

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06206

研究課題名(和文) GnRHサージ発生中枢による排卵制御機構の全容解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism regulating ovulation by GnRH surge generator

研究代表者

松田 二子 (Matsuda, Fuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10608855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウシの最も重要な繁殖障害のひとつである卵胞嚢腫の主な原因は、排卵を誘起するGnRH (gonadotropin-releasing hormone) サージ発生中枢の機能不全であるとされるが、特に家畜におけるサージ発生中枢メカニズムはほとんど解明されていない。本研究は、反芻家畜のGnRHサージ発生中枢制御機構を解明することを目的とした。反芻家畜の繁殖中枢機能を細胞レベルで解析できる、ヤギ視床下部由来の細胞株(排卵中枢キスペプチンニューロン細胞株、卵胞発育中枢キスペプチンニューロン細胞株、GnRHニューロン細胞株)の樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立したヤギのキスペプチンニューロン細胞株およびGnRHニューロン細胞株は、家畜で唯一の視床下部由来神経細胞株であり、ウシを含む反芻家畜における繁殖中枢制御メカニズムの解析や、繁殖制御剤の開発に利用できる。その結果、反芻家畜の中枢性繁殖障害の発症機序が解明され、ウシの受胎率向上に資する新たな治療法が開発されると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The follicular cyst, one of the most important reproductive disorders in cattle, is suggested to be partly caused by the defect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator that induces ovulation in the brain. However, the mechanism regulating the GnRH surge generator has not been elucidated especially in domestic animals. This study aimed to clarify the mechanism regulating the GnRH surge generator in domestic ruminants. I succeeded to establish cell lines (kisspeptin neuron cell lines and GnRH neuron cell lines) that can be used to analyze the regulation mechanism of reproductive center in domestic ruminants at a cellular level.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：繁殖 反芻家畜 細胞株 GnRHニューロン キスペプチンニューロン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

ウシの受胎率低下は我が国の畜産において解決されるべき喫緊の課題である。平成24年の初回授精受胎率は乳用牛で45%、肉用牛で56%であり(家畜改良事業団)、乳用牛で特に低下が著しい傾向は変わっていない。ウシには様々な繁殖障害があり受胎率低下の原因となっているが、乳用牛の繁殖障害の病因のうち、卵胞嚢腫が20%を占め、卵巣静止と並んで最多である(農水省畜産局)。

卵胞嚢腫とは、卵胞が排卵されず異常に大きくなり卵巣内に長期間とどまることを指す。哺乳類の排卵は、視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の大量放出(GnRHサージ)と、それに誘起される下垂体からの黄体形成ホルモン(LH)の大量分泌(LHサージ)によって引き起こされる。GnRHサージを誘起するのは十分に発育した卵胞が分泌する高濃度のエストロゲンである。卵胞嚢腫のウシの多くでは、主席卵胞からエストロゲンが分泌され、血中エストロゲン濃度が十分高まっているにもかかわらず、LHサージが起こらず排卵が誘起されない。一方、外因的なGnRHやLHの大量投与で嚢腫卵胞の排卵を誘起できる。このことから、卵胞嚢腫の主要な原因としてGnRHサージ発生中枢の機能不全が挙げられている。排卵制御中枢として、視床下部のGnRHニューロンに加え、そのGnRH分泌を上位で制御するキスペプチンが近年注目されてきた。キスペプチンニューロンは視床下部のPOA(視索前野)とARC(弓状核)に存在し、前者は排卵すなわちGnRH/LHサージを、後者は卵胞発育すなわちGnRH/LHパルスを制御することが主に齧歯類にて示唆されている。一方、ウシ、ヒツジ、ヤギなどの反芻家畜でのキスペプチンおよびGnRHニューロンの機能は不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究は、反芻家畜におけるGnRHサージ発生中枢による排卵制御機構の全容を解明することを目指した。そのために、キスペプチンニューロンの活動を任意に操作可能な遺伝子組換えヤギを作出し、反芻家畜のGnRHサージ発生中枢を決定することを目指した。さらに、新たなGnRHサージ発生制御メカニズムの探索に利用できる、ヤギ由来キスペプチンニューロン細胞株およびGnRHニューロン細胞株の樹立を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) キスペプチンニューロンの活動を任意に操作可能な遺伝子組換えヤギの作出

