

令和元年6月11日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08001

研究課題名(和文)ニューロキニンBを用いた種畜側からの受胎率改善技術の開発研究

研究課題名(英文)Development of activation method for animal reproduction using neurokinin B in male domestic animals

研究代表者

山村 崇 (YAMAMURA, Takashi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 家畜育種研究繁殖領域・主任研究員

研究者番号：60582723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：種畜においてもニューロキニンB(NKB)は、繁殖制御中枢の一翼を担うGnRHパルスジェネレータ活動を刺激し、性腺刺激ホルモン分泌を促し、性腺機能を賦活化する作用を有することが明らかになった。このことから、今後NKB受容体作動薬の適切な投与量、投与方法を詳細に検討することで、種畜側からも受胎率の改善に寄与できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NKBの作用により、性腺の機能を繁殖機能の上位中枢から制御でき、精巣の機能を適度に賦活化できる可能性が示されたことから、暑熱やストレスの影響で繁殖機能が衰えた種畜を人為的に回復できる可能性が示された。また、NKBは繁殖中枢に働きかけることから、末梢器官へ製剤を直接的かつ薬理的に作用させるよりも、動物本来の繁殖機能をバランス良く高めることができ、従来の繁殖機能改善方法よりも優れた効果により受胎率の改善に寄与できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neurokinin B (NKB) and its receptor, neurokinin-3 receptor (NK3R), have been thought to be profoundly involved in reproduction. Recent studies suggested that an application of NKB/NK3R signaling is valuable for management for fertility in female animals. To clarify the role of NKB/NK3R signaling in gonadal function of male animals, we examined the effects of intravenous administration of NK3R agonists on GnRH pulse generator activity and LH secretion in male domestic animals. Bolus injection of NK3R agonists immediately activated GnRH pulse generator. Continuous infusion of NK3R agonists provoked higher GnRH pulse generator activities with corresponding LH secretion in a dose-dependent manner. In addition, NK3R agonists administration restored testis functions in reproductive dysfunction. These results indicate that NK3R agonists may hold promise for noble therapeutic applications to enhance gonadal activities in male domestic animals.

研究分野：動物生理学

キーワード：ニューロキニン 性腺機能賦活化 ヤギ ウシ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年、家畜の受胎率の著しい低下が叫ばれており、家畜生産において大きな問題になっている。これは、分娩後の栄養状態やストレスにより性ホルモンや卵巣の機能の低下が引き起こされていることが原因の一つとされており、これを改善するために、空胎期間を短くするための早期妊娠判定技術の開発や卵巣機能の賦活化を促すアプローチが雌の家畜を対象に取られている。一方、種畜側による影響も指摘されており、種畜への暑熱やストレスの影響による精液性状の悪化が起き、運動性の高さなどの精子の質が受胎率に影響を及ぼすことが示唆されている。このことから、種畜の性腺機能を高めてやることにより受胎率を改善できることが考えられる。

性腺の活動の制御は、脳の視床下部より分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）のパルス状分泌によって制御されている。近年、脳の弓状核に存在し、このパルス状分泌を上位から制御する KNDy ニューロンが発見された。申請者が所属する研究室では、ヤギを用いた実験から、KNDy ニューロン近傍で周期的な神経発火活動の上昇が起き、それと同期した血中黄体形成ホルモン（LH）のパルス状分泌が見られたことから、その神経活動が GnRH パルスジェネレータ活動として GnRH のパルス状分泌を制御している可能性を示している（引用文献①）。さらに、KNDy ニューロンを構成する因子であるニューロキニン B（NKB）がこの神経活動を誘起することを明らかにしている（引用文献②、③）。また、NKB 受容体の作動薬であるセンクタイドを血中へ持続投与すると神経活動の頻度が持続的に増すことが分かっていることから、NKB を用いることにより性腺の活動を人為的に調節できる可能性が示された。

### 2. 研究の目的

本研究では、雌の家畜で検討されているニューロキニン B（NKB）による性腺機能賦活化技術を雄の家畜へ応用するための知見を得て、種畜側から受胎率の改善に寄与できる手法の開発を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ・NKB の作用機序の解析

雄の家畜の性腺機能に対する NKB の作用を明らかにするため、精巣の活動を制御する繁殖制御中枢への NKB の作用を解析した。精巣の活動を制御するパルス状 LH 分泌を反映する脳の視床下部弓状核近傍の神経発火活動を多ニューロン発火活動（Multiple-Unit Activity: MUA）として記録できるように電極を留置する外科手術を施した雄ヤギを供試した。NKB の特異的な作用を明らかにするため、NKB 受容体特異的作動薬であるセンクタイドを用いて、末梢血中へ単回（10 nmol, 50 nmol/頭）および持続（5 nmol, 20 nmol/分）投与した際の MUA と頻回採血による血中 LH 濃度の変化を解析した。陰性対照として溶媒である生理食塩液を用いた。また、より活性の高い NKB 受容体作動薬の開発を目指して作成された新規作動薬（引用文献④）を単回血中投与した際の影響も同様に検討した。

