

主論文の要約

**Study on artificial control of reproductive functions
by KNDy neuropeptides as a pharmacological target in goats**

(ヤギにおける KNDy ニューロペプチドを創薬ターゲットとした
繁殖機能の人為的制御に関する研究)

名古屋大学大学院生命農学研究科

生命技術科学専攻

生物生産技術科学講座

動物生産科学研究室

佐々木 拓弥

2019年3月

【第1章：序論】

現在、世界人口が爆発的に増加しており、国際連合の人口予測によると現在の世界人口が68億人であるのに対して、2050年には91億人に到達するとされている。人口の爆発的な増加に伴い、穀物および畜産物の需要が増加している。世界食糧機関の試算では、2050年までに穀物生産は現在の約21億トンから30億トンに、また、食肉生産は約1億トン以上増加させ3億1900万トンにする必要があるとされている。一方、穀物生産が可能な耕作地はほぼ上限に達しているとの報告もある。したがって、増え続ける世界人口を養うためには限られた資源を有効に活用し、効率的に穀物および畜産物を生産する必要がある。

畜産の現場では、ウシの受胎率低下が世界的な問題となっており、卵巣静止や卵胞嚢腫などの卵巣機能障害が受胎率低下の一因であるとされている。受胎率低下は家畜の生産性低下および畜産農家の経済的損失に直結する。このため、ウシの卵巣機能を向上させ受胎率を改善する繁殖促進技術が求められている。一方、穀物生産においてシカなどの野生害獣による農作物被害が深刻化している。野生害獣による農作物被害は営農意欲を低下させ耕作放棄地の増加を招くことから、効率的な穀物生産の大きな妨げとなっている。農作物被害の深刻化の一因として、シカなどの野生害獣の個体数増加があげられる。農作物被害を軽減するためには、野生害獣の個体数を効率的に管理することが重要である。そのため、シカなどの野生害獣の個体数を管理することを目的とした非外科的かつ可逆的な避妊方法が必要とされている。性腺機能を薬理的に抑制し一時的な不妊状態にすることは、非外科的かつ可逆的な避妊方法として野生害獣の個体数管理に寄与すると考えられる。そこで、本研究ではウシの受胎率改善に資する繁殖機能促進技術およびシカなどの野生害獣の個体管理に資する聖戦機能抑制技術を確立するために、性腺機能を制御する神経内分泌機構に着目した。

反芻動物を含む哺乳類の性腺機能は視床下部-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）および卵胞刺激ホルモン（FSH）などの性腺刺激ホルモン（GTH）分泌を促進する。基底レベルのGnRH分泌は「パルス状GnRH分泌」とよばれる間欠的な濃度上昇を繰り返すことが知られている。パルス状GnRH分泌は、下垂体からの正常なGTH分泌および性腺における配偶子形成、テストステロンやエストロゲンなどの性ステロイドホルモンの生合成と分泌に必要な不可欠であることが古くから示されてきた。性腺から分泌される性ステロイドホルモンは視床下部に作用しパルス状GnRH/GTH分泌の頻度を抑制的に調節する。また、泌乳期や低栄養状態およびストレス環境下において性腺機能は抑制されるが、これはパルス状GTH分泌ひいてはパルス状GnRH分泌の抑制に起因する。このように、パルス状GnRH分泌は哺乳類の繁殖機能を維持する上で重要な役割を果たす。パルス状GnRH分泌を発生させる神経内分泌メカニズムはGnRHパルスジェネレーターとよばれる。ラット、サルおよびヤギを用いた電気生理学的研究から、視床下部弓状核近傍に留置した電極から

記録される多ニューロン発火活動 (MUA) の一過性の上昇 (MUA ボレー) がパルス状 LH 分泌と同期することが明らかにされた。このことから、GnRH パルスジェネレーターは視床下部弓状核に存在することが示唆されているが、その実態は長らく謎のままであった。

2001 年に発見された「キスペプチン」が繁殖機能を最上位で制御する因子として注目されている。キスペプチンニューロンは主に視床下部の視索前野 (げっ歯類においては前腹側室周囲核) および弓状核のふたつの脳領域に局在しており、GnRH ニューロンの細胞体および軸索に投射し、GnRH 分泌を促進することが明らかとなっている。キスペプチンニューロンはステロイドホルモン受容体を発現しており、ステロイドホルモンによって弓状核のキスペプチン遺伝子発現が抑制される。また、泌乳期や低栄養状態およびストレス環境下においても同様に弓状核のキスペプチン遺伝子発現が抑制される。これらのことから、弓状核キスペプチンニューロンは、性ステロイドホルモンやさまざまな環境要因由来の情報の入力を受けてパルス状 GnRH 分泌を制御することが示唆されてきた。

