

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23880012
 研究課題名（和文）ヤギ視床下部由来神経細胞株を用いた家畜の繁殖機能制御メカニズムの解明
 研究課題名（英文）Establishment of neuronal cell lines derived from goat hypothalamus and analysis of reproductive mechanisms in domestic animals
 研究代表者
 松田 二子（MATSUDA FUKO）
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
 研究者番号：10608855

研究成果の概要（和文）：反芻家畜の繁殖を制御する神経内分泌メカニズムを細胞レベルで解析する目的で、シバヤギ視床下部初代培養細胞を不死化し、神経細胞に由来する細胞株を樹立した。得られた神経細胞株の中から、哺乳類の繁殖機能に重要な神経ペプチドであるキスペプチン遺伝子およびニューロキニン遺伝子を発現する細胞株を複数特定することに成功した。さらにヤギニューロキニン遺伝子の転写調節機構を解析し、5' 上流域の転写活性化領域と転写抑制領域を同定した。

研究成果の概要（英文）：To analyze the neuroendocrine system that regulate reproduction in domestic ruminants by in vitro methods, we tried to establish new cell lines derived from goat hypothalamic neurons. We immortalized goat hypothalamic primary cultured cells and obtained cell clones derived from neurons. Among the hypothalamic neuronal cell clones, we determined multiple cell lines that express kisspeptin gene and neurokinin gene. We further examined the transcriptional regulation mechanism of goat neurokinin gene and determined both transcriptional activation and repression domain of goat neurokinin gene 5' -upstream region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：畜産学、応用動物、神経科学、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

ウシの受胎率低下は国内外の畜産における最も大きな問題となっている。哺乳動物の繁殖周期は視床下部からの指令によって制御されており、最も上位でその調節を行うのはキスペプチンニューロンであることが近年明らかになってきた。キスペプチンニューロンが分泌する神経ペプチド（キスペプチン、

ニューロキニン、ダイノルフィン等）は相互に発現を調節しあうことによって繁殖機能を制御していることが示唆され、家畜の繁殖障害の予防や治療への応用が期待されている。しかし、家畜の視床下部由来の神経細胞株は存在せず、細胞レベルでのキスペプチンニューロンの解析は十分に行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では反芻家畜の良好なモデル動物であるシバヤギを用いて、キスペプチンニューロンに由来する神経細胞株を作製し、作製した細胞株を用いてキスペプチンおよびその関連神経ペプチドの発現制御機構を解明することを目指した。本研究で得られる細胞株を利用することで、反芻家畜の繁殖機能を統御するメカニズムを細胞レベルで解明し、ウシの受胎率向上に寄与する新規治療法を開発することが可能になると考えられた。

3. 研究の方法

(1) ヤギ視床下部細胞の初代培養と不死化

3週齢シバヤギまたは胎仔シバヤギより脳を取り出し、視床下部から細胞を分離し、初代培養を行った。これらの細胞に、神経細胞を含む種々の細胞の不死化に使用されているシミアンウイルス 40 (SV40) large T 抗原の遺伝子を導入し、増殖能をもたせた。SV40 large T 抗原は、レンチウイルスベクターを用いて視床下部細胞のゲノムに組み込んだ。

(2) 不死化細胞のクローニングと、各細胞株の評価、ニューロン細胞株の取得

不死化後、良好に増殖するようになった細胞群のクローニングを行った。細胞が一個ずつになるよう分離し、それぞれを細胞株とした。視床下部には種々の細胞が含まれるため（成熟神経細胞、神経前駆細胞、未熟神経細胞、グリア細胞や血管内皮細胞など神経細胞以外の細胞）、様々な由来の細胞株が得られると予測された。RT-PCRにて遺伝子マーカー（神経細胞マーカーのNSE、グリア細胞マーカーのGFAP等）のmRNA発現を解析し、各細胞株の由来を調べた。次に、神経細胞由来であることが特定された細胞株について、キスペプチン遺伝子 (*KISS1*)、ニューロキニン遺伝子 (*TAC3*) のmRNA発現をRT-PCRにて解析し、キスペプチンニューロンの細胞株を特定した。

