

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02329

研究課題名(和文) 泌乳と加齢が牛ゴナドトロフの分泌を抑制する機構の新規受容体GPR61に基づく解明

研究課題名(英文) Clarify mechanism for lactational or aged infertility depending on newly discovered GPR61 in bovine gonadotroph

研究代表者

角川 博哉 (Kadokawa, Hiroya)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：80370592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,700,000円

研究成果の概要(和文)：成果の詳細は2021年に英国科学誌Scientific Reportsで発表した。背景は、分娩後泌乳牛や加齢後雌和牛では、性機能促進役である下垂体前葉ゴナドトロフ細胞の機能が未解明の機構のために抑制され、様々な繁殖障害が生じることである。本研究により、暗黒大陸として扱われてきた脳における重要な病理メカニズムが解明された。エタノールアミン・プラズマローゲンの質が、泌乳ストレスや加齢で悪化することが原因であった。これらの成功に至った理由は、申請者がゴナドトロフ細胞で新規受容体GPR61を発見していたことである。また最新の分析手法である2次元LCMSを効果的に導入できたことも重要な理由である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分娩後泌乳牛や加齢後雌和牛で生じる繁殖障害の大部分は、下垂体前葉内のゴナドトロフ細胞の異常が原因である。本研究により、未解明であった病理メカニズム、中でも暗黒大陸とされてきた脳内のメカニズムが発見された。現在、日本国内の牛肉生産の現場では、子牛が著しく不足しているため、肉牛農家は経営存続の危機に陥っている。特に繁殖農家では10歳までに8回分娩させる対策が極めて重要になったが、加齢後の雌和牛では、下垂体機能の低下のため不妊個体が多発する。本研究の成果は、これらの問題解決のための重要な基盤になる。これらの発見はヒトにもあてはめられる可能性が高く、産婦人科用等の創薬シーズとして期待される。

研究成果の概要(英文)：The details of studies were published in Scientific Reports in 2021. The background of the study is infertility caused by suppressed functions of the central player of fertility control, gonadotrophs in pituitaries, due to lactation stress and aging via unclarified mechanisms in cattle. This study clarified an important pathophysiological mechanism in brain, and causative substance, ethanolamine plasmalogen (EPI). Both lactation-stress and aging make worse the quality of EPI resulted in weak stimulation function for gonadotrophs. The primary reason of this successful discoveries is G-protein-coupled receptor 61 (GPR61), discovered by Kadokawa et al. in bovine pituitaries. This novel receptor is co-localize with GnRH receptors on the gonadotroph surface. Another reason of this success is utilizing a newly developed method, two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry. The obtained results can be developed also for human medicine.

研究分野：繁殖

キーワード：加齢 泌乳

## 1. 研究開始当初の背景

乳牛の繁殖障害による分娩間隔延長は、低乳量・低収益の期間を延長させながら治療費・飼料代等のコストを増加させるため、酪農家に年間数百万円の損失を生じている。また国内では子ウシが不足して価格が高騰し、肉牛肥育農家と共に、和牛繁殖農家も後継用の繁殖用雌和牛が高騰したため経営存続の危機に陥っている。そのため和牛繁殖農家では、10歳までに8回分娩させるという対策が重要になっているが、繁殖雌は加齢で中年に至ると妊娠開始が困難になる。下垂体前葉に存在するゴナドトロフは、性腺刺激ホルモン(LH)や卵胞刺激ホルモン(FSH)という生殖のための非常に重要なホルモンを分泌する細胞で、性機能調節の中心である。しかし泌乳牛や中年の繁殖用雌和牛では、ゴナドトロフが血中にLH・FSHを分泌する能力が低下している。したがってLH・FSH分泌障害メカニズムの解明、ならびに診断法・治療法の開発が急務である。

研究代表者らは、ウシゴナドトロフにおいて、GPR61を2016年に発見した。さらに代表者らは、ゴナドトロフの細胞表面の脂質イカダの上で、GPR61はGnRH受容体と複合体を形成していることも2017年に発見した。一方、本研究の分担者になる予定であったが他界された九州大学医学部の片淵教授が、2016年にGPR61のリガンドとして、エタノールアミンプラズマローゲン(EPI)である可能性を報告した。さらに加齢によりヒト脳内プラズマローゲン量が減少することがアルツハイマー発症の原因であることも報告した。動物体内でプラズマローゲンの主要合成部位は、視床下部を含む脳の全領域である。そのため泌乳や加齢によるウシ脳でのプラズマローゲン量の減少という仮説が浮上した。またエンドキシンをマウスに投与すると、脳内プラズマローゲン量が減るという報告もある。乳房炎等の炎症、ならびに、粗飼料不足・濃厚飼料過剰のため、乳牛では血中エンドキシン量が多いため、脳内EPI量の低下が想定される。代表者らは、ウシ脳から抽出したプラズマローゲンを培養下のウシゴナドトロフに作用させるという予備実験も実施した。そしてGnRHが無くてもGnRH受容体の伝達経路をGPR61が活性化し強力にLH・FSH分泌を刺激することも研究開始当初には発見していた。