ヤギのキスペプチンニューロン特異的に人工受容体を発現させ、そのリガンドを投与することによって、キスペプチンニューロンを任意に操作することを目指した。まずゲノム編集技術TALENにより、ヤギ胎子線維芽細胞のキスペプチン遺伝子座にCreリコンビナーゼをノックイン後、目的通りに遺伝子が改変された細胞クローンを得た。この細胞クローンの核をヤギ未受精卵に移植する体細胞核移植法により、目的の遺伝子組換えヤギの作出を試みた。また、Cre特異的に組換えを起こして人工受容体を発現する遺伝子配列を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。このアデノ随伴ウイルスベクターを、上記の遺伝子組換えヤギの視床下部に注入することで、キスペプチン遺伝子特異的に人工受容体を発現するヤギが作出される。

#### (2) ヤギ視床下部神経細胞株の樹立

ヤギのメス胎子から視床下部のPOAとARCをそれぞれ採取して初代培養し、レンチウイルスベクターを用いて癌原遺伝子(SV40 T antigen)を導入することで不死化させた。次に不死化細胞集団の細胞クローニングを行い、各細胞クローンの凍結保存とRNA抽出を行った。各細胞クローンにおける神経細胞マーカーやキスペプチンニューロンマーカー、GnRHニューロンマーカーのmRNA発現量をRT-PCRにて解析した(図1)。遺伝子発現パターンからPOAキスペプチンニューロン細胞株、ARCキスペプチンニューロン細胞株、GnRHニューロン細胞株の候補を特定した。これらの候補細胞株について、キスペプチン/GnRHニューロンマーカーのペプチド/タンパク質発現確認のための免疫細胞化学(IHC)、GnRH分泌確認のための酵素抗体標識法(enzyme immunoassay)、キスペプチンに対する反応性の解析(Ca<sup>2+</sup>イメージング)、細胞増殖アッセイ等を実施した。

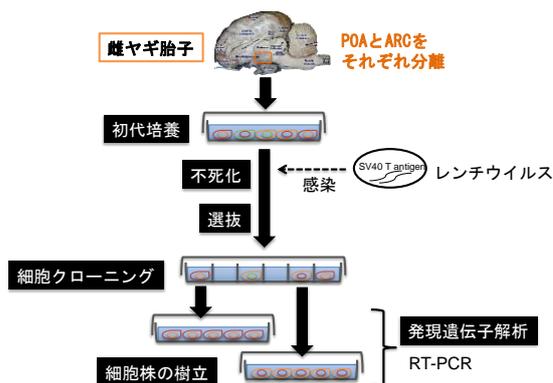


図1. ヤギ胎子視床下部由来細胞株の樹立

### 4. 研究成果

#### (1) キスペプチンニューロンの活動を任意に操作可能な遺伝子組換えヤギの作出

TALENによりヤギ胎子線維芽細胞のキスペプチン遺伝子座にCreリコンビナーゼをノック

イン後、細胞クローニングを行い、目的通りに遺伝子が改変された細胞クローンを得ることに成功した。しかし、体細胞核移植により正常に発生する胚の作出には至らなかった。予備検討として、蛍光遺伝子を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターをヤギ視床下部に注入し、ヤギ脳で最も遺伝子導入効率のいいウイルス血清型および適切な注入条件を決定した。次に、キスペプチンニューロン特異的に人工受容体を発現させるためのアデノ随伴ウイルスを作製し、ヤギ視床下部のキスペプチンニューロン近傍に注入したが、キスペプチンニューロンに限定した遺伝子発現は得られなかった。