視床下部弓状核キスペプチンニューロンは、ニューロキニン B (NKB) およびダイノルフィン A (Dyn) を共発現することが多くの動物種で明らかとされている。これらのニューロン群は、それぞれの頭文字をとって「KNDy ニューロン」とよばれている。マウスおよびヒツジにおいて、KNDy ニューロンは NKB 受容体 (NK3R) および Dyn 受容体 (KOR) を発現することが明らかとなっており、NKB は NK3R を介して促進的に、Dyn は KOR を介して抑制的に KNDy ニューロンの活動を制御する。またサルにおいてキスペプチンがパルス状に分泌されること、げっ歯類において KNDy ニューロンの活動がパルス状 LH 分泌と同期していることが明らかとなっている。これらの知見から、KNDy ニューロンは互いに密なネットワークを形成し、NKB および Dyn の自己/傍分泌によりパルス状キスペプチン分泌ひいてはパルス状 GnRH 分泌を発生させるモデルが提唱されており、KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターの本体であるとの仮説が有力となっている。

このように、KNDy ニューロンが性腺機能を制御するパルス状 GnRH 分泌の発生に重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある。また、泌乳期や低栄養状態およびストレス環境下において KNDy ニューロンが環境要因由来の情報の入力を受けてパルス状 GnRH 分泌を制御することが示唆されていることから、薬理的に KNDy ニューロンの活動を促進し卵巣機能を向上させることで、卵巣静止や卵胞囊腫などの卵巣機能障害に対する有効な治療法となり得ると考えられる。一方、KNDy ニューロンの活動の薬理的な抑制は、性腺機能を抑制して一時的な不妊状態を作り出すことができると考えられる。そこで、本研究では KNDy ニューロンに発現する NKB および Dyn に着目し、GnRH パルスジェネレーターの薬理的制御により繁殖機能を人為的に制御することを目的とした。そのため、反芻動物の繁殖生理学的研究の良好なモデル動物であるシバヤギを用いて、KOR 拮抗剤および NK3R 拮抗剤の末梢投与が GnRH パルスジェネレーター活動におよぼす影響を検討した。

【第 2 章：メスヤギにおいて KOR 拮抗剤の末梢投与は GnRH パルスジェネレーターの活動

を促進する】

第2章では、ウシの受胎率を改善することを目指し、繁殖機能を促進する技術を確立することを目的として、KOR拮抗剤の末梢投与がGnRHパルスジェネレーター活動およびパルス状LH分泌におよぼす影響を検討した。実験には、非ペプチド性のKOR拮抗剤であるPF-4455242を用いた。PF-4455242は脂溶性かつ低分子のKOR拮抗剤で血液脳関門を通過することから、末梢投与によるGnRHパルスジェネレーター活動促進に有用であると考えられる。まず、卵巣除去(OVX)-エストラジオール(E2)代償投与メスヤギにおいて、KOR拮抗剤(1または10 $\mu\text{mol/kg}$)を4時間にわたり静脈内持続投与し、パルス状LH分泌におよぼす影響を検討した。次に、畜産現場での応用を視野に入れ、簡便な投与方法である皮下単回投与によりKOR拮抗剤(1または10 $\mu\text{mol/kg}$)を末梢投与し、パルス状LH分泌が促進できるか検討した。さらに、末梢投与したKOR拮抗剤の作用部位を明らかとするために、MUA記録法を用いて、KOR拮抗剤(10 $\mu\text{mol/kg}$)の静脈内持続投与がGnRHパルスジェネレーター活動におよぼす影響をMUAボレーを指標として検討した。各実験において、投与4時間前から投与開始4時間後まで8時間にわたり6分間隔で頻回採血を行い、血漿中LH濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。

OVX-E2代償投与メスヤギにおいて、KOR拮抗剤(1または10 $\mu\text{mol/kg}$)の静脈内持続投与は用量依存的にLHパルス間隔を短縮し、それに伴い平均血漿中LH濃度およびLH濃度曲線下面積が有意に上昇した($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Dunnet's test)。また、KOR拮抗剤の皮下単回投与により、用量依存的にLHパルス間隔が短縮し、高用量群(10 $\mu\text{mol/kg}$)において平均血漿中LH濃度およびLH濃度曲線下面積が有意に増加した($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Dunnet's test)。さらに、KOR拮抗剤(10 $\mu\text{mol/kg}$)の静脈内持続投与により、MUAボレーの発生頻度が有意に上昇した($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Dunnet's test)。このことから末梢投与したKOR拮抗剤は中枢性にGnRHパルスジェネレーターの活動を促進することが示唆された。以上のことから、KOR拮抗剤の末梢投与はGnRHパルスジェネレーター活動およびパルス状LH分泌を促進することが明らかとなった。簡便な投与方法である皮下単回投与でGnRHパルスジェネレーター活動の促進効果が得られたことから、KOR拮抗剤の末梢投与が繁殖機能を促進する技術として応用可能であることが示された。

