

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780275

研究課題名(和文) GnRHのパルス状分泌におけるニューロキニンBおよびダイノルフィンAの役割の解明

研究課題名(英文) The role of neurokinin B and dynorphin A in GnRH pulse generation

研究代表者

山村 崇 (Yamamura, Takashi)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・任期付研究員

研究者番号：60582723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)のパルス状分泌の制御に関与していることが示唆されている弓状核キスペプチンニューロンに共局在するニューロキニンB(NKB)およびダイノルフィンA(Dyn)の弓状核における分泌動態を調べるために、本研究ではシバヤギを実験動物として、マイクロダイアリシス法を用いた濃度変動解析手法を確立し、GnRHパルス状分泌との関連性は明確ではないものの、弓状核においてNKBが濃度変動を伴い分泌されていることを確認した。これらのことから、NKBが弓状核キスペプチンニューロンより細胞外に分泌され、GnRHのパルス状分泌の制御に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that neurokinin B (NKB) and dynorphin A (Dyn), which are coexpressed in kisspeptin neurons in the arcuate nucleus (ARC), are involved in gonadotrophin releasing hormone (GnRH) pulse generation. To clarify secretion patterns of NKB and Dyn in ARC, we developed in vivo microdialysis method and measured NKB and Dyn in ARC using goats. We enabled measurement of NKB concentration in ARC and observed fluctuations of NKB levels. Although the concentration fluctuations of NKB were not correlated well with pulsatile GnRH/luteinizing hormone release, these results suggested NKB could be secreted by kisspeptin neurons in ARC and involved in GnRH pulse generation.

研究分野：農学

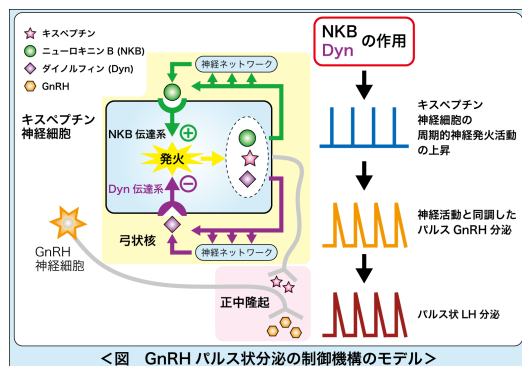
科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：パルス状分泌 ニューロキニン キスペプチン GnRH マイクロダイアリシス ヤギ

1. 研究開始当初の背景

日長、暑熱、栄養状態や飼養状態など繁殖機能に影響をおよぼす様々な環境要因の情報は、脳の視床下部で統合され、最終的には GnRH 分泌のパルス頻度という信号により性腺（卵巣・精巣）の活動が制御される。しかし、このパルス状分泌がどのように制御されているのかは長い間不明であった。近年、キスペプチンが発見され、GnRH 分泌の重要な制御因子であることが示されつつある。

本研究室では、ヤギを用いた実験から、キスペプチン神経細胞が局在する脳の視床下部弓状核では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 のパルス状分泌を制御している可能性を示している (Ohkura et al., 2009)。また、形態学的解析から弓状核キスペプチン神経細胞には、ニューロキニン B (NKB) とダイノルフィン A (Dyn) が共局在していることが示された。さらに、キスペプチン神経細胞群の神経活動におよぼす NKB と Dyn の影響を解析したところ、神経活動の上昇に対し NKB は促進的に、Dyn は抑制的に作用することが明らかになった (Wakabayashi et al., 2010)。また、キスペプチン神経細胞は神経細胞同士の情報連絡を可能とする形態を持っていること、キスペプチン神経細胞は NKB、Dyn それぞれの受容体を持っていることが示された (誌上未掲載データ)。これらの知見に基づき、弓状核キスペプチン神経細胞同士は全体としてネットワークを構築し、その中でキスペプチン神経細胞内に共存する NKB と Dyn により GnRH のパルス状分泌を誘起する神経活動の上昇が生み出されているというモデルを提唱している (右図、Maeda et al., 2010)。このモデルでは、NKB と Dyn は細胞外に分泌され、周囲の細胞に作用してその神経活動を調節しているというメカニズムが重要なポイントとなっているが、まだ推測の域を出ず、その詳細な機構については不明である。



2. 研究の目的

本研究は、シバヤギを実験動物として用い、GnRH パルス状分泌の制御の鍵因子であると考えられる NKB と Dyn の分泌動態を解析し、動物の繁殖制御に重要な役割を果たす GnRH

