

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

The role of hypothalamic arcuate nucleus KNDy neurons in control of reproduction in cows

論文題目 (ウシの繁殖制御における視床下部弓状核 KNDy ニューロンの役割)

氏名 Ahmed Saad Ahmed HASSANEEN

論文内容の要旨

世界人口の増加に伴い、動物由来タンパク質食料や乳の需要が各国で急増しており、地球規模での家畜生産性の向上が求められている。申請者の母国であるエジプトでも同様の傾向が報告されている。近年、ウシの畜産現場では、無排卵や卵胞嚢腫などの繁殖障害による繁殖性の低下傾向が続いており、家畜の繁殖性の改善は畜産物生産性向上のために解決すべき喫緊の課題として指摘されている。ウシの繁殖障害を克服するためには、ウシの繁殖を制御するメカニズムを解明し、その知見を繁殖障害の治療や予防に応用することが必要不可欠である。

ウシを含む哺乳類の繁殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸とよばれる神経内分泌機構によって制御されている。性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、間脳視床下部に局在する GnRH ニューロンから放出され、下垂体からの黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) 分泌を刺激し、LH および FSH は卵巣に作用して卵胞発育や排卵を調節する。GnRH と、それに引き続く性腺刺激ホルモンの血中濃度は、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。この GnRH および性腺刺激ホルモンのパルス状分泌により、卵巣における卵胞発育が制御される。一方、成熟した卵胞からは卵巣ステロイドホルモンであるエストロジェンが大量に分泌される。血中に放出されたエストロジェンは脳に作用し、GnRH のサージ状分泌と、引き続く LH および FSH のサージ状分泌を誘起し (正のフィードバック作用)、LH サージが引き金となって排卵が起こる。現在、無排卵や卵胞嚢腫などの繁殖障害の治療には、これらの生理学的なメカニズムに基づいて、GnRH 製剤が広く用いられている。すなわち、GnRH 製剤を投与することで LH および FSH のサージ状分泌を促し、無排卵を呈するウシに排卵を誘起することができる。しかしながら、GnRH 製剤はその強力な排卵誘起作用により未熟な卵子までも排卵させる。その結果として、自然排卵した卵子に比べて人工授精後の受胎率が

低くなることが問題点として指摘されており、新たな繁殖制御剤が求められている。

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は視床下部において二つの主要な細胞集団として局在しており、視床下部弓状核および視索前野に局在するキスペプチンニューロンが、それぞれ GnRH のパルス状分泌および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。また、二つのキスペプチンニューロン群のうち、視床下部弓状核に局在するニューロンには、神経ペプチドであるニューロキニン B (NKB) およびダイノルフィン A が共在することが、げっ歯類やヒツジ、ヤギを用いた研究から明らかにされてきた。これらのニューロン群は、三つの神経ペプチドの頭文字から「KNDy ニューロン」とよばれている。KNDy ニューロンは、卵巣における卵胞発育を促すパルス状 GnRH 分泌と、それに引き続く性腺刺激ホルモンパルスを制御する中枢であると考えられている。そこで本研究では、主要な家畜種であるウシにおいて、視床下部弓状核に KNDy ニューロンが局在することを示し、ウシの卵巣機能制御におけるその役割を解明することを目的とした。これらの知見に基づき、KNDy ニューロン活動の制御が繁殖障害の治療や予防のための有効な手法となり得ることを論じた。

