

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06380

研究課題名（和文）生殖中枢を制御する新規神経ペプチド化合物による繁殖機能の賦活化

研究課題名（英文）Stimulation of reproductive function by novel neuropeptide compound influencing central system for reproduction

研究代表者

田中 知己（Tanaka, Tomomi）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：20272643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：神経ホルモンをモチーフとした新規神経ペプチド化合物の投与が卵胞の発育を制御する黄体形成ホルモンおよび受胎性に関与する黄体ホルモンに及ぼす影響をヤギにおいて検証した。その結果、化合物投与後に黄体形成ホルモンおよび黄体ホルモン分泌が増加することが確認された。牛での腔検査所見を組み合わせることで、この新規化合物が家畜の受胎性を向上させる薬物として有効である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳用牛における人工授精の受胎成績は低い水準に留まり、受胎率の改善に向け様々な側面からの対策が急務となっている。中でも、最近の乳牛では分娩後の卵胞発育障害と発情異常が頻発している。家畜の繁殖障害を克服する獣医臨床技術確立のための基盤研究として、本研究課題では、新たに作製された神経ペプチド化合物が繁殖ホルモン分泌に及ぼす影響を調べ、この薬剤が繁殖機能を賦活化する有効な薬剤となり得る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The effects of a novel neuropeptide compound on the secretions of luteinizing hormone, which regulates follicular development, and gestagen were examined in goats. The results showed that luteinizing hormone and gestagen secretions increased after an administration of the compound. Combined with vaginal examination in cows, the results indicated that this novel compound might be effective as a drug to improve fertility in livestock animals.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：繁殖刺激 神経ペプチド 卵巣機能 黄体形成ホルモン 黄体ホルモン 腔検査 ヤギ ウシ

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

様々な内的・外的環境要因により動物の繁殖活動は修飾されるが、それら環境要因の変化は、最終的に視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）という神経内分泌情報に変換され、下垂体からの黄体形成ホルモン（LH）分泌を介して繁殖活動に影響を及ぼす。したがって、生殖の中枢とも言える GnRH 分泌を人為的にコントロールすることができれば、動物の繁殖活動の制御や繁殖障害の治療に極めて有効な手段になることが期待される。GnRH 分泌調節機構の具体的な神経メカニズムは長年ブラックボックスの状況が続いていたが、2000 年代初頭におけるキスペプチンの発見が大きな転機となり、その正体が急速に明らかとなってきた。GnRH/LH はパルス状（律動的）あるいはサージ状（一過性の大量放出）に放出され、それぞれ卵胞発育および排卵を制御しているが、視床下部の一定の領域にはキスペプチン、ニューロキニン B（NKB）、ダイノルフィンという 3 つの神経ペプチドが共存する神経細胞群が存在し、これらがパルス/サージ発生機構の根幹をなす神経因子であることが明らかとなった。さらに、その後の研究の進展によりキスペプチンと NKB は GnRH 分泌の促進因子として、ダイノルフィンは抑制因子として作用することも明らかとなり、これらの類縁物質や受容体作動薬を合成し、中枢神経系を標的とする新たな繁殖用薬の開発に向けた応用研究が展開されている。

研究代表者は民間企業との共同研究においてキスペプチン類縁物質の投与が繁殖ステージの卵巣の状況に応じて GnRH/LH をパルス状あるいはサージ状に放出させるという、これまでの繁殖用薬では見られない特異的薬効を示すことをヤギを用いた実験で明らかにした。また、NKB 受容体作動薬の投与による LH 分泌に対する刺激効果を検証し、京都大学との共同研究において刺激作用をさらに増強させる新規 NKB 受容体作動薬を作成したところである。これまで得られた研究成果を総合すると、これら生殖中枢に直接作用する神経ペプチド化合物の活用により、従来の繁殖用薬とは異なる作用機序で優れた効果を発揮する新たな繁殖制御技術の開発につながる事が想定された。