のパルス状分泌のメカニズムの解明を目指す。

計画している具体的な研究項目は、

- (1) 覚醒した状態のヤギから弓状核の細胞外液に含まれる NKB と Dyn を採取し、NKB と Dyn の分泌動態を解析する方法を確立する。
- (2) NKB と Dyn の分泌動態を解析し、GnRH のパルス状分泌との関連を明らかにする。の二つである。

3. 研究の方法

- (1) 弓状核の細胞外液に含まれる NKB と Dyn を採取するためのシバヤギを用いたマイクロダイアリシス法の確立

マイクロダイアリシスに用いるプローブは、A-1 型プローブ (エイコム、分子量カットオフ値: 50kDa、透析膜長: 4 mm) を用いる。このプローブを介した際の NKB と Dyn の回収率の確認を行うために、*in vitro* で複数の濃度の NKB および Dyn 溶液中からマイクロダイアリシス法により溶液の回収を行い、原液との濃度比較を行い、回収率の計算を行う。

シバヤギの弓状核からの細胞外液に含まれるペプチドの回収について、本研究室ではシバヤギの弓状核へのアクセス方法が確立されている (Ohkura et al., 2009, Wakabayashi et al., 2010) ため、その方法を本研究でも用いる。具体的には、卵巣除去済みのヤギをハロセン吸入麻酔下で、脳固定装置に保定して脳室造影を行い、第三脳室の形状をもとに弓状核キスペプチン神経細胞の局在部位の座標を決定する。次にマニピュレーターを用いてガイドカニューレを決定した座標に誘導し、デンタルセメントによりカニューレを頭蓋骨に固定する。約 1 ヶ月の回復期間後、覚醒した状態のヤギの頭部を保定し、マイクロダイアリシスプローブをガイドカニューレに挿入し、マイクロシリンジポンプを用いて、pH 6.0 のリンゲル液を流速 2 $\mu\text{l}/\text{分}$ で還流し、透析液の回収を確認する。

- (2) NKB と Dyn の分泌動態の解析

確立した手法を用いて回収した、弓状核の細胞外液に含まれる NKB および Dyn 濃度の測定を行う。NKB 濃度は EIA Neurokinin B kit (Peninsula Labo. Inc., S-1219) を、Dyn 濃度は Dynorphin A - EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., EK-012-03) を用いた免疫酵素測定 (EIA) 法により測定する。

また、透析液の回収時間に合わせ、10 分毎に頸静脈より採血を行い、得られた血液より血中 LH 濃度を放射免疫測定 (RIA) 法により測定する。

得られた結果を比較し、NKB および Dyn 濃度と GnRH/LH パルス状分泌との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 弓状核の細胞外液に含まれる NKB と Dyn を採取するためのシバヤギを用いたマ

マイクロダイアリシス法の確立

マイクロダイアリシスプローブおよびライン(チューブ)を通した際の NKB および Dyn の回収率や吸着性を調べるために、NKB と Dyn を含む低濃度、高濃度および vehicle 溶液から経時的なサンプリングを行った。採取したサンプルは、NKB 濃度は EIA Neurokinin B kit (Peninsula Labo. Inc., S-1219) を、Dyn 濃度は Dynorphin A - EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., EK-012-03) を用いた免疫酵素測定 (EIA) 法により測定した。

NKB は用いた溶液に依存した明確な濃度変動を示した。また当初用いていた A-I 型プローブでは回収率が 0.8%であったが、その後新たに市販された高分子のペプチドやサイトカインの回収に特化した AtmosLM プローブを用いると回収率は約 10~17%と飛躍的に改善した。

Dyn は高濃度の溶液を通した後に低濃度の溶液を通して溶液に依存した明確な濃度変動が見られず、Dyn がラインに吸着しやすい性質であることが考えられた。また、回収率も AtmosLM プローブを用いても約 3~5%程度であった。

これらのことから、Dyn の濃度変動解析が困難であることが考えられたため、NKB に焦点を絞る解析を行うこととした。

マイクロダイアリシスプローブを弓状核へ挿入するためのガイドカニューレの留置術をヤギに施した。手術後の経過は順調で、1 ヶ月の回復期間後もヤギに異常は見られなかった。その後、覚醒した状態のヤギの頭部を保定し、マイクロダイアリシスプローブをガイドカニューレに挿入し、マイクロシリンジポンプを用いて、pH 6.0 のリンゲル液を流速 2 μ l/分で 5 時間にわたり還流したところ、溶液の回収状況、ヤギの健康状態ともに問題ないことを確認した。