第 3 章では、ウシ視床下部において KNDy ニューロンが存在することを免疫組織化学的に検索し、GnRH 分泌制御メカニズムにおける役割を推定することを目的とした。実験には黒毛和種未経産ウシおよび交雑種（ホルスタイン種×黒毛和種）未経産ウシを供試した。プロジェステロン徐放製剤を 6 日間投与し、その抜去後にプロスタグランジン (PG) F2 α を投与して黄体退行を誘起した。卵胞期 (PGF2 α 投与 2 日後) および黄体期 (PGF2 α 投与 7 日後) のウシの脳を、4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定し、視床下部を採取した。50 μ m 厚の凍結切片を作製し、キスペプチンと NKB およびキスペプチンとダイノルフィン A の二重免疫組織化学染色を行った。その結果、視床下部弓状核に存在するキスペプチンニューロンでは、NKB またはダイノルフィン A が共発現していた。キスペプチンと NKB の二重免疫陽性を示すニューロンおよびキスペプチンとダイノルフィン A の二重免疫陽性を示すニューロンの染色性は卵胞期と黄体期で明瞭な違いはなかった。一方、視索前野では NKB 免疫陽性ニューロンはほとんど観察されず、キスペプチンニューロンにおける NKB およびダイノルフィン A との共存は観察されなかった。また、卵胞期ウシ視索前野のキスペプチン免疫陽性細胞数は黄体期と比較して有意に多かった ($p<0.05$)。これらの結果より、ウシ視床下部弓状核に KNDy ニューロンが局在することが初めて明らかとなった。KNDy ニューロンの染色性が卵胞期と黄体期で違いがなかったことから、弓状核の KNDy ニューロンは、発情周期を通じてパルス状 GnRH 分泌を調節する機能を有することが示唆された。一方、視索前野のキスペプチンニューロンは、血中エストロジェンレベルの高い卵胞期に発現が高かったことから、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て GnRH サージの発生に関与することが示唆された。以上、第 3 章の結果から、弓状核に局在する KNDy ニューロンと視索前野に局在するキスペプチンニュー

ロンの機能は分化しており、それぞれウシの GnRH 分泌制御メカニズムにおいて重要な役割を担うことが示唆された。

第 4 章では、ウシ視床下部弓状核 KNDy ニューロンに含まれる NKB に着目し、性腺刺激ホルモン分泌および卵巣機能の制御における NKB の役割を明らかにすること、および、ウシの卵巣機能を調節する繁殖機能制御剤としての NKB 製剤の可能性を検討することを目的とした。そこで、NKB 受容体作動薬であるセンクタイトの末梢投与が、性腺刺激ホルモン分泌を促進し、卵胞発育または排卵を促すかどうか検討した。第 3 章と同様にプロジェステロン徐放製剤と PGF2 α 投与により誘起した卵胞期、あるいは、黄体の存在を確認後に PGF2 α を投与して誘起した黄体期にある黒毛和種雌ウシを用い、センクタイト (30 または 300 nmol/min) または溶媒を静脈内に 2 時間にわたり持続投与した。投与開始の 8 時間前から 10 分間隔で 24 時間採血し、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、卵巣における主席卵胞直径の変化を、センクタイト投与前後を通じて観察した。その結果、300 nmol/min のセンクタイト静脈内投与により、血漿中 LH 濃度が有意に上昇した ($p < 0.05$)。卵胞期におけるセンクタイト投与による LH 分泌促進効果は、黄体期に比較して顕著であった。一方、血漿中 FSH 濃度は、卵胞期においてセンクタイト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、300 nmol/min のセンクタイト投与により、黄体期では主席卵胞直径の有意な増加がみられた ($p < 0.05$)。さらに、卵胞期に 300 nmol/min のセンクタイトを投与した 4 頭中 2 頭では、通常のタイミングより早期に排卵が観察された。これらの結果から、センクタイトが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。NKB 受容体作動薬投与による NKB 受容体の活性化により、性腺刺激ホルモン分泌、卵胞発育および排卵を誘起することができたことから、NKB 製剤がウシの繁殖機能制御剤として活用できる可能性が示された。

以上、本研究により、ウシ視床下部においてキスペプチンを含有するニューロン群は弓状核および視索前野に局在すること、および、弓状核の細胞群は KNDy ニューロンであることが初めて明らかにされた。これら二つのニューロン群は、GnRH とそれに続く性腺刺激ホルモン分泌を調節する視床下部神経機構において重要な役割を担い、ウシの卵胞発育または排卵を促すことが示唆された。また、NKB またはその類縁体がウシの繁殖機能制御剤として応用できることが示唆された。