

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580440

研究課題名(和文) 注射だけで簡便にLH分泌を活発にする持続型キスペプチン剤の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Novel long-lasting kisspeptin derivatives stimulate luteinizing hormone secretion in bovine

研究代表者

角川 博哉 (Kadokawa, Hiroya)

山口大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80370592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：性腺刺激ホルモン(LH)分泌を活発化するキスペプチンの持続作用剤を開発した。まずキスペプチンの構造内の重要部位に、血中半減期を延長し組織透過性を高める効果を付加した薬剤候補を作成した。次にウシ下垂体前葉細胞の培養系を用いて、もっとも良い候補物を選抜した。次に育成牛や分娩後乳牛に対して、連続採血をしながら投与し血中LH濃度の変化を検討した。ウシ培養下垂体前葉細胞に対して、優れたLH分泌促進作用を有する薬剤の候補が得られた。この薬剤は、分娩後乳牛では有意な効果を示さないが、育成牛においてはLH分泌を活発化させた。

研究成果の概要(英文)：Kisspeptin is a peptide hormone that acts as the principal positive regulator of the reproductive axis by stimulating luteinizing hormone (LH) from pituitary. In order to develop new medicine, this study investigated whether various modification of the C-terminal residue of bovine kisspeptin can potentiate the LH-stimulating ability, and have long-lasting pharmacological effects. Some of modification induced the secretion of LH from cultured bovine pituitary cells to a greater degree and longer-lasting than unmodified kisspeptin. In next, we tried to inject the best candidate of new drugs into heifers and postpartum dairy cows. The best candidate stimulated LH secretion in heifers, although it had no significant effect on LH secretion in postpartum dairy cows. Therefore, we developed novel long-lasting kisspeptin derivatives stimulate luteinizing hormone secretion in bovine.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・臨床獣医学

キーワード：臨床繁殖 性腺刺激ホルモン

1. 研究開始当初の背景

動物の性機能調節の中心的なメカニズムは、視床下部にある GnRH 神経細胞が、下垂体からの LH と卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を調節し、卵巣や子宮等の機能を調節する事である。

キスペプチンは最近発見された神経ペプチドであり、GnRH 神経細胞の活動を刺激し、下垂体からの LH や FSH の分泌を活発化する。

申請者らは、ウシにおいてキスペプチンを末梢から投与すると血中 LH 濃度を増加できる事などを初めて報告した (Kadokawa ら、J. Endocrinology、2008)。またこれまでに、乳牛で分娩後の LH 分泌抑制期間が延長する事が、分娩間隔を延長する最重要な原因であり、酪農経営に悪影響する事を明らかにしてきた。また卵巣嚢腫の予防や、排卵後の良好な黄体形成、さらに明瞭な発情徴候や受胎率の向上のためにも LH 分泌が重要な鍵である事を確認してきた。様々な繁殖管理の場面において LH 分泌を活発化させる技術の開発が望まれるため、申請者は種々の薬物や栄養学的処置による LH 分泌の活発化法を開発を試みてきたが、実用的な人為的活性化法を開発達成できなかった。

現在利用可能な薬物投与では目的達成できない理由は、卵巣機能の刺激のためには、FSH とは異なり、LH は血中濃度が増減して変化する事、すなわちパルス状分泌が活発である必要性にある。具体的には GnRH 剤や hCG の単回投与では活発な LH パルスの代用としては不十分であり、また GnRH 剤を点滴で持続的に投与すると、下垂体内の LH 分泌細胞 (ゴナドトロフ) で GnRH 受容体のダウンレギュレーションが起きて性機能は抑制されてしまう。

最近、申請者らは、性機能の減退したオス牛においてキスペプチンを診断に応用できる可能性を見いだした。また 2010 年には非繁殖季節の雌羊に 0.02mg/時間の速度で 48 時間継続して点滴すると、性周期が再帰できる事がフランスのグループにより報告された (Sebert ら、2010)。酪農家等の畜産の現場において長時間の点滴投与法を繁殖に応用するという事は現実的ではないが、キスペプチンを持続投与しても問題が無く、さらに臨床薬として有望な事がこの報告から示唆される。

以上の事から持続型キスペプチン剤の開発と雌牛の繁殖への臨床応用という発案に至った。

2. 研究の目的

本研究では次の 2 つの方針で、LH 分泌活発化作用に優れた持続型キスペプチン剤を開発することとした。

- ・キスペプチンの活性中心である C 末端側ペプチド配列を基として、修飾と改変を加えることによる血中半減期延長などの改善

キスペプチンは 54 個のアミノ酸配列であるが、C 末端側 10 個のみのアミノ酸配列であるキスペプチン 10 (YNWNSFGLRF-NH₂) も活性中心の FGLRF-NH₂ が有り (Curtis ら、2010) 良好な生理作用を有する。しかし現状では、キスペプチン 10 の血中半減期が短く、申請者らのウシを用いた予備実験では、1 回の注射後に数時間しか作用が持続しない。そこでキスペプチン 10 の配列を参考にし、種々の修飾や改変を加えて血中半減期の延長などの改善をすることとした。