これらのことを合わせて、ヤギの弓状核の細胞外液に含まれる NKB と Dyn を採取するためのマイクロダイアリシスを用いた方法を確立できた。

(2) NKB の分泌動態の解析

去勢したヤギを用いて、マイクロダイアリシスプローブを弓状核に留置されたガイドカニューレに挿入し、マイクロシリンジポンプを用いて、pH 6.0 のリンゲル液を流速 2 μ l/分で 2~3 時間にわたり 10 分毎にプールしたものを採取し、EIA 法により NKB の濃度測定を行った。その結果、NKB が濃度変動を伴い分泌されていることを明らかにした。しかしながら、期待された GnRH/LH のパルス状を誘導するような明瞭な NKB のパルス状の変動ではなかった。

去勢ヤギでは自然条件下とは異なる短い間隔(約 30 分)で LH がパルス状に分泌しており、時間分解能が低いマイクロダイアリシス法では NKB の分泌動態を正確に捉えられていない可能性が考えられた。そこで、エストロジェンを代償投与し LH のパルス状分泌間

隔を延ばした(約 1 時間)個体を用いて、サンプリング時間を 5 時間に延ばし同様の解析を行った。その結果、濃度変動を伴う NKB 分泌が確認されたものの、エストロジェンの有無によりその分泌パターンに明確な変化は確認されなかった。血中 LH 分泌に関しては、去勢ヤギでは約 30 分おきの、エストロジェン代償投与ヤギでは約 60 分おきのパルス状分泌が観察されたが、NKB の濃度変動パターンとの強い関連は見られなかった。

これらのことから、弓状核において NKB が濃度変動を伴い分泌されていることは明らかになった。これは我々が提唱しているモデルの一端を証明するものであり、NKB が弓状核キスペプチンニューロンより分泌され、GnRH のパルス状分泌の制御に関与している可能性を示すものである。NKB がパルス状に分泌されることにより GnRH/LH のパルス状分泌が誘導されているかどうかについては今後のさらなる解析が必要である。

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 3 件)

Wakabayashi Yoshihiro, 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, 査読有, Vol.59(1), pp.40-48, 2013

DOI:10.1262/jrd.2012-136

Hiroaki Okamura, Takashi Yamamura, Yoshihiro Wakabayashi, Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals, Animal Science Journal, 査読有, vol.84 (5), pp.369-381, 2013

DOI:10.1111/asj.12056

Kohei Sakamoto, Yoshihiro Wakabayashi, Takashi Yamamura, Tomomi Tanaka, Yukari Takeuchi, Yuji Mori, Hiroaki Okamura, A population of kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus may be the central target of the male effect pheromone in goats, PLoS ONE, 査読有, 8(11), e81017, 2013

DOI:10.1371/journal.pone.0081017

[学会発表](計 5 件)

若林嘉浩, 山村崇, 大蔵聡, 本間玲実,

坂本光平, 森裕司, 岡村裕昭, NKB は弓状核キスペプチン/NKB ニューロンに作用して GnRH パルスを産生させる, 第105 回繁殖生物学会大会, 2012
Yoshihiro Wakabayashi, Takashi Yamamura, Satoshi Ohkura, Tamami Homma, Kohei Sakamoto, Yuji Mori, Hiroaki Okamura, Senktide, a neurokinin receptor agonist, stimulates pulsatile LH secretion through a mechanism mediated by the GnRH pulse generator in goats, 42nd Society for Neuroscience Annual Meeting, 2012
Ryosuke Misu, Shinya Oishi, Taro Noguchi, Ai Yamada, Hiroaki Ohno, Takashi Yamamura, Hiroaki Okamura, Fuko Matsuda, Satoshi Ohkura, Nobutaka Fujii, Structure-activity relationship study of tachykinin peptides for development of novel neurokinin-3 receptor agonists, 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, 2012
Takashi Yamamura, Yoshihiro Wakabayashi, Taro Noguchi, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Satoshi Ohkura, Hiroaki Okamura, Continuous administration of senktide, a neurokinin receptor agonist, facilitates intermittent activities of the GnRH pulse generator for 24h in goats, 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, 2012
伊藤太祐, 中務桂佑, 若林嘉浩, 山村崇, 岡村裕昭, 大石真也, 野口太郎, 藤井信孝, 上野山賀久, 束村博子, 前多敬一郎, 松田二子, 大蔵聡, 新規オピオイド受容体拮抗剤の末梢投与がシバヤギ GnRH パルスジェネレーター活動におよぼす効果, 第 106 回繁殖生物学会大会, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村崇 (YAMAMURA, Takashi)
農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・任期付研究員
研究者番号：60582723