

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 池上（渡辺）花奈

論文題目

Cellular and molecular mechanism underlying GnRH pulse  
generation in mammals

（哺乳類におけるGnRHパルス発生を制御する  
細胞・分子メカニズム）

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学准教授	上野山賀久
委員	名古屋大学教授	東村博子
委員	名古屋大学講師	井上直子
委員	名古屋大学教授	大蔵聡
委員	名古屋大学教授	中野秀雄

## 論文審査の結果の要旨

池上(渡辺)花奈の提出論文「Cellular and molecular mechanism underlying GnRH pulse generation in mammals (哺乳類における GnRH パルス発生を制御する細胞・分子メカニズム)」は、ほ乳類の生殖機能の中枢である性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のパルス状分泌を発生させる神経機構に関する研究成果をまとめたものである。池上は、視床下部弓状核に局在するキスペプチンニューロンが GnRH パルス発生機構の本体であるという仮説を立て、それを検討した。本論文は全4章で構成される。

第1章では、ほ乳類の生殖を制御する脳内メカニズムの解明が、家畜の繁殖障害の克服に資することを述べた。池上は特に、GnRH パルス発生機構に着目し、弓状核に局在するキスペプチンニューロンが、その本体であるとの可能性を述べるとともに、遺伝子改変マウスを用いて、GnRH パルス発生機構の細胞・分子メカニズムの解明を目指す意義を述べた。

第2章では、2種類の Cre-loxP システムを用いコンディショナルキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) ノックアウト (KO) マウスの作製により、弓状核キスペプチンニューロンが GnRH パルス発生機構の本体である可能性を検証した。まず、弓状核特異的 *Kiss1* エンハンサー下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを *Kiss1*-floxed マウスと交配することにより弓状核特異的な *Kiss1* KO マウスの作製を試みた。これらの個体は性成熟を示さず、血中黄体形成ホルモン (LH)/卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度も顕著に減少したが、弓状核のみならず前腹側室周囲核においても *Kiss1* が KO されていた。よって、本法による弓状核特異的な *Kiss1* KO マウスの作成は困難と判断した。次に、4-水酸化タモキシフェン (4-OHT) 依存性に *Kiss1* を KO できる遺伝子改変マウスを作製し、成熟雌マウスの弓状核後方に 4-OHT を局所投与した。その結果、弓状核において、*Kiss1* 発現細胞が著しく減少した個体を複数得た。これらのマウスの半数は連続無発情を呈し、血中 LH/FSH 濃度が減少する傾向を示した。以上より、弓状核キスペプチンニューロンが GnRH パルス発生に重要であることが示唆された。

第3章では、この弓状核キスペプチンニューロン群が同期してパルス状に発火する分子メカニズムの解明を目指した。マウス可視化キスペプチンニューロン (*Kiss1*-GFP 細胞) の初代培養系を用い、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を指標として、弓状核 *Kiss1*-GFP 細胞の神経活動をモニターした。その結果、ニューロキニン B (NKB) 受容体作動薬の添加により、*Kiss1*-GFP 細胞における  $Ca^{2+}$ オシレーションの頻度が増加した。また、相互相関解析により *Kiss1*-GFP 細胞群と、その近傍のグリア細胞における  $Ca^{2+}$ オシレーションが同期していることを確かめた。次に、ニューロン-ニューロン間またはニューロン-グリア細胞間に形成されるギャップ結合の阻害剤の添加が *Kiss1*-GFP 細胞の  $Ca^{2+}$ オシレーション頻度を有意に減少させることを見だし、ギャップ結合を介して伝搬する色素を用いて、*Kiss1*-GFP 細胞と近傍のグリア細胞間のギャップ結合の存在を証明

した。これらの結果より、キスペプチンニューロンから分泌される NKB が自己分泌／傍分泌システムでキスペプチンニューロンの神経活動を亢進することおよび、キスペプチンニューロンおよびグリア細胞の神経活動は、ギャップ結合を介して同期している可能性を示唆した。

以上のように、池上花奈は遺伝子改変マウスを用いて、弓状核に局在するキスペプチンニューロンとギャップ結合を介して連絡する周辺のグリア細胞が GnRH パルス発生を担う細胞集団を形成しているという新しい GnRH パルス発生機構のモデルを提唱した。これらの知見は、学術上の価値に加え、家畜の生産性向上に資する点からも極めて高い価値があると認められる。よって、本審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があるものと認め、論文審査に合格と判定した。

## 試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	池上(渡辺) 花奈
試験担当者	主査 上野山 賀久 東村 博子 井上 直子 大蔵 聡 中野 秀雄			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成 29 年 6 月 1 日学位審査委員会において、主論文の内容を中心</p> <p>としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した</p> <p>結果、合格と判定した。</p>				