## (2) ヤギ視床下部神経細胞株の樹立

細胞クローニングにより、ヤギ POA 由来不死化細胞クローンが 80 個、ARC 由来不死化細胞クローンが 60 個得られた。そのうちそれぞれ 48 個と 36 個を神経由来細胞株と同定し、以降の解析に用いた。

### ① POA (排卵中枢) キスペプチンニューロン細胞株の樹立

POA 神経由来細胞株 48 個について、POA キスペプチンニューロンマーカーの遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。その結果、キスペプチン遺伝子 (*KISS1*) とエストロジェン受容体  $\alpha$  遺伝子 (*ESR1*) の両方を発現する細胞株を 3 つ (GP34、GP64、GP66) 特定した。これを POA キスペプチンニューロン細胞株候補として以降の解析を行った。

エストロジェンに対する *KISS1* 発現量の変化を定量 RT-PCR にて解析した結果、GP64 においてエストロジェン添加により有意に *KISS1* 発現量が増加した (図 2)。GP64 において、POA キスペプチンニューロンが産生するキスペプチンとエストロジェン受容体  $\alpha$  の免疫細胞化学を行った結果、両方のシグナルが検出された。以上のように GP64 は生体における POA キスペプチンニューロンの性質を保持していたことから、POA キスペプチンニューロン細胞株と同定した。

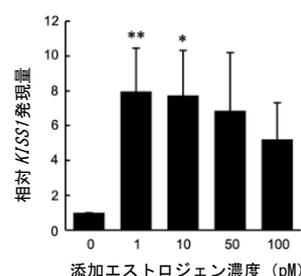


図 2. エストロジェン添加による *KISS1* 発現量の増加 (GP64)

### ② ARC (卵巣発育中枢) キスペプチンニューロン細胞株の樹立

ARC 神経由来細胞株 36 個について、ARC キスペプチンニューロンマーカーの遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。その結果、キスペプチン遺伝子 (*KISS1*)、ニューロキニン B 遺伝子 (*TAC3*)、ダイノルフィン A 遺伝子 (*PDYN*)、エストロジェン受容体  $\alpha$  遺伝子 (*ESR1*)、プロゲステロン受容体遺伝子 (*PGR*)、ニューロキニン B 受容体遺伝子

(*TACR3*) を全て発現する細胞株を 1 つ (GA28) 特定した (図 2)。これを ARC キスペプチンニューロン細胞株候補として以降の解析を行った。

GA28 において、ARC キスペプチンニューロンが産生するペプチド (キスペプチン、ニューロキニン B、ダイノルフィン A) の免疫細胞化学を行った結果、全てのペプチドのシグナルが検出された。またエストロジェンに対する *KISS1* 発現量の変化を定量 RT-PCR にて解析した結果、エストロジェン添加により有意に *KISS1* 発現量が低下した。以上のように GA28 は生体における ARC キスペプチンニューロンの性質を保持していたことから、ARC キスペプチンニューロン細胞株と同定した。

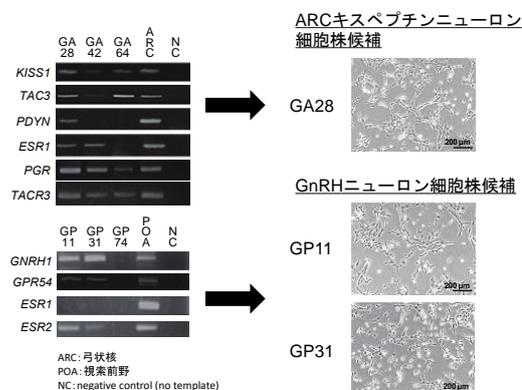


図 3. 遺伝子発現解析 (RT-PCR) による細胞株のスクリーニング

### ③ GnRH ニューロン細胞株の樹立

POA 神経由来細胞株 48 個について、GnRH ニューロンマーカーの遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。その結果、GnRH 遺伝子 (*GNRH1*)、キスペプチン受容体遺伝子 (*GPR54*)、エストロジェン受容体  $\beta$  遺伝子 (*ESR2*) を全て発現し、かつエストロジェン受容体  $\alpha$  遺伝子 (*ESR1*) を発現しない細胞株を 2 つ (GP11、GP31) 特定した (図 3)。これらを GnRH ニューロン細胞株候補として以降の解析を行った。