(3) ヤギ *KISS1* および *TAC3* の 5' 上流域配列の決定と、ヤギ *TAC3* 転写調節機構の解明
転写調節機構を解析する目的で、ヤギ *KISS1* および *TAC3* の 5' 上流域配列を決定した。配列決定は、シバヤギ血液から抽出したDNAを用いて、ゲノムウォーキング法により行った。次にヤギ *TAC3* 転写調節機構を解析した。シバヤギ視床下部より抽出した全RNAを用いて5' RACE法を行い、推定転写開始点を決定した。次に、得られた *TAC3* 5' 上流域配列の転写活性を評価するため、ルシフェラーゼアッセイを行った。 *TAC3* 5' 上流域を徐々に削つ

た配列をルシフェラーゼレポーターベクターに組み込み、これらのベクターをマウス視床下部神経由来不死化細胞株 (N7) またはヒト神経芽腫由来細胞株 (SK-N-AS) にトランスフェクションし、細胞溶解液中のルシフェラーゼ量を測定して、各上流域の転写活性を評価した。さらに、ヤギ *TAC3* 転写調節に対するエストロゲンの影響を調べるため、1 nM あるいは 10 nM のエストロゲンを添加して同様にルシフェラーゼアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) ヤギ視床下部細胞の初代培養と不死化
3週齢および胎齢 120 日のシバヤギ視床下部初代培養細胞の不死化により、良好に増殖を続ける細胞群を得ることに成功した。

(2) 不死化細胞のクローニングと、各細胞株の評価、ニューロン細胞株の取得
クローニングにより、子ヤギ視床下部由来細胞クローンを 49 個、胎仔由来細胞クローンを 100 個以上得た。子ヤギ由来の細胞クローン 49 個の遺伝子発現解析を行い、35 個の神経由来細胞クローン (NSE 陽性かつ GFAP 陰性) を同定した。各神経細胞クローンは異なる形態をしており、様々な種類のニューロンに由来することが示唆された (図 1)。さらに *KISS1* および *TAC3* の発現を解析し、両方を発現する細胞クローンを 4 個特定した。これらの細胞クローンをキスペプチンニューロン由来細胞株の候補とした。以上の成果について、国内および国際学会にて発表を行った (学会発表⑦⑩⑬)。胎仔由来細胞クローンについても遺伝子発現解析を実施中である。

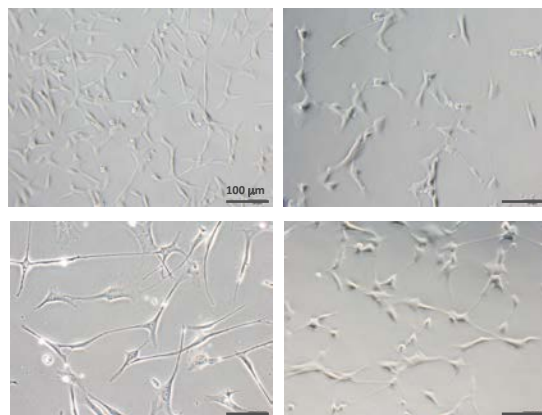


図 1. 3週齢シバヤギ視床下部由来神経細胞クローンの形態. 4つの異なる細胞クローンの写真を示した.

(3) ヤギ *KISS1* および *TAC3* の 5' 上流域配列の決定と、ヤギ *TAC3* 転写調節機構の解明
ゲノムウォーキング法により、ヤギ *KISS1* お

よび *TAC3* の 5' 上流域約 3kb 分の配列を決定した。次に RACE 法によりヤギ *TAC3* の全長 RNA 配列を同定し、推定転写開始点を決定した。ヤギ *TAC3* の全長 RNA および上流域配列はウシ *TAC3* と高い相同性を示し、ニューロキニンの推定アミノ酸配列は完全に一致した。得られた上流域の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより評価した結果、転写開始点 (+1) から -2706~-336-base が転写抑制領域であること、-197~+166-base が転写活性化領域であることが明らかとなった (図 2)。エストロゲン (1 nM, 10 nM) の添加により、ヤギ *TAC3* の転写活性が抑制される傾向が見られたものの、その影響に有意差は認められなかった。以上の成果について、国内および国際学会にて発表を行い、また国際学術誌へ投稿し掲載が決定した (学会発表⑥⑧⑩、雑誌論文①)。今後、(2) で得られたシバヤギキスペプチンニューロン由来細胞株を用いて同様のルシフェラーゼアッセイを行い、ヤギ *TAC3* の転写制御機構を解明する予定である。