また、家畜における将来的な新規化合物の臨床応用を見据えると、薬剤の腔内投与は様々な薬剤にも適用範囲が広がることを見込め、牛や羊を含む他の家畜に対しても大きな波及効果が期待できる。一方で、腔内からは繁殖状態の指標となる様々な情報が得られることから、経腔薬剤投与法においては、単に薬剤を腔内に投与するだけでなく、投与時の繁殖状態を腔内の検査によってモニターし、検査と処置の相乗効果によって繁殖機能の向上につなげることが重要である。本課題は、家畜の繁殖効率を向上させるための治療薬の活用に焦点をあて立案された。

### 2. 研究の目的

実験動物としてヤギを用い、新規に開発した NKB 受容体作動薬が生殖内分泌機構に及ぼす作用特性を明らかにする。また、本課題では将来的に当該作動薬の経腔薬剤としての応用を想定していることから、牛の腔内から得られる生体情報をモニターし、腔・子宮内検査所見を本薬剤の腔内投与の判断基準として活用するための基盤知見を得ることとした。

### 3. 研究の方法

(1)ヤギの発情周期における新規 NKB 受容体作動薬 (B21-750) の投与が生殖内分泌系に及ぼす影響の検討

発情周期において、受精の成立に重要な卵胞期および胚の発育に重要な黄体期に焦点をあてる。B21-750 の静脈内投与が生殖内分泌系に及ぼす影響を調べ、薬剤の活用法について基盤的な知見を得る。

(2)牛における子宮頸管粘液 (CVM) を用いた新規腔内生体情報のモニタリング

腔内へ薬剤を投与する際に、受胎性に関する生体情報をモニターすることを想定し、分娩後および人工授精時において得られる CVM を検体として、CVM 中に存在する生理活性物質と繁殖機能との関係を調査した。

### 4. 研究成果

(1)新規 NKB 受容体作動薬 (B21-750) が黄体形成ホルモンおよびプロゲステロン分泌に及ぼす影響

京都大学において作製された B21-750 は、強力なニューロキニン受容体アゴニスト活性を有するポリエチレングリコール-ペプチド結合体である。

実験 1-1 では、発情周期を回帰するヤギを卵胞期 (FP, n=5) 群または黄体期 (LP, n=5) 群に分けた。FP 群では、黄体期に 2 mg のプロスタグランジン F<sub>2</sub> 剤を注射し、その後プロゲステロン腔内徐放製剤 (CIDR) を 10 日間挿入して発情を同期化させた。CIDR 抜去後 12 時間に B21-750 (200 nmol) を静脈内に投与し、連続採血を行った。LP 群では、排卵後 7 日~14 日の間の 1 日に、B21-750 (200 nmol) の注射と連続採血を行った。B21-750 の投与量 (200 nmol/頭) は、センクタイトの有効性を評価した我々の先行研究 (Endo et al., 2015) との比較のために使用した。

実験 1-2 では、発情周期の黄体期において実験を行なった。自然発情あるいはプロスタグランジン F<sub>2</sub> 剤を用いて発情を誘起し、発情確認後 7~14 日の間に B21-750 を静脈内に投与した。投与量は薬剤の用量依存性を検証するため 0 nmol (対称群), 1000 nmol, 5000nmol とした。

両実験ともに B21-750 投与前 2 時間から投与後 6 時間まで頸静脈に留置したカテーテルを介して 10 分間隔で頻回採血を行なった。

実験 1-1 において FP 群, LP 群ともに B21-750 投与後 1 時間以内に一過性の LH 分泌の増加が認められた。FP 群の 0~1 時間の LH 濃度の曲線下面積 (AUC) は, B21-750 投与後の -1~0 時間の LH 濃度 ( $0.59 \pm 0.10 \text{ ng/ml}$ ) と比較して有意差はなかった。LP 群では, B21-750 投与時と比較して, -1~0 時間で  $0.16 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$ 、0~1 時間で  $0.34 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$  と有意差は認められなかった。しかし, LH の AUC の変化率は FP 群において投与前-1 時間から 0 時間までと比較して投与後 0 時間から 1 時間までの期間において有意に増加した (図 1 上段)。LP 群では, 投与後 0~1 時間および 5~6 時間の LH の AUC の変化率は, 投与前 1~0 時間と比較して有意に高かった (図 1、下段)。FP 群における投与後 0~1 時間の LH の AUC の変化率 ( $184.9 \pm 33.4\%$ ) は LP 群 ( $241.0 \pm 209.6\%$ ) と有意差はなかった。

