

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26252046

研究課題名(和文) 家畜の卵胞発育・排卵制御に資するエストロゲンフィードバックの分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism mediating estrogen feedback to regulate follicular development and ovulation in domestic animals

研究代表者

束村 博子 (Tsukamura, Hiroko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：00212051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、哺乳類において、卵胞発育と排卵を制御するエストロゲン(E2)の正と負のフィードバック機構の解明を目的とした。本研究では、遺伝子改変ラットやマウス、ブタ、反芻動物モデルのヤギ、サルを用い、視床下部弓状核および前腹側室周囲核/視索前野に局在するキスペプチン(Kiss)神経が、それぞれE2の負および正のフィードバック中枢であることを示し、家畜やヒトの生殖障害の課題解決に資する基礎的知見を得た。また、各神経核のKiss神経に共発現する転写因子Aを発見した。さらに、E2のフィードバック効果の分子機構の検討に資するラットの両神経核由来のKiss神経不死化細胞株を樹立した。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate the mechanism mediating estrogen negative and positive feedback regulating follicular development and ovulation, respectively, in mammals. The study focused on the effects of estrogen on Kiss1 (kisspeptin gene) expression in kisspeptin neurons, and demonstrates that the arcuate (ARC) and anteroventral paraventricular nucleus (AVPV)/ preoptic kisspeptin neurons are targets of estrogen to exert the estrogen negative and positive feedback effects, respectively, in rats, mouse, monkeys, and goats. The study also revealed that specific transcriptional factors are expressed in the both kisspeptin neuronal populations. Further, the present study tried to generate immortalized rat AVPV and ARC kisspeptin neuronal cell lines to investigate molecular mechanism mediating the estrogen effects. As a result, we obtained some kisspeptin neuronal cell line candidates from the AVPV and ARC.

研究分野：動物

キーワード：キスペプチン GPR54 GnRH メタスチン エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のメスにおいて、卵胞発育と排卵は、エストロゲンのフィードバック機構により制御される。発育中の卵胞から分泌されるエストロゲンは、視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌に対して抑制的に作用し (負のフィードバック)、下垂体からの性腺刺激ホルモンのパルス状分泌を抑制することにより卵胞発育のファンクションニングする働きをもつ。ところが、卵胞成熟にともない血中エストロゲンが増加すると、エストロゲンは、GnRH/黄体形成ホルモン (LH) の大量放出 (サージ) を促し (正のフィードバック) 排卵を誘起する。エストロゲンによる両方向 (正と負) のフィードバックがどのような機構により制御されるかについては不明であり、世界の多くの研究グループが長年研究を進めて来たが、未だ全容の解明に至っていない。また、家畜の繁殖障害には、このフィードバック機構の異常が原因と見られる例が少なくない。これらフィードバック機構の解明により、家畜の繁殖障害の治療等に資する成果が得られると考えられ、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類の生殖中枢と考えられるキスペプチンニューロンにおけるキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) の脳内発現と分泌に対するエストロゲンの制御機構を、組織特異的な転写因子・enhancer/suppressor の同定・エピジェネティック制御機構・組織特異的な受容体による分泌制御機構の解明により、正と負のフィードバック機構の全容を解明すると共に、ブタ・ヤギ (反芻モデル) を用いた研究により、家畜の排卵・卵胞発育異常などの繁殖障害の治療法の開発に資することを目的とする。

3. 研究の方法

排卵を制御するエストロゲンの正のフィードバック、および卵胞発育を制御する負のフィードバック機構の解明を目指し、家畜のモデルとしてラット・マウス、ブタ、反芻家畜モデルとしてヤギ、およびヒトのモデルとしてニホンザルを用い、研究を遂行した。本研究課題では、主にエストロゲンの負のフィードバック中枢として視床下部弓状核 (ARC) に局在するキスペプチンニューロン、および正のフィードバック中枢として前腹側室周囲核 (AVPV) に局在する同ニューロンに着目した。

遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* レポーターアッセイによる ARC および AVPV に局在するキスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 遺伝子エンハンサーの同定、ヤギおよびニホンザルにおける、エストロゲンの正のフィードバックの作用部位の同定、*Kiss1* ノックアウト (KO) ラットの作製による、キスペプチンニューロンが、正と負