【第3章：メスヤギにおいてNK3R拮抗剤の末梢投与はGnRHパルスジェネレーターに作用しパルス状LH分泌を抑制する】

第3章では、シカの個体数管理に資する繁殖機能抑制法を確立することを目指し、メスヤギにおいて、NK3R拮抗剤の末梢投与がGnRHパルスジェネレーター活動におよぼす影響およびNK3R拮抗剤の経口投与がパルス状LH分泌におよぼす影響を検討した。実験には、

非ペプチド性の NK3R 拮抗剤である SB223412 を用いた。SB223412 は経口投与でも生理活性が認められる低分子の NK3R 拮抗剤で血液脳関門を通過することから、経口投与による GnRH パルスジェネレーター活動の抑制に有用であると考えられる。まず、OVX-E2 代償投与メスヤギにおいて、NK3R 拮抗剤 (0.16 または 1.6 mg/kg) を 4 時間にわたり静脈内持続投与し、NK3R 拮抗剤が中枢性に GnRH パルスジェネレーターに作用するかを、MUA ボレーを指標として検討した。次に、野生動物への応用を視野に入れ、より簡便な投与方法である NK3R 拮抗剤の経口投与を検討した。NK3R 拮抗剤の投与量が、低用量群では 1 日あたり 40mg/kg、高用量群では 1 日あたり 200mg/kg となるように薬剤添加飼料を経口投与した。経口投与開始日を Day 1 とし、Day 1 から Day 7 までの 7 日間、1 日 2 回に分けて薬剤添加飼料を投与し、投与前である Day 0、投与中である Day 2、Day 4、Day 7、投与終了後である Day 9 に 4 時間にわたって 6 分間隔採血を行った。また Day 0 から Day 9 まで連日採血で得られた血漿および高用量群から採取した糞中の NK3R 拮抗剤濃度を高速液体カラムクロマトグラフィー質量分析により測定した。

NK3R 拮抗剤 (1.6 mg/kg) の静脈内持続投与により MUA ボレー間隔が有意に延長し、それに伴い LH パルス間隔も用量依存的に延長した ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test)。このことから、NK3R 拮抗剤の末梢投与は GnRH パルスジェネレーターに作用することでパルス状 LH 分泌を抑制することが明らかとなった。次に、OVX-E2 代償投与メスヤギにおいて、血漿中 NK3R 拮抗剤濃度は投与開始から上昇し、投与終了後に減少した。さらに、投与期間中の NK3R 拮抗剤濃度曲線下面積は用量依存的に上昇した ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test)。また、NK3R 拮抗剤の投与期間中、糞中 NK3R 拮抗剤濃度が上昇し、最大 60% が排泄されることが明らかとなった。NK3R 拮抗剤の投与開始から投与終了までの期間、低用量群、高用量群ともに LH パルスの間隔がコントロール群に比べて有意に延長し、投与終了後には LH パルスの間隔は投与開始前の基底レベルまで回復した ($p < 0.05$, two-way ANOVA for repeated measures (between = treatment, within = day), followed by contrast test for multiple comparisons)。このことから、NK3R 拮抗剤は経口投与でもパルス状 LH 分泌を抑制することが示された。以上のことから、NK3R 拮抗剤の末梢投与により GnRH パルスジェネレーター活動およびパルス状 LH 分泌を可逆的に抑制することができることが示された。一方、経口投与した NK3R 拮抗剤は活性を失わずに血中に移行するが、多くは活性を失わずに排泄されることが示された。

【第 4 章：オスヤギへの NK3R 拮抗剤の経口投与が GTH 分泌、テストステロン分泌および精巣機能におよぼす影響】

第 4 章では、シカの個体数管理に資する繁殖機能抑制法を確立することを目指し、オスヤギにおいて NK3R 拮抗剤の経口投与が GTH 分泌、テストステロン分泌および精巣機能におよぼす影響を検討した。実験には第 3 章と同様の NK3R 拮抗剤を用いた。NK3R 拮抗剤の

投与量が、1日あたり200mg/kgとなるように薬剤添加飼料を経口投与した。経口投与開始日をDay1とし、Day1からDay7までの7日間、1日2回に分けて薬剤添加飼料を投与し、投与前であるDay0、投与中であるDay7に8時間にわたって6分間隔採血を行い、血漿中LHおよびFSH濃度をラジオイムノアッセイ法により、1時間おきに得られた血漿中のテストステロン濃度を酵素イムノアッセイ法によりそれぞれ測定した。Day0からDay7までの連日採血で得られた血漿中のNK3R拮抗剤濃度を高速液体カラムクロマトグラフィー質量分析により測定した。また、Day-1およびDay8に射出精液を採取し、NK3R拮抗剤が精子運動率および精子数におよぼす影響を検討した。さらにDay8に精巣を採取し、NK3R拮抗剤が精巣の形態におよぼす影響を組織学的に検討した。