#### ・NKB 投与が繁殖行動不全雄ウシへ与える影響の解析

黒毛和種雄ウシ（2 歳）で採精の訓練を始めるも擬牝台に乗らず、射精もせず、雄性ホルモンである血中テストステロン値を測定したところ低値で推移していた個体に対し、NKB 製剤を投与した際の精巣の機能や繁殖行動に及ぼす影響を検討した。NKB の効果を調べるために、新規 NKB 受容体作動薬を単回筋肉内投与（1000 nmol）し、その際に採血を行い、血中テストステロン濃度と LH 濃度を測定するとともに、採精や擬牝台の乗駕を試みた。これを毎週 1 回、8 週間に渡り繰り返した。

### 4. 研究成果

#### ・単回投与の結果

GnRH パルスジェネレータ活動の指標となる MUA の一過性上昇（MUA ボレー）が約 30 分の間隔で安定して発現している中、2 つの連続した MUA ボレーの midpoint でセンクタイドを末梢血中へ単回投与したところ、10 nmol では MUA ボレーは誘起されなかったが、50 nmol の投与により MUA ボレーが誘起された（図 1）。これらの結果から、NKB 受容体作動薬は雄ヤギにおいても GnRH パルスジェネレータの活動を上昇させる効果を持つことが示された。

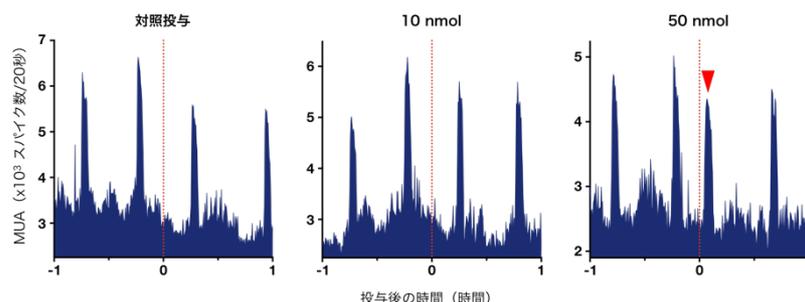


図1 NKB受容体作動薬を雄ヤギに血中単回投与した際のおニューロン発火活動(MUA)の代表例。赤い点線は投与したタイミングを示し、赤矢じりはNKB受容体作動薬により誘起されたMUAボレーを示す。

・持続投与の結果

単回投与時と同様の条件下で、センクタイトを末梢血中へ3時間持続投与した結果、MUAボレーの間隔が濃度依存的に短縮された(図2A, B)。また、それに伴いLHのパルス様分泌の頻度の増加も観察された(図2A)。しかし、平均血中LH濃度の変化は見られなかった(図2B)。これらのことから、NKB受容体作動薬を持続的に投与することにより、GnRHパルスジェネレータの活動を高め、精巢の機能を賦活化できる可能性が示された。

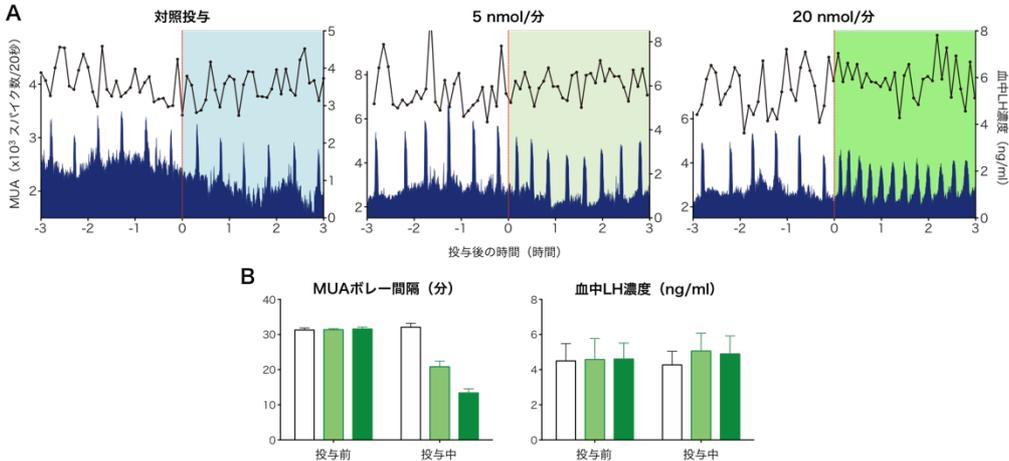


図2 NKB受容体作動薬を雄ヤギに血中持続投与した結果。A: 他ニューロン発火活動(MUA)と血中LH分泌の代表例。赤い点線は投与したタイミングを示す。B: 投与によるMUAと血中LH濃度の解析結果。