のフィードバック中枢であることの証明、ブタにおける *Kiss1* 発現制御の解明、ラット AVPV および ARC のキスペプチンニューロン由来の不死化細胞株の確立、これらふたつの神経核の同ニューロンに特異的に発現する転写因子、enhancer/suppressor、エピジェネティック制御機構に関わるヒストン修飾蛋白の検索と絞り込み、さらに一部のヒストン修飾蛋白のキスペプチンニューロンにおける役割を明らかにするための実験等を実施した。

4. 研究成果

本研究課題の遂行により、視床下部のふたつの領域に局在するキスペプチンニューロンが、ラットやマウスなど実験動物だけでなく、ブタや反芻家畜、霊長類においても、エストロゲンの正および負のフィードバックを担う中枢であることが明らかとなり、家畜やヒトの生殖障害の課題解決に資する成果が得られた。本研究の成果の概要は以下の通りである。

1) マウスを用い、負のフィードバックの作用部位である ARC キスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 発現を担うエンハンサー部位が、正のフィードバック作用部位である AVPV における同ニューロンのエンハンサーとは異なり、*Kiss1* プロモータ領域の上流に存在することを明らかにし、両神経核のキスペプチンニューロンにおけるエストロゲンの作用機序が異なることを示唆した。

2) サルおよびヤギにおけるエストロゲンの正のフィードバック中枢が、ラット・マウスの AVPV と相同核である視索前野に局在するキスペプチンニューロンであることを明らかにした。

3) *Kiss1* 遺伝子 KO ラットの作製に成功し、同 KO ラットが性成熟を示さず、またパルス状およびサージ状のゴナドトロピン分泌を欠如することを示し、キスペプチンニューロンが哺乳類の生殖中枢であることを証明するとともに、同 KO ラットでは、エストロゲンの正のフィードバックが消失することを明らかにした。

4) 新生児期のラットへのエストロゲンの慢性曝露が、AVPV および ARC のキスペプチンニューロンに、エストロゲン受容体 および を介して作用し、成長後の *Kiss1* 発現を消失させることを明らかにし、エストロゲンは発達期の脳においては、成長後とは全く異なるプライミング作用を有することを明らかにした。

5) ブタにおいて、性成熟前と性成熟後の視床下部における *Kiss1* 発現の経時的変化を探索し、ブタにおいては *Kiss1* 発現が性成熟前から認められることを明らかとし、ブタの性成熟はキスペプチン分泌を促進する機構の成熟が性成熟をもたらすことを示唆した。このことから、ブタではラットやマウスと異なり、性成熟前のエストロゲンの負のフィード

バックの影響が少ないことを示唆した。

6) 雌ラットにおいて、エストロゲンの正のフィードバックによる LH サージが、雄ラット床敷き由来の物質によって増強されることを示し、またこの増強が AVPV のキスペプチンニューロンの活性化によることを明らかにした。

7) 正および負のフィードバックを担うエストロゲンの作用部位と想定した2つの神経核、すなわち AVPV および ARC それぞれに局在するキスペプチンニューロンに特異的に発現する転写因子、コファクター、ヒストン修飾蛋白、SNARE 蛋白質遺伝子発現を検索し、そのプロット解析を実施した。その結果、両神経核の同ニューロンには、*Kiss1* の発現が高い時に、共通のヒストン修飾蛋白 A が発現することを発見した。さらにヒストン修飾蛋白 A と *Kiss1* との共存を double in situ hybridization 法により確認したところ、そのキスペプチンニューロンとの共存率が、それぞれの神経核で 80% を越えることを明らかにし、ヒストン修飾蛋白 A が *Kiss1* 発現促進を担うことを示唆した。

8) ラット ARC と AVPV 由来のキスペプチン不活化細胞株を作製し、ARC と AVPV それぞれのキスペプチンニューロンに特異的に発現するマーカー遺伝子を指標として選抜し、複数の候補株を得た。これら複数の候補株から、エストロゲンによる正負のフィードバックを *in vitro* で再現する株を絞り込む作業を実施した。さらに、上記7)で得られた、*Kiss1* 遺伝子発現を制御する可能性が高いヒストン修飾蛋白 A の役割解明のための *in vitro* 実験に着手した。

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28件中15件掲載)