## 2. 研究の目的

これらのことから、代表者らが発見したゴナドトロフが発現する新規受容体GPR61と、そのリガンド、EPIに基づいた、泌乳牛や中年の繁殖用雌和牛のゴナドトロフにおけるLH・FSHの分泌異常発症メカニズムの存在が考えられるようになった。この解明を本研究の目的とした。

EPIの構造は、2本足の蛸にたとえられる。頭部はエタノールアミンで、第1の足は脂肪族アルコールで、第2の足は脂肪酸である。両足の組み合わせは多様なためEPIは単一構造ではなく、様々な分子種の群となる。加齢や泌乳により、脳内でのEPI合成に異常を生じ、EPI量や構成脂肪酸組成が変化し、ゴナドトロフのGPR61を介したLH・FSHの分泌刺激作用の変化が生じることが、繁殖障害の原因では無いかという仮説が考えられた。そこでこの検証も本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 正常な性機能を有する若繁殖雌、加齢後繁殖雌、ならびに加齢後泌乳牛の脳(視床下部他)から、EPIを精製した。次に、若牛の下垂体細胞を培養し、精製EPIをゴナドトロフ細胞に作用させた。最後に分泌されたLH・FSH量をイムノアッセイ法で測定し、分泌刺激作用を評価した。

(2) EPIの構造は様々な脂肪族アルコールや脂肪酸が結合したもので単一ではない。ウシ脳のEPI量や構成部品が、加齢や泌乳のためにどのように変化するか調べることにした。当初、薄層クロマトグラフィー(TLC)、液体クロマトグラフィー質量分析計(HPLC/MSMS)、ガスクロマトグラフィー(GCMS)による測定を試みたが、これらの分析方法では十分な精度が得られなかった。そこで2018年に2次元LC-MSの開発に成功された、大阪府立大学の北村教授らとの共同研究により、2本足の組み合わせを調べることにした。

(3) プラズマローゲンの合成酵素の一部は、DHAPATとAGPSとFar1であることが解明している。これら酵素に対するヒト用抗体が市販されている。またこれら酵素のアミノ酸配列は、ウシとヒトの間で相同性が非常に高い。そこで若繁殖雌、加齢後繁殖雌、ならびに加齢後泌乳牛の視床下部での発現量をリアルタイムPCRやウエスタンブロットで調べ、群間で比較した。

## 4. 研究成果

(1) 若繁殖雌の脳から抽出したEPIと異なり、加齢後繁殖雌、ならびに加齢後泌乳牛の脳から抽出したEPIには、培養下の若牛ゴナドトロフ細胞からのゴナドトロフ分泌刺激作用が無いことが確認された。したがって仮説が支持された。

(2) 2次元 LC-MS 法でウシの全脳や視床下部から抽出した EPI を分析したところ、図 1 のような、2次元目クロマトグラムが得られた。また MS/MS 分析することで 20 分子種が同定された。さらに群間を統計解析した結果、3 分子種が老肉牛や老乳牛の視床下部で有意 ( $P < 0.05$ ) に減少していることも発見した。これら 3 分子種は、創薬シーズとしても有望であるため、今後さらに研究する。

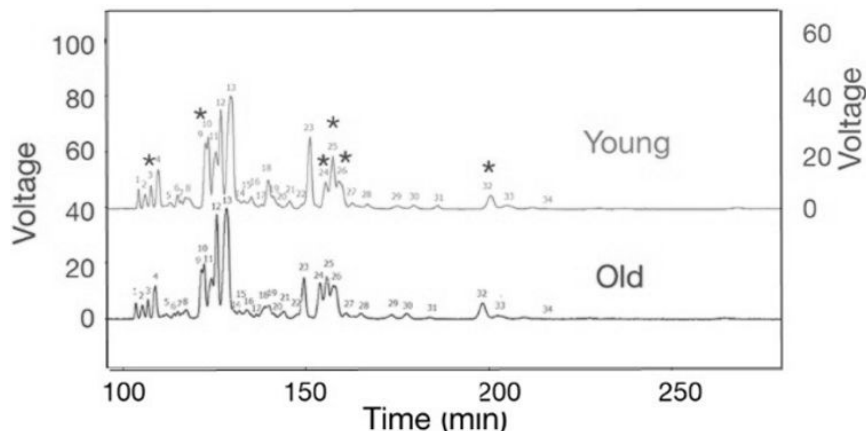


図 1 ウシ視床下部から抽出した EPI を分析した 2次元 LC-MS 法のクロマトグラム。加齢により有意に減少する分子種と有意に増加する分子種が発見された (アスタリスクで表示)