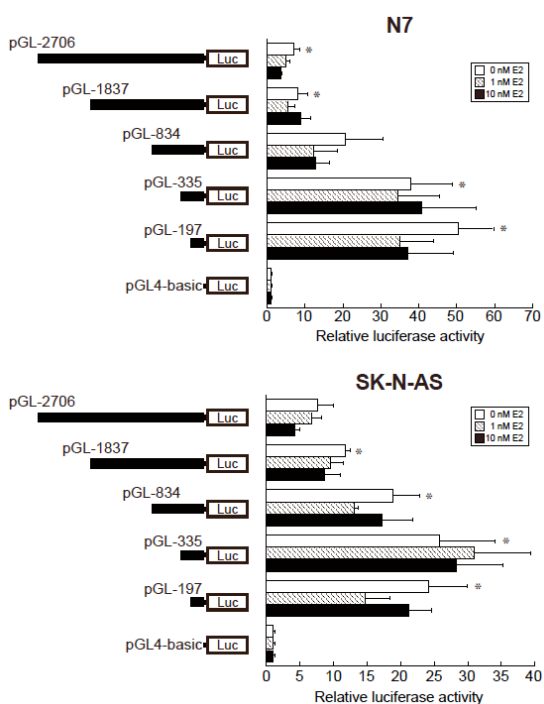


図 2. ヤギ *TAC3* 5' 上流域のルシフェラーゼ活性。5つの異なる長さのヤギ *TAC3* 5' 上流域を含むルシフェラーゼレポーターベクターをそれぞれ N7 または SK-N-AS 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。0 nM E2: エストロゲン非添加群、1 nM E2: 1 nM エストロゲン添加群、10 nM E2: 10 nM エストロゲン添加群。0 nM E2 の pGL4-basic (empty vector) の値を 1 として活性を示した。*: $P < 0.05$ vs pGL4-basic.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Suetomi Y, Matsuda F, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H, Ohkura S. Molecular cloning and identification of transcriptional regulatory domain of the goat neurokinin B gene *TAC3*. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、2013 (in press)

② Sai T, Matsuda F, Goto Y, Maeda A, Sugimoto M, Gao H, Kabir AKMA, Li JY, Manabe N. Effect of RNA interference of BID and BAX mRNAs on apoptosis in granulosa cell-derived KGN cells. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、58 巻、2012、112-116.

③ Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、58 巻、2012、44-50.

④ 前多敬一郎、大蔵聡、松田二子、難波陽介、若林嘉弘、岡村裕昭、井上直子、上野山賀久、東村博子. 繁殖障害の根本治療に向けての新たな方法論: KNDy ニューロンの応用. *家畜診療*, 査読無、59 巻、2012、387-393.

⑤ 松田二子、眞鍋昇. 抗アポトーシス因子・cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) による哺乳類の卵胞選抜制御機構. *比較内分泌学*, 査読無、38 巻、2012、27-32.

⑥ Sai T, Goto Y, Yoshioka R, Maeda A, Matsuda F, Sugimoto M, Wongpanit K, Jin HZ, Li JY, Manabe N. Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、57 巻、2011、421-427.

⑦ Inoue N, Matsuda F, Goto Y, Manabe N. Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、57 巻、2011、169-175.

[学会発表] (計 18 件)

① 末富祐太、中務桂佑、難波陽介、若林嘉浩、岡村裕昭、前多敬一郎、上野山賀久、東村博子、松田二子、大蔵聡. 去勢雄シバヤギ視索前野のキスペプチンニューロンは高濃度エストロゲンにより誘起されるサージ LH 分泌を仲介する 日本畜産学会第 116 回大会、2013 年 3 月、広島

② 難波陽介、中務桂佑、説田章平、大石真也、藤井信孝、上野山賀久、東村博子、前多敬一郎、松田二子、大蔵聡. キस्पепチンおよび GnRH 末梢投与がウシの卵巣活動におよぼす効果の比較. 第 17 回日本生殖内分泌学会学術集会、2012 年 12 月、東京

③ Misu R, Oishi S, Noguchi T, Yamada A, Ohno H, Yamamura T, Okamura H, Matsuda F, Ohkura S, Fujii N. Structure-activity relationship study of tachykinin peptides for development of novel neurokinin-3 receptor agonists. The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain、2012 年 11 月、東京

④ Nakatsukasa K, Suetomi Y, Naniwa Y, Ito D, Inoue N, Wakabayashi Y, Okamura H, Maeda K-I, Uenoyama Y, Tsukamura H, Matsuda F, Ohkura S. Kisspeptin neurons in the medial preoptic area of castrated male goats mediate the surge-like luteinizing hormone secretion induced by acute elevations in circulating estrogen. The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain、2012 年 11 月、東京