1. 上野山賀久・井上直子・束村博子 (2017) 哺乳類の生殖制御メカニズムとその老化。日本抗加齢医学会雑誌 13 808-812. 査読無
2. 家田菜穂子・井上直子・束村博子・上野山賀久 (2017) キスペプチンによる生殖制御機構。内分泌・糖尿病・代謝内科 44: 2-6. 査読無
3. Watanabe Y, Ikegami K, Ishigaki R, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H, Inoue N. (2017) Enhancement of the LH surge by male olfactory signals is associated with AVPV *Kiss1* cell activation in female rats. *J Neuroendocrinol*, 29 doi: 10.1111/jne.12505. 査読有
4. Minabe S., Ieda N., Watanabe Y., Inoue N., Uenoyama Y., Maeda K.-I., and Tsukamura H. (2017) Long-term neonatal estrogen exposure causes

irreversible inhibition of LH pulses by suppressing arcuate kisspeptin expression via estrogen receptors and in female rodents. *Endocrinology*, 158(9):2918-2929. doi: 10.1210/en.2016-1144. 査読有

5. 井上直子、束村博子、上野山賀久(2016) 視床下部による卵胞発育制御機構～卵胞発育を理解する-知っておくべき基礎知識【卵胞発育の生理】。臨床婦人科産科第70巻第12号別冊(2016.12.10) 1094-1097. 医学書院. 査読無
6. 上野山賀久、束村博子(2016) ほ乳類の生殖機能を制御するエストロジェンのフィードバック作用を仲介する脳内メカニズム。日本生殖内分泌学会雑誌 21 : 5-8. 査読無
7. Uenoyama Y, Pheng V, Tsukamura H, Maeda K. (2016) The roles of kisspeptin revisited: inside and outside the hypothalamus. *J Reprod Dev* 62:537-545. 査読有
8. Uenoyama Y, Tomikawa J, Inoue N, Goto T, Minabe S, Ieda N, Nakamura S, Watanabe Y, Ikegami K, Matsuda F, Ohkura S, Maeda KI, Tsukamura H. (2016) Molecular and epigenetic mechanism regulating hypothalamic *Kiss1* gene expression in mammals. *Neuroendocrinology*, 103:640-649. doi :10.1159/000445207. 査読有
9. Minabe S, Deura C, Ikegami K, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H. (2015) Pharmacological and Morphological Evidence of AMPK-Mediated Energy Sensing in the Lower Brain Stem Ependymocytes to Control Reproduction in Female Rodents. *Endocrinology*. 156(6):2278-87. doi: 10.1210/en.2014-2018. 査読有
10. Uenoyama, Y., Nakamura, S., Hayakawa, Y., Ikegami, K., Watanabe, Y., Deura, C., Minabe, S., Tomikawa, J., Goto, T., Ieda, N., Inoue, N., Sanbo, M., Tamura, C., Hirabayashi, M., Maeda, K., Tsukamura, H. (2015) Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of LH release in *Kiss1* knockout rats. *J Neuroendocrinol.*, 27(3):187-97. doi: 10.1111/jne.12257. 査読有
11. 前多敬一郎・大石真也・束村博子・上野山賀久・大蔵聡・松田二子(2014) 新たな中枢性繁殖制御剤のシーズ: KNDy ニューロン。MP アグロジャーナル, No.16, ISSN2185-2499, 17-21. 査読無
12. Matsuda, F., Nakatsukasa, K., Suetomi,

