

## 主論文の要約

### 論文題目

The mechanism underlying gonadotropin-releasing hormone pulse generation in rats

(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

人口増加や経済発展に伴い、世界の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。本邦の乳牛を例にとると、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)。このような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を開発するためには、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-卵巣軸で制御されており、視床下部から分泌される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)、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。内因性の GnRH を欠損したアカゲサルに、GnRH を生理的な頻度でパルス状に投与すると、LH および FSH の血中濃度が増加し (Belchetz *et al.*, 1978)、約半数の個体で排卵や月経周期が回復する (Knobil *et al.*, 1980) のに対して、GnRH の持続的な投与は LH および FSH 分泌を抑制する (Belchetz *et al.*, 1978)。これらの先行研究の結果から、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、それぞれの頭文字を取って 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、これまで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。20%以上の KNDy ニューロンをレスキューできたラットは明瞭な LH パルスを示した。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。このことは、単に *Kiss1* 発現が回復したためではなく、KNDy ニューロンのレスキューによって、LH パルスが回復することを強く示唆する。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* 雌ラットの弓状核に Cre 組換え酵素を発現する AAV ベクターの局所投与し、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。さらに、KNDy ニューロンの数には冗長性があり、20%以上の KNDy ニューロンがあれば、明瞭な GnRH/LH パルスの発生が維持できることをはじめて明らかにした。

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  $\kappa$ -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* 雌ラットは、対照群の Cre(-)/*Kiss1-floxed* 雌ラットと同様に、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より長い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した *Oprk1-KpKO* 雌ラットでは、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、性成熟の指標となる膣開口を示さず、卵巣除去条件下においても LH パルスを完全に欠損した。以上より、*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、GnRH/LH 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約 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 章で用いたノックインラットをわずか 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。