(3) プラズマローゲンの合成酵素である、DHAPAT、AGPS、Far1 の発現量をリアルタイム PCR 法で比較したところ、GnRH ニューロンの細胞体の存在部位として知られる視索前野 (POA) において Far1 発現量の異常増加が認められた。一方、GnRH ニューロンの繊維や末端が存在している弓状核・正中隆起 (ARC & ME) では、3 酵素のいずれにも発現量に有意差は認められなかった。ウエスタンブロットで調べた結果も同様であった。これらのことから、加齢等で EPI の質が悪化するメカニズムの一端が解明された。

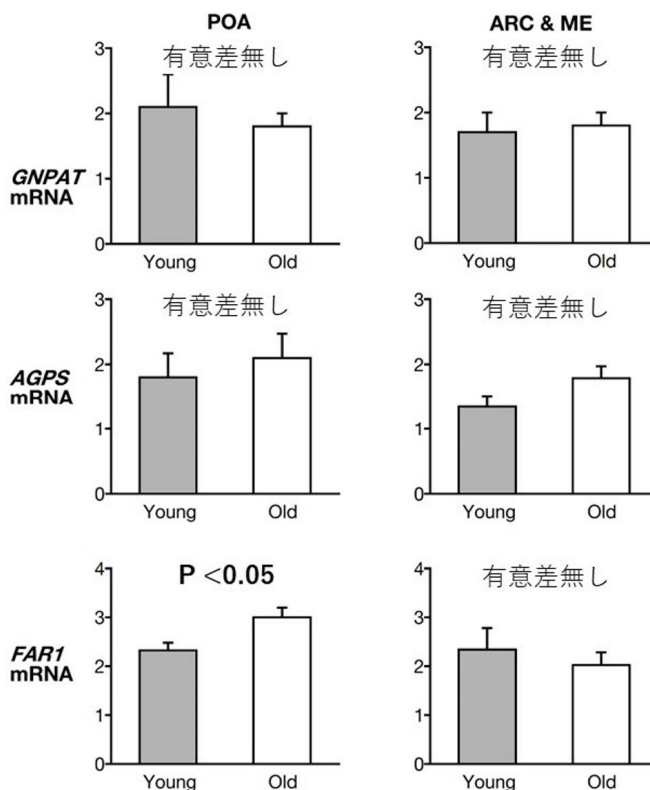


図 2 ウシ視床下部の重要部位、視索前野 (POA) ならびに、弓状核・正中隆起 (ARC & ME) における、EPI 合成酵素である、DHAPAT、AGPS、Far1 の発現量の比較。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroya Kadokawa	4. 巻 66
2. 論文標題 Discovery of new receptors regulating LH and FSH secretion by bovine gonadotrophs to explore a new paradigm for mechanisms regulating reproduction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 291-297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-012	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Onalenna Kereilwe, Kiran Pandey, Hiroya Kadokawa	4. 巻 64
2. 論文標題 Influence of brain plasmalogen on gonadotropin secretion from the cultured bovine anterior pituitary cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Domestic Animal Endocrinology	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.domaniend.2018.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Hiroya Kadokawa, Miyako Kotaniguchi, Onalenna Kereilwe, Shinichi Kitamura.	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduced gonadotroph stimulation by ethanolamine plasmalogens in old bovine brains.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84306-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kadokawa H, Kereilwe O, Pandey K, Rudolf FO, Borromeo V
2. 発表標題 Discoveries of new receptors on bovine gonadotrophs: possible new mechanisms to control reproductive functions.
3. 学会等名 the19th International Congress on Animal Reproduction（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角川博哉
2. 発表標題 学術賞受賞者講演：ウシゴナドトロフからのLH・FSH分泌を調節する新規受容体の発見ならびにそれらの家畜繁殖上の重要性の解明。
3. 学会等名 日本繁殖生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角川博哉
2. 発表標題 招待講演：ウシ下垂体前葉で発見された新規受容体。
3. 学会等名 日本下垂体研究会第34回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 卵胞刺激ホルモン分泌促進剤	発明者 角川博哉	権利者 国立大学法人山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、6725942	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	北村 進一  (Kitamura Shinichi)  (60117869)	大阪府立大学・研究推進機構・特認教授   (24403)	2次元LC-MS法による分析

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
---------	---------