- Y., Naniwa, Y., Ito, D., Inoue, N., Wakabayashi, Y., Okamura, H., Maeda, K.I., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Ohkura, S. (2014) The LH surge-generating system is functional in male goats as in females: involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. *J Neuroendocrinol.*, 27, 57-65. doi: 10.1111/jne.12235. 査読有
13. Watanabe, Y., Uenoyama, Y., Suzuki, J., Takase, K., Suetomi, Y., Ohkura, S., Inoue, N., Maeda, K.-I., and Tsukamura, H. (2014) Oestrogen-induced activation of preoptic kisspeptin neurones may be involved in the luteinising hormone surge in Male and Female Japanese Monkeys. *Journal of Neuroendocrinology*, 26, 910-918. doi: 10.1111/jne.12227. 査読有
 14. Goto, T., Tomikawa, J., Ikegami, K., Minabe, S., Abe, H., Fukanuma, T., Imamura, T., Takase, K., Sanbo, M., Tomita, K., Hirabayashi, M., Maeda, K.I., Tsukamura, H., Uenoyama, Y. (2015) Identification of hypothalamic arcuate nucleus-specific enhancer region of *Kiss1* gene in mice. *Mol Endocrinol.*, 29: 121-129. doi: 10.1210/me.2014-1289. 査読有
 15. Ieda, N., Uenoyama, Y., Tajima, Y., Nakata, T., Kano, M., Naniwa, Y., Watanabe, Y., Minabe, S., Tomikawa, J., Inoue, N., Matsuda, F., Ohkura, S., Maeda, K.-I. and Tsukamura, H. (2014) *KISS1* Gene Expression in the Developing Brain of Female Pigs at Pre- and PostPeri-pubertal Periods. *J Reprod Dev.* 60(4):312-6. doi.org/10.1262/jrd.2013-129. 査読有
- 〔学会発表〕(計78件中35件掲載)
1. 長江麻佑子、束村博子、前多敬一郎、上野山賀久：GnRHパルスおよびサージ発生中枢の同定を目的とした Kiss1-floxed ラットの作出。日本畜産学会第124回大会、2018年
 2. Chikaya Deura, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura : The Tracing Study of the Neural Pathway Originating from the Hindbrain Ependymocytes for Regulating Reproductive Functions. ENDO 2018, 2018年
 3. Kei Horihata, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura : Establishment of Immortalized Cell Lines Derived from Rat AVPV and ARC Kisspeptin Neurons. ENDO 2018, 2018年
 4. 堀畑慶、前多敬一郎、束村博子：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。平成29年度 東海畜産学会大会 2017年
 5. 長江麻佑子、平林真澄、束村博子、前多敬一郎、上野山賀久：卵胞発育中枢および排卵中枢の同定を目的とした Kiss1-floxed ラットの作出。平成29年度 東海畜産学会大会 2017年
 6. 石垣蓮、束村博子、井上直子：脳内 ATP-プリン受容体を介した排卵中枢制御メカニズム。平成29年度 東海畜産学会大会、2017年
 7. Ren Ishigaki, Hiroko Tsukamura, Naoko Inoue : The effect of administration of ATP into the anteroventral periventricular nucleus on LH secretion in female rats. 4th World Congress of Reproductive Biology, 2017年
 8. Kei Horihata, Kei-ichiro Maeda and Hiroko Tsukamura : Establishment and evaluation of rat kisspeptin neuronal cell lines. 4th World Congress of Reproductive Biology, 2017年
 9. 渡辺雄貴、前多敬一郎、束村博子、井上直子：雌由来臭覚刺激は雌ラット前腹側室周囲核キスペプチンニューロンを活性化し LH 分泌を増強する。第35回内分泌代謝学サマーセミナー、2017年
 10. 井上直子、束村博子：哺乳類における HPG 軸と生殖機能制御。第35回内分泌代謝学サマーセミナー、2017年
 11. 束村博子：生殖を制御する中枢メカニズム：キスペプチンとその発現のエピジェネティック機構。第90回日本内分泌学会学術総会、2017年
 12. Tsukamura, H. : Development/Sex Differences of *Kiss1* neurons. 3rd World Conference of Kisspeptin-Brain and Beyond, 2017, 2017年
 13. 石垣蓮、束村博子、井上直子：前腹側室周囲核への ATP の投与が LH 分泌に及ぼす影響。畜産学会第122回大会、平成29年
 14. 小林卓磨、束村博子：性成熟期における KNDy ニューロンの神経ペプチド遺伝子発現におよぼすエストロジェンの影響。第43回日本神経内分泌学会学術集会、2016年
 15. 堀畑慶、前多敬一郎、束村博子：ラットキスペプチンニューロン不死化細胞株の樹立。第109回日本繁殖生物学会大会、2016年
 16. Kei Horihata, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura: Establishment of rat kisspeptin neuronal cell lines. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems (ISPGRS 2016), 2016年