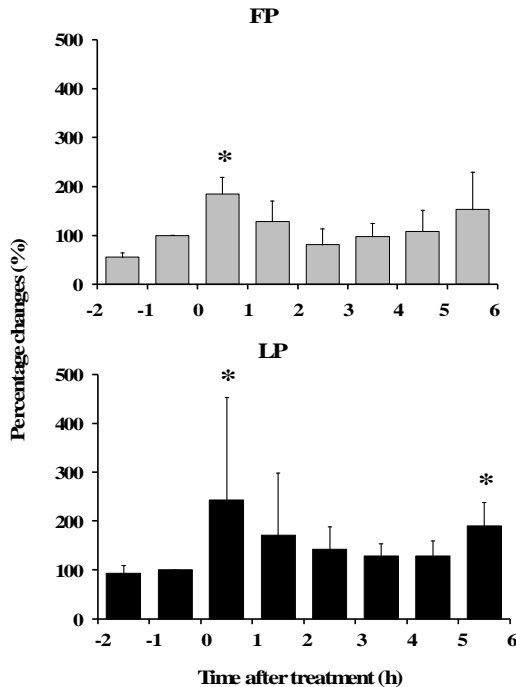


図 1 B21-750 投与が LH 分泌に及ぼす影響  
\*  $P < 0.05$

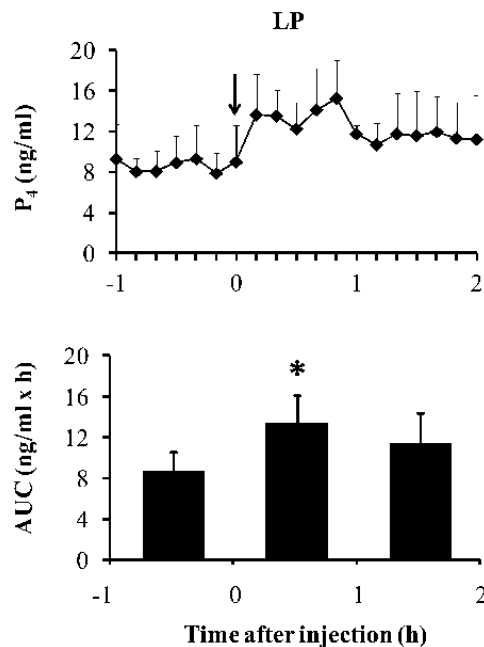


図 2 B21-750 投与がプロゲステロン分泌に及ぼす影響 \*  $P < 0.05$

LP 群における投与前 1 時間から投与後 2 時間までの血漿中プロゲステロン濃度の変化を図 2 に示す。B21-750 投与後のプロゲステロン濃度は B21-750 投与前の濃度と比較して有意な差は認められなかった。しかし, 投与後 0~1 時間の血漿中プロゲステロン濃度 ( $13.4 \pm 2.7 \text{ ng/ml}$ ) の AUC は -1~0 時間の濃度 ( $8.6 \pm 1.9 \text{ ng/ml}$ ) に比べ有意に増加した (図 2, 下段)。FP 群における投与後直後から 2 時間までのエストラジオール濃度およびその AUC について, 投与直前の 0 時間と比較して有意な差は検出されなかった。

実験 1-2 において黄体期における用量依存的な血中 LH 濃度の上昇は認められなかった。一方, プロゲステロン濃度は投与後に有意な上昇が認められ, 実験 1-1 を支持する結果となった。先行研究において NKB 受容体作動薬は発情周期のステージにより, その効力が異なることが知られている。B21-750 は, 黄体期において用量依存的な刺激作用が認められなかったことから, B21-750 の黄体期における LH 分泌に対する刺激作用は限定的である可能性が考えられる。一方, 黄体期においてプロゲステロン濃度を亢進したことから, B21-750 は, 黄体期において, LH 分泌を介さずに直接黄体に作用し, 黄体機能を刺激している可能性が考えられた。したがって, 交配後におけるこの薬剤の投与は血中プロゲステロン濃度を上昇させ, 家畜の受胎率の向上につながる可能性を示唆した。

