

主論文の要約

Central regulatory mechanism of reproduction by kisspeptin-GnRH neuronal communication and its application for domestic animals

(キスペプチン・GnRHニューロン間コミュニケーションによる生殖制御機構の解明とその応用)

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
生殖科学研究室

家田菜穂子

2015年3月

【第一章：緒言】

ウシやブタなどの家畜において発情の微弱化や低受胎率による生産性の低下が問題になっているが、繁殖障害を引き起こす詳細なメカニズムは明らかにされておらず、根本的な治療方法も確立されていない。本研究は、家畜の繁殖疾患の発病機序の解明および有効な治療法の確立に資するため、生殖中枢における繁殖機能制御メカニズムの解明を目的とした。

哺乳類の繁殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸により制御される。視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）は下垂体からの黄体形成ホルモン（LH）および卵胞発育ホルモン（FSH）の分泌を促すことで、卵巣機能を亢進する。GnRH はパルス状に分泌されており、下垂体門脈血中の GnRH 濃度は末梢血中 LH 濃度に正確に反映される。この GnRH/LH パルスが卵巣での卵胞発育やステロイド合成を促進する。家畜において、未成熟な卵胞を発育させる有効な方法は確立されておらず、卵胞発育を促す中枢メカニズムのより詳細な解明が求められる。

キスペプチンは GnRH 分泌を第一義的に制御する神経ペプチドとして注目を集めている。キスペプチンは GnRH ニューロンに発現するキスペプチン受容体（GPR54）に作用し、GnRH 分泌、ひいては LH 分泌を強力に促進する。キスペプチンニューロンは視床下部において、前腹側室周囲核および弓状核の二つの神経核に局在する。特に弓状核のキスペプチンニューロンは、ニューロキニン B およびダイノルフィンの二つの神経ペプチドを共発現することから kisspeptin-neurokinin B-dynorphin（KNDy）ニューロンと呼ばれ、GnRH/LH のパルス状分泌を制御するパルスジェネレーターの本体であるという仮説が提唱されている。このことから私は、KNDy ニューロンの活動を直接制御する神経経路を同定することが卵胞発育の中枢メカニズムを解明することになり、ひいては家畜の繁殖機能制御の向上に資することができると考えた。

【第二章：GnRH・キスペプチンニューロン間ポジティブフィードバック機構の解明】

本論文では第一に、キスペプチン分泌を直接制御する新たな神経伝達物質を同定するため、KNDyニューロンに発現するGタンパク質共役型受容体を探索した。キスペプチンニューロンを赤色蛍光tdTomatoで可視化したラットに卵巣除去（n=2）または卵巣除去および高濃度エストロゲン処置（n=3）を施し、二週間後に卵巣除去ラットから弓状核組織を、高濃度エストロゲン処置ラットから前腹側室周囲核組織を切り出した。組織片から細胞を単離し、顕微鏡下でtdTomato陽性細胞のみを採取し、RNA抽出およびcDNAライブラリの合成を行った。これらのcDNAライブラリより、発現するGタンパク質共役型受容体のmRNA発現を検索した。その結果、KNDyニューロンにGnRHの部分ペプチドGnRH(1-5)をリガンドとする受容体遺伝子*Gpr101*が発現することが明らかとなった。

次に、GnRH(1-5)の投与によりGnRH/LH分泌が変化するかどうかを検証した。卵巣除去および低濃度エストロゲン処置を施した雌ラットの第3脳室に10 nmol GnRH(1-5)を投与したところ、その直後より血中LH濃度は上昇し、3時間の採血時間中、高値を示した。LH分泌の平均値、基底値、パルス頻度を解析した結果、GnRH(1-5)投与群（n=6）の平均値および基底値は、対照群（n=4）と比較して有意に上昇した（ $p < 0.05$, Student's *t*-test）。一方で、パルス頻度には有意な変化は見られなかった。GnRH(1-5)のLH分泌促進作用が、キスペプチン分泌を介するかどうかを検証するため、*Kiss1*ノックアウトラット（n=2）の脳室内に10 nmol GnRH(1-5)を投与し、LH分泌への影響を確かめた。その結果、*Kiss1*ノックアウトラットではGnRH(1-5)はLH分泌に対して何ら効果を示さず、血中LH濃度は常に低値を保った。この後、同一個体にラット全長キスペプチンを投与したところ、その直後からLH分泌の急激な上昇が認められた。この結果から、GnRH(1-5)は、下垂体からのLH分泌を直接刺激するのではなく、キスペプチンニューロンの

活性化を介して、LH分泌を促すことが明らかとなった。*Gpr101* mRNAは、*Kiss1* ノックアウトラットの視床下部内においても野生型ラットの視床下部と同程度の発現量を示しことから、*Kiss1* ノックアウトラットにおいて GnRH(1-5)が LH 分泌亢進作用を示さなかったのは、GnRH(1-5)受容体の発現の違いに起因しないことが明らかとなった。

以上の結果より、GnRH(1-5)は、弓状核 KNDy ニューロンに発現する GPR101 を介して KNDy ニューロンに直接作用し、キスペプチン分泌、ひいては GnRH/LH 分泌を促進することが示された。本研究により GnRH ニューロンが、GnRH 部分ペプチドを介してキスペプチン分泌を促進する ultra-short loop feedback 機構の存在が明らかとなった。