17. Tsukamura, H. : Kisspeptin and Reproduction. 2016年, 中国農業大学
18. 松田二子, 大蔵聡, 前多敬一郎, 束村博子: 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。第13回GPCR研究会、2016年
19. 束村博子: 哺乳類の生殖を制御する神経内分泌機構-キスペプチンニューロンを中心に。日本内分泌学会学術総会、平成28年
20. 束村博子, 上野山賀久: 哺乳類の生殖を制御するキスペプチン-GPCR54シグナリングの役割。第93回日本生理学会大会、平成28年
21. 束村博子: 性腺機能低下症の基礎と臨床: 最新のトピックス「ほ乳類の生殖機能を制御するキスペプチンニューロンの役割」第20回日本生殖内分泌学会学術集会、2016年
22. Y. Watanabe, S. Ohkura, K.-I. Maeda and H. Tsukamura. : Involvement of Preoptic Kisspeptin Neurons in Estrogen Positive Feedback to induce Luteinizing Hormone surge in both female and male Japanese monkey International Conference on Biology and Pathology of Reproduction in Domestic Animals, 2015年
23. 渡辺雄貴, 束村博子: メスとの同居はオスラットAVPVのKiss1発現およびLH分泌上昇を誘起する。第108回日本繁殖生物学会大会、2015年
24. 渡辺雄貴, 束村博子: オスラットの床敷曝露によるメスラット前腹側室周囲核(AVPV)キスペプチンニューロンの活性化およびLH分泌の増強作用。第30回日本下垂体研究会学術集会、2015年8月
25. 束村博子: 「キスペプチンニューロンによる生殖機能制御メカニズム」第19回小児分子内分泌研究会、2015年
26. 束村博子: 「生殖を制御する脳内メカニズム〜キスペプチンニューロンを中心に〜」。第37回中部生殖医学会学術集会、2015年
27. 束村博子: 視床下部による生殖機能制御メカニズム-キスペプチンニューロンを中心に。第88回日本内分泌学会学術総会、2015年
28. 束村博子: 性ステロイドフィードバックと脳内プログラミング。第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会、2015年
29. 束村博子: 「種を超えてほ乳類の生殖機能を制御するキスペプチンニューロン」第41回日本神経内分泌学会学術集会、2014年
30. Goto, T., Tsukamura, H., Hirabayashi, M., Maeda, K.-I., Uenoyama Y.: enhancer for kisspeptin expression of female mice. World Congress of Reproductive Biology 2014, 2014年
31. Suetomi, Y., Tsukamura, H., Ohkura, S., Matsuda, F.: Establishment of immortalized neuronal cell lines derived from fetal goat hypothalamus. World Congress of Reproductive Biology 2014, 2014年
32. Tsukamura, H. : Kisspeptin-GPR54 signaling controlling reproductive functions in mammals World Congress of Reproductive Biology 2014, 2014年
33. Tsukamura, H. : Kisspeptin and GnRH pulse generation. ~Key role of Kisspeptin-GPR54 signaling in regulating mammalian reproduction: physiological and epigenetic aspects ~ International Congress of Neuroendocrinology 2014, 2014年
34. 束村博子 : 「脳の性分化とキスペプチンニューロン」第41回日本毒性学会、2014年
35. Tsukamura, H. : Epigenetic Regulation of Kisspeptin Neurons. 16th International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo, 2014年
- 〔図書〕(計1件)
1. Tsukamura H, Maeda KI, Uenoyama Y. (2018) Fetal/perinatal programming causing sexual dimorphism of the kisspeptin-GnRH neuronal network. In: Herbison AE, Plant TM, eds. The GnRH Neuron and its Control: Wiley, in press.
- 〔その他〕
ホームページ等
<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hanshoku/ReprodWeb/home.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者 束村博子 (TSUKAMURA, Hiroko)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号: 00212051
- (2) 研究分担者
大蔵 聡 (OHKURA Satoshi)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号: 20263163
- 平林真澄 (HIRABAYASHI Masumi)
生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授
研究者番号: 20353435
30. Goto, T., Tsukamura, H., Hirabayashi, M., Maeda, K.-I., Uenoyama Y.: Hypothalamic arcuate nucleus-specific

前多敬一郎 (MAEDA Kei-ichiro)
東京大学・農学生命研究科・教授
研究者番号：30181580
(平成 30 年 2 月 逝去により削除)