

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 難波 陽介

論文 題目

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)

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	大蔵	聡
委員	名古屋大学教授	東村	博子
委員	名古屋大学准教授	松田	二子
委員	名古屋大学助教	上野山	賀久
委員	(独)農業生物資源研究所 ユニット長	岡村	裕昭

論文審査の結果の要旨

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。この受胎率の低下は、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。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る。視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）分泌により、下垂体から黄体形成ホルモン（LH）および卵胞刺激ホルモン（FSH）分泌が制御され、LH および FSH は卵巣に作用して卵胞発育および排卵を刺激する。卵胞発育はパルス状に放出される GnRH および性腺刺激ホルモンにより調節される。一方、成熟した卵胞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することで発情行動を誘起するとともに、GnRH および LH のサージ状分泌を誘起する。LH サージが引き金となり、成熟した卵胞は排卵する。キスペプチンは視床下部において GnRH のパルス状およびサージ状分泌を上位で制御する因子として、近年注目されている神経ペプチドである。難波陽介は、ウシの低受胎問題を解決するためにキスペプチンの生理作用を応用できると考え、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の解明、および、新規な繁殖機能制御剤としてのキスペプチンの有用性の検証を目的として研究を遂行した。

第一に、ウシ視床下部におけるキスペプチンニューロンの分布を明らかにし、キスペプチンが GnRH 分泌制御に果たす役割を免疫組織化学的に検証した（第3章）。卵胞期および黄体期のウシから採取した視床下部組織切片を用いて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。キスペプチン免疫陽性細胞は視床下部内側視索前野（MPOA）および視床下部弓状核（ARC）に局在していた。キスペプチン免疫陽性の神経線維は、MPOA では GnRH ニューロンの細胞体に、正中隆起（ME）では GnRH ニューロンの神経線維に密接しており、キスペプチンニューロンがこれらの領域において GnRH ニューロンと相互作用することを明らかにした。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く、ARC では卵胞期および黄体期で変化しないことを明らかにした。さらに、MPOA および ARC のキスペプチンニューロンにはエストロジェン受容体（ER） α およびプロジェステロン受容体（PR）が共在しており、キスペプチンおよび ER α 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顕著に高かった。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、卵胞期および黄体期で変動する性ステロイドホルモンの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。

第二に、性腺刺激ホルモン分泌および卵巣機能の制御へのキスペプチンの関与を調べ、ウシの卵巣機能を制御する新規な繁殖機能制御剤としてのキスペプチンの有用性を検討した（第4章）。黄体期初期（発情を観察した日から5日後）の雌ウシに全長キスペプチン（Kp-53）を静脈内投与し、血漿中 LH および FSH 濃度変化におよぼす

影響、また、Kp-53 の投与が卵巣に存在する潜在的卵胞発育波の主席卵胞発育におよぼす影響を観察した。その結果、Kp-53 の末梢投与が LH 分泌を促進し、ウシ黄体期の潜在的卵胞発育を刺激することを見出した。

第三に、Kp-53 よりも安価に合成可能なキスペプチンの類縁ペプチドが生理活性を有するかを検証し、ウシの卵胞発育や排卵を促す新規な繁殖機能制御剤としてのこの類縁ペプチドの有用性を検討した（第 5 章）。ここで用いたキスペプチン類縁ペプチドは、キスペプチンの生理活性を有するキスペプチン C 末端の 10 アミノ酸残基からなる部分ペプチドを改変したペプチドである。黄体期初期（発情を観察した日から 5 日後）の雌ウシに、キスペプチンの改変類縁ペプチドを静脈内に投与し、血漿中 LH および FSH 濃度変化におよぼす影響、また、投与時に卵巣に存在する潜在的卵胞発育波の主席卵胞発育と排卵におよぼす影響を観察した。その結果、キスペプチンの改変類縁ペプチドの投与により、血漿中 LH 濃度が長時間にわたり顕著に上昇し、黄体期の潜在的卵胞発育を刺激することを見出した。さらに、投与したウシの 40% で排卵が確認されたことから、キスペプチンの改変類縁ペプチドは卵巣における卵胞の発育と排卵を促すことを明らかにした。これらの結果から、この類縁ペプチドは卵胞発育および排卵を誘起する強力な活性をもち、キスペプチン類縁体がウシの卵巣機能を制御する新規な繁殖機能制御剤として応用できる可能性を示唆した。

以上のように、難波陽介は、大型動物であるウシにおけるキスペプチンニューロンの詳細なマッピングにより、反芻動物の GnRH 分泌制御機構においてキスペプチンが担う役割を明らかにし、さらに、キスペプチンやその類縁体による卵胞発育刺激効果を直接明らかにした。本論文のこれらの知見は、畜産学、家畜繁殖学、さらには神経内分泌学などの研究領域に大きく貢献し、畜産動物の生産性向上に資する成果として高く評価できる。よって、本審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があるものと認め、論文審査に合格と判定した。