

主論文の要約

**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)

名古屋大学大学院生命農学研究科

生命技術科学専攻

生物生産技術科学講座

動物生産科学第1研究分野

難波 陽介

2014年3月

総合緒言

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てウシの繁殖機能を制御し、繁殖の一括管理や繁殖障害の治療をすることが考えられる。

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) および卵胞刺激ホルモン (FSH) 分泌を刺激し、LH および FSH は卵巢に作用して卵胞発育および排卵を刺激する。卵胞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、成熟した卵胞は排卵する。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胞までも排卵させる可能性があり、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：ウシの GnRH 分泌制御における視床下部キスペプチンの役割

げっ歯類や、ヒツジやヤギなどの小型反芻動物において、キスペプチンニューロンが視床下部に局在し、GnRH 分泌の制御に重要な役割を担っていることがわかってきた。本実験では、ウシ視床下部においてキスペプチンニューロンが存在し、GnRH の分泌を制御しているか否かを明らかにすること、および、キスペプチンニューロンがエストロジェンやプロジェステロンのフィードバック作用を仲介し、GnRH の分泌パターンを制御しているか否かを明らかにすることを目的とした。そこでまず、ウシ視床下部において、1) キスペプチンニューロンの分布、2) キスペプチンニューロンと GnRH ニューロンの相互作用、および、3) 卵胞期および黄体期の異なる性ステロイド環境下でのキスペプチン発現を免疫組織化学的に調べた。

月齢 16~23 ヶ月、体重 291~463 kg の黒毛種未経産ウシ (n=4) および交雑種未経産ウシ (n=4) 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) $F_{2\alpha}$ を投与して黄体退行を誘導した。PGF $_{2\alpha}$ 投与 2 日後を卵胞期、PGF $_{2\alpha}$ 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。卵胞期モデルおよび黄体期モデルは、黒毛和種および交雑種が 2 頭ずつになるようにした。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 μ m 厚の前額凍結切片を作製し、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。また、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 により核染色をした。

キスペプチ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) に局在していた。また、GnRH 免疫陽性細胞は MPOA に散在していた。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。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かった ($p<0.05$) が、ARC においては卵胞期および黄体期でキスペプチン免疫陽性の蛍光強度に変化はなかった。卵胞期の MPOA において、核染色された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 においては卵

胞期および黄体期に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 ER α または PR を共発現していた。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、ER α 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、GnRH サージの発生に関与する可能性が示唆された。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ともに半数以上のキスペプチンニューロンが ER α および PR 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 分泌を制御する可能性が示唆された。

第4章：ウシの卵巣機能制御におけるキスペプチンシグナリングの役割

第3章では、ウシ視床下部キスペプチンが GnRH 分泌を制御している可能性を示した。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巣機能の制御に関与するか否かを調べるとともに、ウシ卵巣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。

年齢 6~11 歳、体重 372~504 kg の黒毛和種経産雌ウシ (n=5) を用いた。黄体期にある動物に PGF $_{2\alpha}$ を投与し、黄体退行を誘導した。PGF $_{2\alpha}$ 投与後、動物の発情を観察した日から 5 日後の正午に、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。

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 LH 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、キスペプチンシグナリングが卵巣機能制御に関わる可能性が示された。また、キスペプチンが卵胞発育または排卵を促す新規繁殖機能制御剤として応用できる可能性が示された。

第 5 章：ウシ卵巣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類縁体の可能性

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、キスペプチン類縁体である Compound A 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、 $PGF_{2\alpha}$ を投与し、黄体退行を誘導した。 $PGF_{2\alpha}$ 投与後、動物の発情を観察した日から 5 日後のウシに、Compound A または溶媒を静脈内投与した。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、Compound A 投与群において、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 Compound A 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。Compound A 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、Compound A 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新規繁殖機能制御剤となる可能性が示された。

総合考察

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分泌および卵胞発育または排卵を促すことが明らかとなり、ウシの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、キスペプチン類縁体の末梢投与が卵胞発育および排卵を促したことから、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。