科学研究費助成事業（基盤研究（Ｓ））公表用資料
〔令和５(2023)年度 中間評価用〕

令和５年３月３１日現在

研究期間	２０２１～２０２５
課題番号	２１Ｈ０５０３１
研究課題名	家畜の排卵・卵胞発育制御法の開発に資するエストロゲンフィードバック機構の解明
研究代表者氏名（ローマ字）	束村　博子（TSUKAMURA Hiroko）
所属研究機関・部局・職	名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号	００２１２０５１

研究の概要：哺乳類メスにおける「排卵」と「卵胞発育」を制御するエストロゲンの正と負のフィードバックのメカニズムを、生殖中枢キスペプチンニューロンに着目して解明し、ラットなどモデル動物で得られた知見をヤギ・ウシなど家畜に活用し新たな繁殖制御法の開発に資することを目指すものである。

研究分野：動物生産科学

キーワード：卵胞発育・排卵制御、家畜の繁殖促進技術、生殖中枢キスペプチンニューロン、エストロゲン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）、黄体形成ホルモン（LH）、弓状核、前腹側室周囲核（AVPV）

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。低濃度のエストロゲンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）のパルス状分泌を抑制し（負のフィードバック）、黄体形成ホルモン（LH）パルスを抑制することにより卵胞発育をファインチューニングする。一方、成熟卵胞からの高濃度エストロゲンは、GnRH/LH サージを促し、排卵を誘起する（正のフィードバック）。のフィードバック作用は、視床下部のキスペプチンニューロンにより仲介されることが示唆されるが、そのメカニズムの解明には至っていない。家畜の繁殖障害やヒトの生殖障害には、正負フィードバック機構の異常が原因と見られる事例が多く、このメカニズム解明による技術革新が求められている。

２．研究の目的

哺乳類のメスにおける「卵胞発育」と「排卵」を制御するエストロゲンのフィードバック機構を、キスペプチンニューロンに着目して明らかにし、家畜での新規繁殖制御剤の開発に資することを目的とする。

３．研究の方法

Ⅰ.ラットをモデル動物として用いた正負フィードバックの分子機構の解明

ラットを用い、キスペプチンニューロン対するエストロゲンの作用を仲介する候補因子を選抜する。

Ⅱ.キスペプチンニューロン特異的候補遺伝子ノックアウト（KO）ラット等の作製による候補因子の生理的役割解明

キスペプチンニューロン特異的候補因子遺伝子 KO ラット等により、候補因子の生理的役割を解明する。

Ⅲ.キスペプチンニューロンを直接制御する上位ニューロンの同定と機能解析

キスペプチンニューロンを上位から直接制御する上位ニューロンを同定する。

Ⅳ.家畜（ウシ・ヤギ）を用いた基礎的知見の検証と応用展開研究

ヤギ・ウシにおける卵胞発育・排卵障害の治療に有効な候補化合物を同定する。

４．これまでの成果

1）エストロゲンの正のフィードバックを仲介し、排卵中枢 AVPV キスペプチンニューロンを刺激するプリン作動性ニューロン–ATP 受容体の役割を解明

ATP を神経伝達物質とするプリン作動性ニューロンが、エストロゲンの正のフィードバックを仲介し、排卵中枢 AVPV キスペプチンニューロンを刺激することを明らかにした（Inoue *et al*., 2023, J Neurosci）。

2）泌乳、低栄養、細菌感染による弓状核キスペプチンニューロンの抑制を仲介する神経系の解明

泌乳期、低栄養時による *Kiss1* 発現や GnRH/LH パルス抑制を担うソマトスタチンニューロン（Sugimoto *et al.,* 2022, J Reprod Dev）、ダイノルフィンニューロンやエンケファリンニューロンの役割を明らかにし（Tsuchida *et al*., 2022, Neurosci Lett; Tsuchida *et al*., 2023, Endocrinology）、細菌感染モデルラットで *Kiss1* 発現と LH パルス抑制を明らかにした (Magata *et al.,* 2022, Reproduction; Magata *et al*., 2023, Peptides)。