GP11、GP31 において、GnRH の免疫細胞化学を行った結果、シグナルが検出された。また、細胞培養上清中の GnRH 濃度を enzyme immunoassay にて測定した結果、GP11 と GP31 が GnRH を分泌していることが示された。さらに、 $Ca^{2+}$  イメージングにてキスペプチンを添加すると細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇したことから、GP11 と GP31 はキスペプチンに対する応答性を持つことが示された (図 4)。以上のように GP11、GP31 は生体における GnRH ニューロンの性質を保持していたことから、GnRH ニューロン細胞株と同定した。

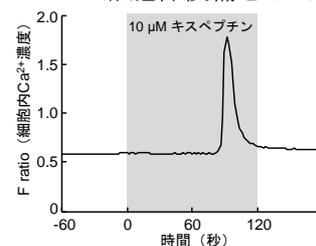


図 4. キスペプチン添加による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇 (GP11)

上記の 4 細胞株 (GP64、GA28、GP11、GP31) は全て、細胞増殖アッセイの結果、3 回の継代の

間安定した増殖能を示した。また、3回の継代の間、各マーカー遺伝子の発現も変化しないことを確認した。すなわち、細胞株として安定的に継代し、様々な解析に利用できると考えられる。以上の結果を2報の論文として国際誌に発表した（文献①、②）。これらのヤギキスペプチンおよびGnRHニューロン細胞株は家畜で唯一の視床下部由来神経細胞株であり、反芻家畜における繁殖中枢制御機構の解明および繁殖制御剤の開発に今後利用可能である。

<引用文献>

- ① Suetomi Y, Tatebayashi R, Sonoda S, Munetomo A, Matsuyama S, Inoue N, Uenoyama Y, Takeuchi Y, Tsukamura H, Ohkura S, Matsuda F, Establishment of immortalised cell lines derived from female Shiba goat KNDy and GnRH neurones, *Journal of Neuroendocrinology*, 32 巻、2020、e12857.
- ② Oshimo Y, Munetomo A, Magata F, Suetomi Y, Sonoda S, Takeuchi Y, Tsukamura Y, Ohkura S, Matsuda F, Estrogen increases *KISS1* expression in newly generated immortalized *KISS1*-expressing cell line derived from goat preoptic area, *Journal of Reproduction and Development*, 67 巻、2021、15-23

