

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

Roles of hypothalamic kisspeptin in the control of ovarian functions in cattle (ウシの卵巣機能制御における視床下部キスペプチンの役割)

氏名 難波 陽介

論文内容の要旨

近年、畜産現場では人工授精によるウシの受胎率の低下が問題となっている。受胎率の低下は、乳量や肉質などの遺伝的改良に伴う繁殖機能の低下に起因すると指摘されている。受胎率向上のための解決策の一つとして、ホルモン製剤を用いたウシの繁殖機能制御が考えられる。

ウシを含む多くの哺乳類の繁殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸による神経内分泌機構に制御されている。間脳視床下部に局在する性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンは、下垂体から黄体形成ホルモン (LH) および卵巣刺激ホルモン (FSH) 分泌を刺激し、LH および FSH は卵巣に作用して卵巣発育および排卵を刺激する。卵巣発育は基底レベルに放出される GnRH および性腺刺激ホルモンを介して刺激されており、GnRH および LH の血中濃度は、基底レベルから急激に上昇したのち指数関数的に減少する、いわゆるパルス状の分泌様式を示す。一方、成熟した卵巣は発情ホルモンであるエストロジェンを大量に分泌し、脳へフィードバックして作用することでウシの発情行動を誘起するとともに、GnRH、つづいて LH および FSH のサージを誘起する。LH サージが引き金となり、成熟した卵巣は排卵する。GnRH は合成が容易なペプチドであり、GnRH 製剤を末梢に投与することで LH および FSH 分泌をサージ状に促し、排卵を誘起することができる。しかしながら、GnRH 製剤は、その強力な作用のため機能的に未熟な卵巣までも排卵させてしまい、自然に排卵した時に比べて人工授精した際に受胎率が低いことが問題点として指摘されている。

キスペプチンは視床下部において GnRH 分泌を刺激する因子として注目されている神経ペプチドである。多くの哺乳類において、キスペプチンニューロンが GnRH のパルス状分泌やサージ状分泌の発生に密接に関わることが明らかとなってきた。そこで私は、キスペプチンが受胎率向上に寄与する新規繁殖機能制御剤となるのではないかと考えた。本研究では、ウシにおいて視床下部キスペプチンニューロンが GnRH お

よび性腺刺激ホルモン分泌を刺激し、その結果として卵胞発育および排卵を制御しているとの仮説のもと、ウシの卵巢機能制御における視床下部キスペプチンの役割を解明すること、および、キスペプチンをウシの新規繁殖機能制御剤として応用することを目的とした。

第3章では、ウシ視床下部において、キスペプチンニューロンが GnRH 分泌の制御に果たす役割を調べることを目的とした。黒毛種未経産ウシおよび交雑種未経産ウシを供試した。プロジェステロン徐放製剤を6日間投与し、抜去した後プロスタグランジン (PG) F_{2α} を投与して黄体退行を誘導した。PGF_{2α} 投与2日後を卵胞期、投与後に動物の発情を観察した日から7日後を黄体期のモデルとした。卵胞期および黄体期のウシの脳を、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、視床下部を採取した。50 μm 厚の凍結切片を作製し、キスペプチンおよび GnRH の蛍光二重免疫組織化学染色を行った。その結果、キスペプチンニューロン免疫陽性細胞が視床下部内側視索前野 (MPOA) および視床下部弓状核 (ARC) に局在し、キスペプチンニューロン免疫陽性の神経線維が、MPOA においては GnRH ニューロン免疫陽性細胞に、正中隆起 (ME) においては GnRH ニューロン免疫陽性の神経線維に密接して局在していた。また、MPOA におけるキスペプチン免疫陽性の蛍光強度が黄体期と比較して卵胞期に高いこと (p<0.05)、また、ARC においては卵胞期および黄体期で変化しないことが明らかとなった。つぎに、キスペプチン、および、エストロジェン受容体 (ER) α またはプロジェステロン受容体 (PR) を蛍光二重免疫組織化学染色するとともに、DAPI により対比染色をした。その結果、卵胞期の MPOA において、キスペプチン免疫陽性細胞数が黄体期と比較して有意に (p<0.05) 多かった。一方、ARC のキスペプチン免疫陽性細胞数に変化はなかった。また MPOA および ARC のキスペプチン免疫陽性細胞はいずれも ERα または PR を共発現していた。キスペプチンおよび ERα または PR の免疫陽性細胞の共存率は MPOA および ARC いずれにおいても、黄体期と比較して卵胞期に有意に高かった (p<0.05)。これらの結果より、ウシ視床下部においてキスペプチンニューロンは GnRH ニューロンに直接投射し、GnRH の分泌を制御することが示唆された。また、MPOA のキスペプチンニューロンは、卵胞期に発現が高く、性ステロイド受容体を持つことから、エストロジェンのポジティブフィードバック作用を仲介して GnRH サージの発生に関与することが示唆された。また、ARC のキスペプチンニューロンは、卵胞期および黄体期に半数以上のキスペプチンニューロンが性ステロイド受容体を共発現することから、エストロジェンおよびプロジェステロンのネガティブフィードバック作用を仲介して GnRH 分泌を制御することが示唆された。

