてはテストステロン濃度を高めることで、オスの性行動に関与している可能性を示した。

以上、本研究をまとめると、POA/AVPV のキスペプチンニューロンが、メスでは排卵中枢として機能しており、オスでは性行動の亢進に関与している可能性を示した。さらに、メスでは排卵をより確実に起こすために、オスでは、テストステロン分泌を促し交尾行動を持続させるために、それぞれ嗅覚刺激の標的ニューロンおよびメスとの直接的な接触刺激の標的ニューロンとして機能する可能性を示した。