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 4件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>SASAKI Takuya, SONODA Tomoya, TATEBAYASHI Ryoki, KITAGAWA Yuri, OISHI Shinya, YAMAMOTO Koki, FUJII Nobutaka, INOUE Naoko, UENOYAMA Yoshihisa, TSUKAMURA Hiroko, MAEDA Kei-ichiro, MATSUDA Fuko, MORITA Yasuhiro, MATSUYAMA Shuichi, OHKURA Satoshi       | 4. 巻<br>66              |
| 2. 論文標題<br>Peripheral administration of SB223412, a selective neurokinin-3 receptor antagonist, suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion by acting on the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in estrogen-treated ovariectomized female goats | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Reproduction and Development  | 6. 最初と最後の頁<br>351 ~ 357 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1262/jrd.2019-145   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>MINABE Shiori, NAKAMURA Sho, FUKUSHIMA Eri, SATO Marimo, IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, INOUE Naoko, UENOYAMA Yoshihisa, TSUKAMURA Hiroko, MAEDA Kei-ichiro, MATSUDA Fuko | 4. 巻<br>66              |
| 2. 論文標題<br>Inducible <i>Kiss1</i> knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Reproduction and Development   | 6. 最初と最後の頁<br>369 ~ 375 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1262/jrd.2019-164  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Suetomi Yuta, Tatebayashi Ryoki, Sonoda Shuhei, Munetomo Arisa, Matsuyama Shuichi, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Takeuchi Yukari, Tsukamura Hiroko, Ohkura Satoshi, Matsuda Fuko | 4. 巻<br>32           |
| 2. 論文標題<br>Establishment of immortalised cell lines derived from female Shiba goat KNDy and GnRH neurones   | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Neuroendocrinology   | 6. 最初と最後の頁<br>e12857 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jne.12857   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-            |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>OSHIMO Yukina, MUNETOMO Arisa, MAGATA Fumie, SUETOMI Yuta, SONODA Shuhei, TAKEUCHI Yukari, TSUKAMURA Hiroko, OHKURA Satoshi, MATSUDA Fuko      | 4. 巻<br>67            |
| 2. 論文標題<br>Estrogen increases <i>KISS1</i> expression in newly generated immortalized <i>KISS1</i> -expressing cell line derived from goat preoptic area | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Reproduction and Development  | 6. 最初と最後の頁<br>15 ~ 23 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1262/jrd.2020-053   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Dai Mingdao, Nakamura Sho, Takahashi Chudai, Sato Marimo, Munetomo Arisa, Magata Fumie, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Matsuda Fuko | 4. 巻<br>in press       |
| 2. 論文標題<br>Reduction of arcuate kappa-opioid receptor-expressing cells increased luteinizing hormone pulse frequency in female rats                  | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>Endocrine Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1507/endocrj.EJ20-0832  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-              |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuda Fuko, Ohkura Satoshi, Magata Fumie, Munetomo Arisa, Chen Jing, Sato Marimo, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko | 4. 巻<br>45                |
| 2. 論文標題<br>Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in rodents and non rodent mammals                          | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Obstetrics and Gynaecology Research  | 6. 最初と最後の頁<br>2318 ~ 2329 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jog.14124   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Sasaki T., Ito D., Sonoda T., Morita Y., Wakabayashi Y., Yamamura T., Okamura H., Oishi S., Noguchi T., Fujii N., Uenoyama Y., Tsukamura H., Maeda K.I., Matsuda F., Ohkura S.      | 4. 巻<br>68            |
| 2. 論文標題<br>Peripheral administration of $\mu$ -opioid receptor antagonist stimulates gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in ovariectomized, estrogen-treated female goats | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Domestic Animal Endocrinology   | 6. 最初と最後の頁<br>83 ~ 91 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.domaniend.2018.12.011   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Minabe Shiori, Sato Marimo, Inoue Naoko, Watanabe Youki, Magata Fumie, Matsuda Fuko, Uenoyama Yoshihisa, Ozawa Hitoshi, Tsukamura Hiroko | 4. 巻<br>160               |
| 2. 論文標題<br>Neonatal Estrogen Causes Irreversible Male Infertility via Specific Suppressive Action on Hypothalamic Kiss1 Neurons                    | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Endocrinology  | 6. 最初と最後の頁<br>1223 ~ 1233 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1210/en.2018-00732  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura Sho, Ito Yoshiko, Yamamoto Koki, Takahashi Chudai, Dai Mingdao, Tanahashi Miyu, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Oishi Shinya, Maeda Kei-ichiro, Matsuda Fuko | 4. 巻<br>102             |
| 2. 論文標題<br>SB223412, a neurokinin-3 receptor-selective antagonist, suppresses testosterone secretion in male guinea pigs  | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Theriogenology  | 6. 最初と最後の頁<br>183 ~ 189 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.theriogenology.2017.07.053  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>松田二子、前多敬一郎、大蔵 聡、上野山賀久、東村博子         | 4. 巻<br>35             |
| 2. 論文標題<br>中枢からのアプローチ：新たな神経内分泌メカニズムを利用した繁殖制御 | 5. 発行年<br>2017年        |
| 3. 雑誌名<br>臨床獣医                               | 6. 最初と最後の頁<br>98 ~ 101 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし               | 査読の有無<br>無             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難       | 国際共著<br>-              |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Hassaneen A, Naniwa Y, Suetomi Y, Matsuyama S, Kimura K, Ieda N, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI, Matsuda F, Ohkura S  | 4. 巻<br>62            |
| 2. 論文標題<br>Immunohistochemical characterization of the arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) and preoptic kisspeptin neuronal populations in the hypothalamus during the estrous cycle in heifers. | 5. 発行年<br>2016年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Reproduction and Development   | 6. 最初と最後の頁<br>471-477 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1262/jrd.2016-075  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 9件)