第4章では、キスペプチンが性腺刺激ホルモン分泌および卵巢機能の制御に関与するか否かを調べるとともに、ウシ卵巢機能を制御する新規繁殖機能制御剤としてのキスペプチンの可能性を検討することを目的とした。そこで、ウシにおいて全長キスペプチン (Kp-53) の末梢投与が性腺刺激ホルモン分泌を刺激し、卵胞発育または排卵を促すかどうか検討した。黄体期にある黒毛和種経産雌ウシに PGF_{2α} を投与し、黄体退行を誘導した。PGF_{2α} 投与後、動物の発情を観察した日から5日後に、Kp-53 (0.2

または 2 nmol/kg) または生理食塩水を静脈内投与した。投与 4 時間前から投与 4 時間後まで 10 分間隔で採血し、血漿中 LH および FSH 濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。また、超音波画像診断装置により、第 1 卵胞発育波主席卵胞の直径を投与 6 時間前から投与後 54 時間後まで 12 時間間隔で観察した。その結果、2 nmol/kg の Kp-53 の静脈内投与により、血漿中 LH 濃度が顕著に上昇した ($p<0.05$)。一方、血漿中 FSH 濃度は、Kp-53 投与後に上昇する傾向がみられたが、有意な差はなかった。また、2 nmol/kg の Kp-53 を投与した 4 頭中 3 頭において、投与の 2 日後までに卵胞直径の有意な増加が見られ($p<0.05$)、4 頭中 1 頭では投与後 30 時間までに排卵が観察された。これらの結果から、キスペプチンが性腺刺激ホルモン分泌を介して、卵胞発育または排卵を促すことが示唆された。

キスペプチン C 末端の 10 アミノ酸残基からなる部分ペプチド (Kp-10) は、キスペプチンの生理活性を有するコアペプチドである。第 5 章では、キスペプチンを改変した類縁体が生理活性を持ち、卵胞発育や排卵を促す新規繁殖機能制御剤として有用か否かを検討することを目的とした。そこで、Kp-10 を改変した類縁体である TAK-683 の末梢投与が卵巣機能および性腺刺激ホルモン分泌におよぼす効果を検討した。黄体期にある黒毛和種経産雌ウシに、PGF_{2α} を投与し、黄体退行を誘導した。PGF_{2α} 投与後、動物の発情を観察した日から 5 日後に、TAK-683 (2 nmol/kg) または 0.45%ジメチルスルホキシド含有生理食塩水を静脈内投与した。投与 4 時間前から投与 8 時間後まで 10 分間隔で採血し、血漿中 LH および FSH 濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。また、超音波画像診断装置により、第 1 卵胞発育波主席卵胞の直径を投与直前から投与 28 時間後まで 4 時間間隔で観察した。その結果、2 nmol/kg の TAK-683 投与群において、血漿中 LH 濃度が 4 時間以上にわたり顕著に上昇した ($p<0.05$)。一方、血漿中 FSH 濃度は TAK-683 投与後に上昇する傾向がみられたが、有意な差はなかった。2 nmol/kg の TAK-683 を投与した群において、投与後に卵胞直径の有意な増加が見られ($p<0.05$)、5 頭中 2 頭では投与後 42 時間までに排卵が観察された。これらの結果から、TAK-683 は卵胞発育および排卵を誘起する強力な活性を持ち、キスペプチン類縁体がウシの新規繁殖機能制御剤となる可能性が示された。

以上、本研究により、1)ウシ視床下部においてキスペプチンニューロンが MPOA および ARC に局在すること、2)キスペプチンニューロンが GnRH ニューロンに密接していること、3)MPOA においてキスペプチン発現が卵胞期に高まること、4)キスペプチンニューロンが性ステロイド受容体を発現していること、および、5)キスペプチンまたは類縁体の末梢投与が性腺刺激ホルモンおよび卵胞発育または排卵を促すことが明らかとなり、ウシ視床下部においてキスペプチンニューロンは GnRH および性腺刺激ホルモン分泌を介して卵胞発育または排卵を促すことが示唆された。また、キスペプチンまたはその類縁体がウシの新規繁殖機能制御剤として応用できることが示唆された。