## (2) 牛における子宮頸管粘液 (CVM) を用いた新規腔内生体情報のモニタリング

牛において CVM は低侵襲かつ容易に得られる検査材料であり, そのスコアリングや細胞学的検査は子宮疾患の診断に用いられている。本研究室の先行研究において, 分娩後に採取された子宮洗浄回収液から 13,14-dihydro-15-keto-Prostaglandin  $F_2$  (PGFM) が検出され, 子宮局所の炎症評価指標としての有用性が示唆された。本研究では CVM の処理法を検討するとともに, CVM 中の対全細胞多形核好中球割合 (PMN%)、PGFM 濃度を測定し, 繁殖機能検査に資する腔内生体情報のモニタリング法について検討した。

実験 2-1 では, ヤギでの成果を産業動物である牛に応用することを念頭におき, 牛での繁殖状態を検査するための手段の一つとして, 子宮頸管粘液中の生理活性物質の測定手技について検証を行った。正常な発情周期を回帰するホルスタイン種乳用牛の発情期または黄体期に採取し

- 20 で保管されていた CVM を用いて、処理法を決定するための試験を行った。先行研究での処理法に則り、ジチオトレイトール (DTT) を用いた方法で CVM の処理を行った。目視による粘性消失の判断は測定結果に差が生じやすく、また過剰量の DTT の添加は検出系に影響を及ぼすとの報告もあるため、粘液の性状に関わらず粘性を消失させ、かつ測定結果に重大な影響を及ぼさない適切な DTT 量を調べた。その結果、発情周期を回帰する牛において、子宮頸管粘液の DTT 処置により、粘液中の PGFM 濃度の測定が可能であることを示した。

実験 2-2 では、CVM 中の PMN および PGFM と受胎性との関係を調査した。人工授精時に用いて CVM を採取し、CVM 中 PMN% を調べた。また、実験 2-1 で確立した手法により CVM を処理し、CVM 中の PGFM 濃度を測定し、PMN% および受胎率と関係を調べた。その結果、人工授精時において CVM 中の PMN% が高いグループでは PGFM 濃度が有意に低く、受胎率が有意に低かった。人工授精時に腔内から得られる生殖機能情報をモニターすることが受胎性の向上に有用であり、B21-750 腔内投与の有効性を判断する所見としても活用できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 TANAI Shunsuke, ENDO Natsumi, TANAKA Tomomi	4. 巻 217
2. 論文標題 Quantifying the C-reactive protein concentrations of uterine lavage samples in postpartum dairy cows	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Reproduction Science	6. 最初と最後の頁 106455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anireprosci.2020.106455.	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 -

1. 著者名 RAHAYU Larasati Puji, ENDO Natsumi, KUWAI Shinji, OISHI Shinya, TANAKA Tomomi	4. 巻 65
2. 論文標題 The efficacy of a newly developed neurokinin 3 receptor agonist B21-750 on luteinizing hormone secretion in cycling goats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 481 ~ 484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-038	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河原直哉, 遠藤なつ美, 田中知己
2. 発表標題 ホルスタイン種泌乳牛の発情後7日における卵巢超音波検査所見と血中プロゲステロン濃度および栄養代謝因子との関係
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石山大, 遠藤なつ美, 安藤湧希, 吉田倫子, 赤松優美, 石井佑奈, 清水秀茂, 田中知己, 松田二子
2. 発表標題 膈壁への接触を回避した人工授精方法がホルスタイン種経産牛の受胎率を向上させる要因の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石山大、遠藤なつ美、安藤湧希、吉田倫子、赤松優美、石井佑奈、清水秀茂、田中知己
2. 発表標題 ホルスタイン種経産牛における紫外線を用いた尿腔の検出とその有用性の検討
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤湧希、遠藤なつ美、清水秀茂、田中知己
2. 発表標題 乳牛におけるヨード剤子宮内投与後の子宮洗浄回収液中13,14-dihydro-15-keto- prostaglandin F2 濃度の変化
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田中知己、岡村裕昭 他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 351
3. 書名 繁殖生物学改訂版	

1. 著者名 獣医繁殖学教育協議会（田中知己、分担執筆）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 200
3. 書名 コアカリ 獣医臨床繁殖学	

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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