・新規作動薬投与の結果

過去の報告(引用文献⑤)のように、作動薬の効果の持続時間を検討するために、試験当日の個体の内因性のMUAボレー間隔を計算し、その間隔の80%以内で起きたボレーは作動薬により誘発されたボレーとし、作動薬投与後内因性のMUAボレー間隔に復帰するまでの時間を測定した。センクタイト(200 nmol)を投与した結果、MUAボレーは1~2回誘起されるのみで、効果の持続時間は28.6±6.8分であったのに対し、新規作動薬(200 nmol)では11~14回誘起され、効果の持続時間は137.3±13.6分であった。これらの結果から、新規作動薬は単回投与でも持続効果を有することが明らかになった。

・繁殖行動不全雄ウシに対するNKB受容体作動薬の影響の解析

新規NKB受容体作動薬(1000 nmol)を筋肉内投与した結果、ウシの擬牝台への乗駕行動は見られず繁殖行動に及ぼす顕著な影響は観察されなかった。しかし、投与後に陰茎の勃起/伸長が見られ、少量の漿液および精液の射出とともに活性を有する精子を得ることができた。また、血中ホルモン濃度を測定した結果、血中LH濃度には変化が見られず低値で推移したものの、血中テストステロン濃度においては数値が安定して持続しないが投与前と比較して増加した(図3)。これらのことから、NKB受容体作動薬の単回投与では繁殖行動不全を改善するまでには至らなかったが、NKBが繁殖中枢を刺激することで精巢の機能が高まること示唆された。

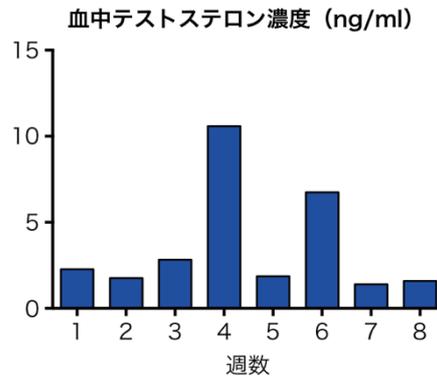


図3 NKB受容体作動薬投与時の血中テストステロン濃度の推移

以上の結果から、NKB は種畜においても繁殖中枢上位から性腺機能を賦活化する作用を有し、今後適切な投与量や投与方法を明らかにすることにより、種畜側からも寄与できる新たな受胎率改善技術が開発されることが期待される。

<引用文献>

- ① Yoshihiro Wakabayashi, Tomoaki Nakada, Ken Murata, Satoshi Ohkura, Kazutaka Mogi, Víctor M Navarro, Donald K Clifton, Yuji Mori, Hiroko Tsukamura, Kei-Ichiro Maeda, Robert A Steiner, Hiroaki Okamura. 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. *Journal of Neuroscience*, 2010, 30(8), 3124-32.
- ② Yoshihiro Wakabayashi, Takashi Yamamura, Kohei Sakamoto, Yuji Mori, Hiroaki Okamura. Electrophysiological and morphological evidence for synchronized GnRH pulse generator activity among kisspeptin/neurokinin B/dynorphin A (KNDy) neurons in goats. *Journal of Reproduction and Development*, 2013, 59(1), 40-48.
- ③ Takashi Yamamura, Yoshihiro Wakabayashi, Satoshi Ohkura, Hiroaki Okamura. Effect of intravenous administration of neurokinin receptor subtype-selective agonists on gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and luteinizing hormone secretion in goats. *Journal of Reproduction and Development*, 2015, 61(1), 20-29.
- ④ 国内特許, 発明者: 大石真也, 藤井信孝, 大野浩章, 桑井真司, 若林嘉浩, 山村崇, 田中知己, 遠藤なつ美. 新規 NK3 受容体アゴニスト, 特開 2017-81917, 公開日: 2017 年 5 月 18 日, 出願人: 国立大学法人京都大学, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 国立大学法人東京農工大学.
- ⑤ Ryosuke Misu, Shinya Oishi, Ai Yamada, Takashi Yamamura, Fuko Matsuda, Koki Yamamoto, Taro Noguchi, Hiroaki Ohno, Hiroaki Okamura, Satoshi Ohkura, Nobutaka Fujii. Development of novel neurokinin 3 receptor (NK3R) selective agonists with resistance to proteolytic degradation. *Journal of Medical Chemistry*, 2014, 57, 8646-51.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Takashi Yamamura, Satoshi Ohkura, Yoshihiro Wakabayashi, Neurokinin B/neurokinin-3 receptor signaling is involved in the regulation of GnRH pulse generation in male goats. Fourth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017), 2017/9/27-29, Okinawa Convention Center (Okinawa, Japan)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

なし

※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、研究者個人に帰属されます。