⑤ Naniwa Y, Nakatsukasa K, Setsuda S, Oishi S, Fujii N, Wakabayashi Y, Okamura H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Matsuda F, Ohkura S. Comparison of the efficacy of intravenous treatment of kisspeptin and GnRH on ovarian activity in Japanese Black beef cows. The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain、2012 年 11 月、東京

⑥ Suetomi Y, Matsuda F, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Ohkura S. Cloning of goat TAC3 upstream region and evaluation of its promoter activity. The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain、2012 年 11 月、東京

⑦ Matsuda F, Suetomi Y, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H, Ohkura S. Generation of immortalized neuronal cell lines derived from goat hypothalamic arcuate nucleus and medial preoptic area. The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain、2012 年 11 月、東京

⑧ Matsuda F, Suetomi Y, Maeda K-I, Tsukamura H, Ohkura S. Analysis of the transcriptional regulatory mechanism of neurokinin B gene, TAC3, in the goat. Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting、2012 年 10 月、ニューオリンズ、アメリカ合衆国

⑨ 山田 愛、三須良介、大石真也、大野浩章、松田二子、大蔵聡、藤井信孝. NK3 受容

体リガンドの安定性評価と新規選択的アゴニストの創製. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年 10 月、西宮

⑩ 松田二子、末富祐太、上野山賀久、前多敬一郎、東村博子、大蔵聡. ヤギ視床下部視索前野および弓状核に由来する不死化神経細胞株の作出. 日本下垂体研究会第 27 回学術集会、2012 年 8 月、天童

⑪ 末富祐太、松田二子、上野山賀久、東村博子、前多敬一郎、大蔵聡. シバヤギにおける TAC3 遺伝子上流域の同定とそのプロモーター活性の評価. 第 105 回日本繁殖生物学会大会、2012 年 9 月、つくば

⑫ 難波陽介、中務桂佑、末富祐太、松田二子、松井久典、日下雅美、大瀧徹也、田中知己、岡村裕昭、大蔵聡. キस्पепチン類縁体 TAK-683 の末梢投与はウシの卵胞発育および黄体形成ホルモン分泌を刺激する. 第 105 回日本繁殖生物学会大会、2012 年 9 月、つくば

⑬ 松田二子、末富祐太、上野山賀久、前多敬一郎、東村博子、大蔵聡. シバヤギ視床下部初代培養細胞の不死化と神経由来細胞クローンの同定. 第 105 回日本繁殖生物学会大会、2012 年 9 月、つくば

⑭ 難波陽介、大石真也、藤井信孝、上野山賀久、東村博子、前多敬一郎、松田二子、大蔵聡. キस्पепチンによる卵胞発育刺激作用. 第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月、名古屋

⑮ 眞鍋昇、才貴史、松田二子、小野山一郎、東福望、後藤康文、AKMA KABIR、高紅梅、李俊佑ブタ顆粒層細胞の Bid と Bax 発現を阻害するとアポトーシス率が低下する. 第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月、大宮

⑯ Matsuda F, Inoue N, Ohkura S, Manabe N. Role of Apoptosis Initiator FOXO3 in Granulosa Cells During Follicular Atresia in Pig Ovaries. 2nd World Congress on Reproductive Biology、2011 年 10 月、ケアンズ、オーストラリア

⑰ Naniwa Y, Nakatsukasa K, Setsuda S, Oishi S, Fujii N, Wakabayashi Y, Okamura H, Matsuda F, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Ohkura S. Kisspeptin stimulates luteinizing hormone secretion and follicular development in Japanese Black beef cows. 2nd World Congress on Reproductive Biology、2011 年 10 月、ケアンズ、オーストラリア

⑱ 難波陽介、中務桂佑、説田章平、大石真也、藤井信孝、若林嘉浩、岡村裕昭、松田二子、上野山賀久、東村博子、前多敬一郎、大蔵聡. 黒毛和種成熟雌ウシにおいてキस्पепチン末梢投与は黄体形成ホルモン分泌および卵胞発育を刺激する. 第 104 回日本繁殖生物学会大会、2011 年 9 月、盛岡

〔図書〕（計1件）

① 眞鍋昇、松田二子. 京都大学出版会、卵子学「顆粒膜（層）細胞アポトーシスの分子機構」、2011、424-432.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~laps/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 二子 (MATSUDA FUKO)

名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：10608855

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし