

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

The mechanism underlying gonadotropin-releasing hormone pulse generation in rats

論文題目 (ラットにおける性腺刺激ホルモン放出ホルモンパルス発生を制御するメカニズム)

氏名 長江 麻佑子

論文内容の要旨

人口増加や経済発展に伴い、畜産物の需要は増加傾向が続くと予想されている (ODCD-FAO Agricultural Outlook)。一方、畜産現場では、国内外を問わず家畜の繁殖成績の低下が大きな課題となっている。乳牛を例にとると、凍結精液を用いた受胎率はこの 30 年低下し続け、現在は 50%を下回っている (家畜改良事業団)。繁殖成績低下の原因を解明し、繁殖成績を向上させる新たな技術開発を行うためには、家畜を含む哺乳類の生殖を制御するメカニズムに関する基礎的知見の集積が必須である。

哺乳類の雌の生殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸で制御されており、視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のパルス状の分泌 (GnRH パルス) は、下垂体からの黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を介して、卵胞発育を促進する。実験的に、GnRH を持続的に投与すると LH/FSH 分泌は逆に抑制されることから (Belchetz *et al.*, 1978)、GnRH パルスは、LH および FSH 分泌に必須であり、GnRH パルスを形成する神経メカニズム (GnRH パルスジェネレーター) の解明が長年求められてきた。本学位論文では、GnRH パルスジェネレーターの同定およびその制御メカニズムの解明を目的とした。

哺乳類の雌の生殖機能は、視床下部に局在する 2 群のキスペプチンニューロンにより制御される。弓状核に局在するキスペプチンニューロンは、キスペプチンのほかに、促進性の神経ペプチドであるニューロキニン B と抑制性のダイノルフィン A を共発現することから KNDy ニューロンとも呼ばれる。様々な状況証拠から、KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターであるという説が有力であるものの、直接的な証明はなかった。第 2 章では、既存の全身性にキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) をノックアウト (KO) したラットを用いた KNDy ニューロンレスキュー実験と、新たに作製した *Kiss1-floxed* ラットを用いた領域特異的な *Kiss1* KO により、KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターであることを証明した。すなわち、不妊を呈する全身性 *Kiss1*

KO 雌ラットの弓状核に *Kiss1* を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを局所投与することにより、弓状核ニューロキニン B 遺伝子 (*Tac3*) 発現細胞に *Kiss1* 発現を回復させた KNDy ニューロンレスキューラットを作製し、GnRH パルスの指標として LH 分泌動態を解析した。3%以上の KNDy ニューロンをレスキューすると、レスキューの割合に応じて LH パルスが回復した。一方で、*Tac3* 発現細胞以外の多数の細胞において *Kiss1* 発現を回復しても、LH パルスは回復しなかった。さらに、*Kiss1* 遺伝子の第 2、3 エクソンを loxP 配列で挟んだ *Kiss1*-floxed 雌ラットの弓状核へ Cre 組換え酵素を発現する AAV ベクターを局所投与することにより弓状核特異的 *Kiss1* KO ラットを作製し、LH 分泌動態を解析した。その結果、90%以上の弓状核 *Kiss1* 発現を KO すると、LH パルスは著しく抑制されることを明らかにした。以上の結果より、KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターの本体であることを証明した。

KNDy ニューロンが GnRH パルスを発生するメカニズムとして、促進性のニューロキニン B と抑制性のダイノルフィン A の自己分泌・傍分泌により KNDy ニューロン自身の活動を制御しているとの説が有力である。第 3 章では、ラットの KNDy ニューロンの多くにダイノルフィン A 受容体すなわち κ -オピオイド受容体 (KOR) 遺伝子 (*Oprk1*) が発現するものの、全ての KNDy ニューロンに *Oprk1* が発現しないことに注目し、KNDy ニューロンにおけるダイノルフィン A-KOR シグナリングの生理的役割を明らかにすることを目的とした。*Oprk1* 発現細胞特異的に *Kiss1* を KO したラット (*Oprk1*-KpKO ラット) を作製し、生殖機能を解析した。加えて、*Kiss1* 発現細胞特異的 *Kiss1* KO ラット (*Kiss1*-KpKO ラット) を新たに作製し、生殖機能を解析し、*Oprk1*-KpKO ラットの表現型と比較した。*Oprk1*-KpKO 雌ラットおよび対照群の Cre(-)/*Kiss1*-floxed 雌ラットは、いずれも 30~38 日齢の間に性成熟の指標である膣開口を示し、両群間の性成熟日齢に有意な差を認めなかった。対照群の Cre(-)/*Kiss1*-floxed 雌ラットが 4 日周期の性周期を示したのに対し、*Oprk1*-KpKO 雌ラットのほとんどが 5 日周期の性周期を示した。さらに、*Oprk1*-KpKO 雌ラットは、野生型雄ラットとの交配により、妊娠、出産したが、産仔数は対照群と比較して少なかった。卵巣除去 *Oprk1*-KpKO ラットは、弓状核に対照群の約 5%の *Kiss1* 発現細胞を認め、明瞭な LH パルスを示したが、生理的な濃度のエストロジェンを代償投与すると LH パルスが抑制された。一方、弓状核における *Kiss1* を完全に消失した *Kiss1*-KpKO 雌ラットは、少なくとも 56 日齢まで性成熟の指標となる膣開口を示さず、卵巣は小さく萎縮し、卵巣除去条件下において LH パルスを完全に欠損した。以上より、KNDy ニューロンの約 95%が *Oprk1* を発現し、*Oprk1* を発現しない約 5%の KNDy ニューロンが直接ダイノルフィン A-KOR シグナリングを受け取らずとも、キスペプチンを分泌し、GnRH パルス、卵胞発育ひいては妊孕性を維持できることが示唆された。一方、生理的なステロイド環境下では残り 95%の *Oprk1* を発現する KNDy ニューロンが GnRH/LH パルスの発生に必要であることも示唆された。

本研究で用いた *Kiss1*-floxed ラットおよび *Kiss1*-Cre ラットは、ラット胚性幹細胞を用いたジーンターゲティングにより作製し、その作製に複数年を要した。そこで、ト

ランスフォーマティブ化学生命融合研究大学院プログラム (GTR) の融合研究として、生理学研究所において、ラット受精卵を用いてノックインラットを効率的かつ迅速に作製するため、複数の方法を比較・検討した。第4章では、はじめに、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションおよび AAV による CRISPR-Cas9 システムとターゲティングベクターの導入方法を種々検討した。その結果、ラット受精卵に Cas9-ガイド RNA 複合体をエレクトロポレーションにて導入し、その後、ターゲティングベクターを発現する AAV を感染させる方法でもっとも効率良く、ノックインラットを作製できることを示した。さらに、この方法により、第3章で用いた *Oprk1-Cre* ラットをわずか4ヶ月で作製した。

第5章では、第2章および第3章で得られた結果から、哺乳類の生殖機能を司る GnRH パルス発生の制御メカニズムについて考察した。すなわち、視床下部弓状核に局在する KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターの本体であり、促進性のニューロキニン B と抑制性のダイノルフィン A の自己分泌・傍分泌のほかに、先行研究により示唆されたギャップジジャンクションを介した細胞間情報伝達により、同期した神経活動を形成する可能性を示唆した。さらに、KNDy ニューロンの数には冗長性があり、約5%の KNDy ニューロンがあれば、GnRH パルスが維持され、繁殖可能であるという事実をもとに、低栄養などによる家畜の繁殖障害の克服にはすべての KNDy ニューロンの賦活化は必要なく、一部の KNDy ニューロンの機能回復によって繁殖成績を向上できる可能性を示唆するとともに、本研究成果が家畜の繁殖促進技術のシーズとなることを考察した。また、本研究で新たに作製した遺伝子改変ラットを用いた繁殖中枢メカニズム研究の展望についても言及した。