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>松田二子、真方文絵、東村博子、前多敬一郎    |
| 2. 発表標題<br>家畜における生殖技術の進歩           |
| 3. 学会等名<br>第91回 日本内分泌学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2018年                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松田二子                        |
| 2. 発表標題<br>キスベプチンニューロンによる繁殖制御メカニズムの新知見 |
| 3. 学会等名<br>第161回 日本獣医学会学術集会（招待講演）      |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐々木 拓弥、園田 朋也、大石 真也、藤井 信孝、森田 康広、松山 秀一、井上 直子、上野山 賀久、束村 博子、前多 敬一郎、松田 二子、大蔵 聡 |
| 2. 発表標題<br>ニューロキニンB受容体拮抗剤の経口投与はパルス状LH分泌を抑制する   |
| 3. 学会等名<br>第111回 日本繁殖生物学会大会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Jing Chen, Shiori Minabe, Chudai Takahashi, Kei-ichiro Maeda, Fuko Matsuda  |
| 2. 発表標題<br>Kisspeptin is required to induce testosterone surge in perinatal male rats. |
| 3. 学会等名<br>第111回 日本繁殖生物学会大会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>棟朝亜理紗、中島大貴、前多敬一郎、松田二子                                   |
| 2. 発表標題<br>ラットKORおよびGPR54プロモーター領域の同定とKORニューロンおよびGPR54ニューロンの投射先の可視化 |
| 3. 学会等名<br>第45回 日本神経内分泌学会学術集会                                      |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Arisa MUNETOMO, Daiki NAKAJIMA, Kei-Ichiro MAEDA, Fuko MATSUDA   |
| 2. 発表標題<br>The kappa opioid receptor (KOR)-expressing neurons localize in the ventromedial hypothalamic nucleus and project to KNDy neurons, the GnRH pulse generator, in rats. |
| 3. 学会等名<br>ENDO2019 ( 国際学会 )  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Jing CHEN, Shiori MINABE, Chudai TAKAHASHI, Arisa MUNETOMO, Fumie MAGATA, Sho NAKAMURA, Yoshihisa UENOYAMA, Hiroko TSUKAMURA, Kei-ichiro MAEDA, Fuko MATSUDA |
| 2. 発表標題<br>Kisspeptin is required for perinatal testosterone surge in male rats   |
| 3. 学会等名<br>ENDO2019 ( 国際学会 )  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shiori Minabe, Sho Nakamura, Eri Fukushima, Naoko Inoue, Yoshihisa Uenoyama, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura, and Fuko Matsuda |
| 2. 発表標題<br>Inducible Kiss1 knockout in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile LH secretion in male mice.                      |
| 3. 学会等名<br>ENDO2019 ( 国際学会 )   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ryoki Tatebayashi, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Satoshi Ohkura, Fuko Matsuda  |
| 2. 発表標題<br>TALEN-mediated Cre recombinase knockin in KISS1 locus of goat embryonic fibroblasts |
| 3. 学会等名<br>Fourth World Congress of Reproductive Biology ( 国際学会 )                              |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kei Horihata, Ai Takahashi, Naoko Inoue, Nahoko Ieda, Yoshihisa Uenoyama, Yuta Suetomi, Fuko Matsuda, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura |
| 2. 発表標題<br>Establishment and evaluation of rat kisspeptin neuronal cell lines   |
| 3. 学会等名<br>Fourth World Congress of Reproductive Biology (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀畑慶、井上直子、家田菜穂子、上野山賀久、末富祐太、松田二子、前多敬一郎、束村博子   |
| 2. 発表標題<br>哺乳類の生殖中枢の制御機構解明に資する ラットキスペプチンニューロン不死化細胞株の作出 |