3）家畜（ウシ・ヤギ）を用いた基礎的知見の検証と応用展開研究

ヤギ実験系の強化とウシ卵胞嚢腫における排卵障害の病態解明のためのフィールド調査を実施した。

５．今後の計画

I. ラットをモデル動物として用いた正負フィードバックの分子機構の解明

1）キスペプチン発現・分泌に関わる有力候補因子の組織学的解析による絞り込み

ラット常時可視化キスペプチンニューロンのRNA-seq解析により、候補因子を絞り込む。

2）キスペプチン分泌を制御する受容体（GPCR）同定の為の*in vitro*解析

得られた候補GPCR遺伝子をGPCR活性測定系に導入し、候補リガンドをスクリーニングする。

3）キスペプチン遺伝子発現制御因子および分泌制御因子を同定するための*in vivo*解析

候補受容体リガンド等のキスペプチンニューロン活動への効果を検証し、候補因子を絞り込む。

II. キスペプチンニューロン特異的候補因子 KO ラット等の作製による候補因子の生理的役割証明

キスペプチンニューロン特異的候補遺伝子KOラットを作製し､候補因子の生理的役割を明らかにする。

III.キスペプチンニューロンを直接制御する上位ニューロンの同定と機能解析

1)　グルタミン酸作動性ニューロンによるエストロゲンの負のフィードバック効果の検証

グルタミン酸作動性神経がエストロゲンの負のフィードバックを仲介するかを検証する。

2) キスペプチンニューロンを直接制御する新規な上位ニューロンの同定

キスペプチンニューロンを直接上位から制御するニューロンをトレーサー実験等により同定する。

IV. 家畜（ウシ・ヤギ）を用いた基礎的知見の検証と応用展開研究

1）　ヤギを用いた候補因子の*Kiss1*発現・卵胞発育中枢活動、LH分泌制御機構の検証

ヤギ脳内・全身投与へ候補因子投与により、候補因子をさらに絞り込む。

2）候補因子投与によるウシの繁殖障害の治療効果の検証

繁殖障害を示すウシを選抜し、有力な候補物質が繁殖機能の改善に資するかを検証する。

６．これまでの発表論文等（受賞等も含む）

＜発表論文＞

1 Inoue N, Hazim S, Tsuchida H, Dohi Y, Ishigaki R, Takahashi A, Otsuka Y, Yamada K, Uenoyama Y, Tsukamura H. Hindbrain adenosine 5-triphosphate (ATP)-purinergic signaling triggers LH surge and ovulation via activation of AVPV kisspeptin neurons in rats. J Neurosci. 2023; 43: 2140-2152. 査読有

2 Magata F, Tsukamura H, Matsuda F. The impact of inflammatory stress on hypothalamic kisspeptin neurons: Mechanisms underlying inflammation-associated infertility in humans and domestic animals. Peptides. 2023; 162: 170958. 査読有

3 Tsuchida H, Nonogaki M, Takizawa M, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H. Enkephalin-δ opioid receptor signaling mediates glucoprivic suppression of LH pulse and gluconeogenesis in female rats. Endocrinology. 2023; 164: bqac216. 査読有

4 Tsuchida H, Nonogaki M, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H. Dynorphin-κ-opioid receptor signaling, but not μ-opioid receptor signaling, partly mediates the suppression of luteinizing hormone release during late lactation in rats. Neurosci Lett. 2022; 791: 136920. 査読有

5 Magata F, Toda L, Sato M, Sakono T, Chambers JK, Uchida K, Tsukamura H, Matsuda F. Intrauterine LPS inhibited arcuate *Kiss1* expression, LH pulses, and ovarian function in rats. Reproduction. 2022; 164: 207-219. 査読有

6 Inoue N, Hotta A, Goto T, Hirabayashi M, Uenoyama Y, Tsukamura H. Establishment of embryo transfer in the musk shrew (*Suncus murinus*). J Reprod Dev. 2022; 68: 340-344. 査読有

7 Uenoyama Y, Tsuchida H, Nagae M, Inoue N, Tsukamura H. Opioidergic pathways and kisspeptin in the regulation of female reproduction in mammals. Front Neurosci. 2022; 16958377. 査読有

8 Sugimoto A, Tsuchida H, Nagae M, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H. Central somatostatin-somatostatin receptor 2 signaling mediates lactational suppression of luteinizing hormone release via the inhibition of glutamatergic interneurons during late lactation in rats. J Reprod Dev. 2022; 68: 190-197. 査読有

9 Oikawa M, Nagae M, Mizuno N, Iwatsuki K, Yoshida F, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Nakauchi H, Hirabayashi M, Kobayashi T. Generation of Tfap2c-T2A-tdTomato knock-in reporter rats via adeno-associated virus-mediated efficient gene targeting. Mol Reprod Dev. 2022; 89: 129–132. 査読有

10 Chen J, Minabe S, Munetomo A, Magata F, Sato M, Nakamura S, Hirabayashi M, Ishihara Y, Yamazaki T, Uenoyama Y, Tsukamura H, Matsuda F. *Kiss1*-dependent and independent release of luteinizing hormone and testosterone in perinatal male rats. Endocr J. 2022; 69: 797-807. 査読有

11 Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H. Kisspeptin neurons and estrogen-estrogen receptor α signaling: Unraveling the mystery of steroid feedback system regulating mammalian reproduction. Int J Mol Sci. 2021; 22: 9229. 査読有

＜授賞＞ 束村博子. 日本内分泌学会学会賞（2023 年 6 月授賞予定）

7. ホームページ等

http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hanshoku/ReprodWeb/home.html