【第三章：性成熟期のブタ脳における *KISS1* 発現】

次に、げっ歯類で得られた知見を家畜の繁殖メカニズム解明に応用するため、ブタの脳内でキスペプチンが果たす役割を明らかにすることを目的として、研究を実施した。性成熟は、家畜の繁殖に必須の過程であり、性成熟に伴い GnRH のパルス状分泌が上昇することで卵胞発育および排卵が引き起こされる。げっ歯類、反芻動物、霊長類では、視床下部内における *Kiss1* 発現の上昇が性成熟の引き金になることが示唆されている。そこで第三章では、出生後から性成熟期にかけて、ブタ視床下部内での *KISS1* 発現量を解析した。実験には出生直後から性成熟期の 0、1、2、3、4、および 5 ヶ月齢雌ブタ（各群 n=4）を用いた。5 ヶ月齢群では、背圧試験による発情行動が確認された個体のみを実験に供試し、peripubertal 群とした。各月齢群において血液および卵巣を採取し、脳を 4%パラフォルムアルデヒドにより灌流固定した。視床下部内の *KISS1* 発現を *in situ* hybridization で検出し、*KISS1* 発現細胞数を各月齢間で比較した。また、血漿中 LH、FSH、エストロゲンおよびプロジェステロン濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。その結果、0 ヶ月齢を含む全ての群において、視床下部弓状核に多数の *KISS1* 発現が認められ、その細胞数に有意な差は認められなかつ

た。血中 LH 濃度は 0 ヶ月齢において最も高く ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni test)、1 から 2 ヶ月齢で減少し、3 から 4 ヶ月齢でわずかに上昇した。血中 FSH 濃度は 3 ヶ月齢以降減少する傾向を示し、3 ヶ月齢前後での視床下部-下垂体-性腺軸におけるネガティブフィードバックの開始が示唆された。4 および 5 ヶ月齢群の卵巣において多数の胞状卵胞が観察された。以上より、ブタ脳において *KISS1* は恒常的に発現し、*KISS1* 発現レベルと性成熟との間には相関がないことが明らかとなった。よって、これまで報告された動物と異なり、ブタではキスペプチン合成ではなくその分泌を増加させる経路の成熟が性成熟を引き起こす可能性が高いことが示唆された。

【第四章：考察】

第二章では、従来知られていたキスペプチン(KNDy)ニューロンから GnRHニューロンへの制御に加え、GnRHがその部分ペプチドを介してキスペプチン分泌を促すという、GnRHおよびKNDyニューロン間のショートループ・フィードバック機構が存在することを明らかにした。本研究でGnRH(1-5)がLHパルス状分泌の平均値および基底値を上昇させた一方で、パルス頻度は変化させなかったことや、LHサージの間にラット弓状核KNDyニューロンにおいてc-Fos発現が上昇することが報告されている(Kinoshita et al., 2005)ことから、KNDyニューロンがGnRH(1-5)-GPR101シグナリングを介してLHサージの発生に関与する可能性が示された。

GnRHニューロンの軸索末端とキスペプチンニューロンの軸索末端が正中隆起において互いに近接して局在すること(Uenoyama et al., 2011)、全長GnRHをGnRH(1-5)へと代謝するエンドペプチダーゼがGnRHニューロンおよびtanycyteに発現すること(Wu et al., 1997)から、分泌された全長GnRHは正中隆起で分解されてGnRH(1-5)となり、KNDyニューロンに発現するGPR101へ作用すると考えられる。また、LHサージ中には第三脳室脳脊髄液中にGnRHが検出される(Skinner et

al., 1997)ことから、GnRH(1-5)は脳脊髄液中に放出された全長GnRHから産生される可能性も考えられる。

第三章では、性成熟期の雌ブタ脳内では*KISS1*が常に発現し、遺伝子発現レベルの上昇が性成熟の引き金とはならないことを示した。性成熟前の雌ブタにGnRHを投与すると末梢血中LH濃度が上昇する(Fleming and Dailey, 1985)ことから、視床下部-下垂体-性腺軸は既に成熟していると考えられる。本研究結果と合わせると、ブタにおいてはキスペプチン分泌促進するメカニズムの成熟がブタの性成熟を誘起すると考えられる。よってブタは、*Kiss1*遺伝子発現が性成熟に伴い上昇するげっ歯類(Takase et al., 2009)と異なる性成熟メカニズムを有する可能性が示唆された。

以上、本論文は、哺乳類の繁殖機能を制御するキスペプチン-GnRHニューロン間のショートループ・フィードバック機構の存在を明らかにするとともに、キスペプチン-GnRH系を用いた家畜の繁殖機能技術向上への可能性を示した。

【参考文献】

- Fleming MW, Dailey RA (1985) Longitudinal study of the surge of gonadotropins induced by exogenous hormones in prepuberal gilts. *Endocrinology* 116:1893-1898.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146:4431-4436.
- Skinner DC, Caraty A, Malpoux B, Evans NP (1997) Simultaneous measurement of gonadotropin-releasing hormone in the third ventricular cerebrospinal fluid and hypophyseal portal blood of the ewe. *Endocrinology* 138:4699-4704.
- Takase K, Uenoyama Y, Inoue N, Matsui H, Yamada S, Shimizu M, Homma

T, Tomikawa J, Kanda S, Matsumoto H, Oka Y, Tsukamura H, Maeda KI (2009) Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J Neuroendocrinol* 21:527-537.

Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, Homma T, Takase K, Yamada S, Ajiki K, Ichikawa M, Okamura H, Maeda KI, Tsukamura H (2011) Ultrastructural Evidence of Kisspeptin-Gonadotrophin-Releasing Hormone Interaction in the Median Eminence of Female Rats: Implication of Axo-Axonal Regulation of GnRH Release. *J Neuroendocrinol*.

Wu TJ, Pierotti AR, Jakubowski M, Sheward WJ, Glucksman MJ, Smith AI, King JC, Fink G, Roberts JL (1997) Endopeptidase EC 3.4.24.15 presence in the rat median eminence and hypophysial portal blood and its modulation of the luteinizing hormone surge. *J Neuroendocrinol* 9:813-822.