| 3. 学会等名<br>東海畜産学会                                      |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kei Horihata, Naoko Inoue, Nahoko Ieda, Yoshihisa Uenoyama, Yuta Suetomi, Fuko Matsuda, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura |
| 2. 発表標題<br>Establishment of Immortalized Cell Lines Derived from Rat AVPV and ARC Kisspeptin Neurons                                  |
| 3. 学会等名<br>ENDO 2018 (Annual meeting of Endocrine Society) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ryoki Tatebayashi, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Satoshi Ohkura, Fuko Matsuda |
| 2. 発表標題<br>Modification of KISS1 gene in goat embryonic fibroblasts using TALEN               |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016 (国際学会)         |
| 4. 発表年<br>2016年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Riho OZAKI, Yuta SUETOMI, Shuichi MATSUYAMA, Koji KIMURA, Satoshi OHKURA, Fuko Matsuda |
| 2. 発表標題<br>Establishment of immortalized cell lines derived from cattle GnRH neurons              |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016 (国際学会)             |
| 4. 発表年<br>2016年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>末富祐太, 館林亮輝, 束村博子, 大蔵聡, 松田二子 |
| 2. 発表標題<br>シバヤギKNDyニューロン不死化細胞株の樹立      |
| 3. 学会等名<br>第109回日本繁殖生物学会大会             |
| 4. 発表年<br>2016年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yuta Suetomi, Ryoki Tatebayashi, Hiroko Tsukamura, Satoshi Ohkura, Fuko Matsuda |
| 2. 発表標題<br>Establishment of a Neuronal Cell Line Derived from KNDy Neuron in a Goat        |
| 3. 学会等名<br>The 49th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (国際学会)         |
| 4. 発表年<br>2016年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堀畑慶, 家田菜穂子, 井上直子, 上野山賀久, 末富祐太, 松田二子, 前多敬一郎, 束村博子 |
| 2. 発表標題<br>ラットキスペプチンニューロン不死化細胞株の樹立                          |
| 3. 学会等名<br>第109回日本繁殖生物学会大会                                  |
| 4. 発表年<br>2016年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋 宙大, 後藤 哲平, 平林 真澄, 中村 翔, 戴 明道, 池上 花奈, 松田二子, 上野山賀久, 束村博子, 前多 敬一郎 |
| 2. 発表標題<br>遺伝子改変ラットを用いたkappa opioid receptor (KOR)発現細胞の解析                    |
| 3. 学会等名<br>第43回日本神経内分泌学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2016年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松田二子, 渡辺雄貴, 大蔵聡, 井上直子, 上野山賀久, 前多敬一郎, 束村博子 |
| 2. 発表標題<br>排卵中枢キスペプチンニューロンの性分化には種差がある                |
| 3. 学会等名<br>第13回GPCR研究会                               |
| 4. 発表年<br>2016年                                      |

〔図書〕 計1件

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>公益社団法人日本動物学会 (松田二子, 前多敬一郎) | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>丸善出版                       | 5. 総ページ数<br>800 |
| 3. 書名<br>動物学の百科事典 (ストレスとホルモン)        |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| <p>東京大学獣医繁殖種学教室<br/> <a href="http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/ikushu/index.html">http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/ikushu/index.html</a><br/>         東京大学大学院農学生命科学研究科獣医繁殖種学教室ホームページ<br/> <a href="http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/ikushu/index.html">http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/ikushu/index.html</a></p> |
|---|

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|