オスヤギにおいて、血漿中NK3R拮抗剤濃度は投与開始から上昇し、投与期間中のNK3R拮抗剤濃度曲線下面積は対照群と比較して有意に上昇した。NK3R拮抗剤の経口投与により、精子運動率が対照群と比較して減少傾向を示したが、射出精液中の精子数には影響をおよぼさなかった。また、NK3R拮抗剤の経口投与により、テストステロン分泌が減少傾向を示したが、投与期間中のLHおよびFSH分泌には影響をおよぼさなかった。さらに、NK3R拮抗剤を経口投与した一部の個体において、精巣内の精細管の萎縮が観察されたが、対照群との明瞭な差は観察されなかった。以上のことから、NK3R拮抗剤の経口投与はテストステロン分泌および精子運動率を減少させる傾向を示すが有意な差はなく、精巣機能には明瞭な影響をおよぼさないことが明らかとなった。本研究の結果から、NK3R拮抗剤の経口投与が野生害獣の性腺機能抑制に有効である可能性が示されたが、投与用量の検討をはじめとしたさらなる研究が必要であることが示された。

【第5章：考察および結論】

本研究により、KOR拮抗剤およびNK3R拮抗剤の末梢投与により人為的にGnRHパルスジェネレーター活動を促進あるいは抑制することで、動物の繁殖機能を制御できることが示された。本研究で使用したKOR拮抗剤およびNK3R拮抗剤は、簡便な投与方法である皮下単回投与あるいは経口投与においてもGnRHパルスジェネレーター活動を促進あるいは抑制したことから、実際の畜産現場や野生害獣の個体数管理に応用可能であると考えられる。

これまでの研究から、KNDyニューロンがGnRHパルスジェネレーターを構成するニューロン群であると考えられてきた(Wakabayashi *et al.*, 2010)。さらに、泌乳や低栄養といった環境要因によるLH分泌の低下はKNDyニューロン活動の低下に起因することが示唆されている(Matsuzaki *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2012)。LH分泌の低下は受胎率低下の一因である卵巣機能障害を引き起こす(Wiltbank *et al.*, 2002)ことから、KOR拮抗剤の末梢投与によりLH分泌を亢進することで、家畜の卵巣機能を向上させること、ひいては受胎率を改善することが可能であると考えられる。今後は実際の畜産現場へ応用するために、卵巣機能障害を発症した家畜へのKOR拮抗剤投与の有効性を検討することが必要である。

野生害獣の個体管理のための避妊方法は、去勢などの外科的手段ではなく非外科的かつ可逆的な方法が望ましいとされてきた(Kirkpatrick and Turner, 1991)。本研究で使用したNK3R拮抗剤は経口投与でも有効であり、メスヤギにおいて可逆的にLH分泌を抑制したことから、NK3R拮抗剤の経口投与が非外科的かつ可逆的な避妊法として使用できる可能性が示された。一方、経口投与したNK3R拮抗剤の多くが活性を失わずに排泄されたことから、生態系への影響が少ない薬剤などを開発する必要があると考えられる。野生害獣の個体管理法として応用するために、投与用量や投与方法および長期的な投与が動物の健康状態や生態系におよぼす影響を検討することが必要である。

以上、本研究により、KNDyニューロンに発現する神経ペプチドを創薬ターゲットとすることで、人為的にGnRHパルスジェネレーターの活動については繁殖機能を制御できることが明らかとなった。本研究の成果は、家畜の繁殖機能促進技術あるいは野生害獣の個体数管理技術に応用が可能であり、効率的な畜産物生産および野生害獣による農作物被害の軽減に寄与することが期待できる。

【引用文献】

- Kirkpatrick, J.F., Turner, J.W., 1991. Reversible contraception in nondomestic animals. *J. Zoo Wildl. Med.* 22, 392–408.
- Matsuzaki, T., Iwasa, T., Kinouchi, R., Yoshida, S., 2011. Fasting reduces the KiSS-1 mRNA levels in the caudal hypothalamus of gonadally intact adult female rats. *Endocrine* 58, 1–10.
- Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., Steiner, R.A., Okamura, H., 2010. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci.* 30, 3124–32.
- Wiltbank, M.C., Gümen, A., Sartori, R., 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57, 21–52.
- Yamada, S., Uenoyama, Y., Deura, C., Minabe, S., Naniwa, Y., Iwata, K., Kawata, M., Maeda, K.-I., Tsukamura, H., 2012. Oestrogen-dependent suppression of pulsatile luteinising hormone secretion and kiss1 mRNA expression in the arcuate nucleus during late lactation in rats. *J. Neuroendocrinol.* 24, 1234–42.