- ・持続的に血中にペプチドを放出する能力を有する注射基剤、水酸化アルミニウムゲルの利用

これまでの申請者の予備実験ではキスペプチン 10 を生食に溶解し投与していた。しかしこの事も注射後の作用が短い大きな理由と考えられる。そこで、ホルモン剤と混合してから筋注すると血中にそのホルモン剤を持続的に放出できる水酸化アルミニウムゲルを基剤として用いた。

ウシの過剰排卵処理では、ブタ FSH を 1 日 2 回、3 ~ 4 日間にわたり投与する方法が用いられているが、作業が煩雑である。申請者を含む研究グループは、ワクチンのアジュバントや薬剤の賦形剤として利用されている水酸化アルミニウムゲルと FSH の混合物を単回注射 (ワンショット) する方法を研究した結果、従来法と比べて遜色の無い省力的な過剰排卵処理法を開発した。水酸化アルミニウムゲルと混合したブタ FSH を筋注された供卵牛では、投与後の 48 時間以上で血中ブタ FSH 濃度が高く維持される。

水酸化アルミニウムゲルを利用すれば、ヒツジでの論文と代謝体重比を基に計算される、成牛のための点滴速度である 0.14mg/時間程度の速度は容易に達成できるので、注射基剤に用いることとした。

本研究では次の 4 項目を研究項目として実施した。

(1) 種々の修飾や d 型アミノ酸を導入したペプチド候補を複数種類合成して、*vitro* で予備選抜した。その後、水酸化アルミニウムゲルとの混合物をウシに注射し、注射後の LH

分泌への効果を比較して、優れた LH 分泌活発化作用と長い作用持続時間を有するペプチドを最終選抜した。

(2) 最終選抜されたペプチドから成る持続型キスペプチン剤を雌ウシに定期的に投与し、卵胞発育や排卵後の黄体形成、さらに次の発情徴候などに対する改善効果を調べた。

(3) 持続型キスペプチン剤を反復投与しても抗体が作られない事を確認した。また筋注した部位へのダメージ、さらに枝肉における瑕疵などの悪影響が無い事を確認した。

(4) 乳牛や肉牛に投与し、人工授精後の受胎率の改善や、分娩後のウシにおける性周期再帰に対する持続型キスペプチン剤による促進効果を調べた。

3. 研究の方法

(1) 修飾や改変を加えたペプチドを複数種類合成して選抜候補とし、*in vitro*系で予備選抜した。その後、水酸化アルミニウムゲルとの混合物を牛に注射し、LH 分泌への効果を比較した。これらにより、最も LH 分泌活発化作用に優れ、作用持続時間が長いペプチドを最終選抜した。

(2) 最終選抜されたペプチドから成る持続型キスペプチン剤を、雌牛に定期的に投与し、排卵後の黄体形成や卵胞発育等に対する促進効果や、次の発情徴候に対する改善効果を調べた。

(3) 投与牛で持続型キスペプチン剤に対する抗体が作られない事を確認した。また筋注した部位へのダメージ、さらに枝肉における瑕疵や、他の臓器での悪影響等の問題が無い事を確認した。

(4) 乳牛や肉牛に投与し、人工授精後の受胎率の改善や分娩後の性周期再帰の促進効果を調べた。

4. 研究成果

ウシのキスペプチンの構造内で、生理作用発現に重要な部位を検討し、その部分を基に、血中半減期を延長し、組織透過性を高める効果を付加した薬剤の候補を作成した。

キスペプチンはウシ下垂体前葉細胞にも作用し、LH 分泌を下垂体レベルでも直接的に刺激するため、ウシ下垂体前葉細胞の培養系を構築し、もっとも良い候補物を選抜した。

次に頸静脈カテーテルを装着した育成牛において、連続採血をしながら投与し血中 LH 濃度の変化を検討した。

さらに頸静脈カテーテルを装着した分娩後乳牛においても、連続採血をしながら投与し血中 LH 濃度の変化を検討した。

ウシ培養下垂体前葉細胞に対して、優れた ($P < 0.05$) LH 分泌促進作用を有する薬剤の候補が得られた。

この薬剤を育成牛に投与すると、LH 分泌を活発化させた ($P < 0.05$)。

しかしこの薬剤は分娩後乳牛においては、LH 分泌を活発化させなかった。

開発された薬剤は、培養下垂体前葉細胞と、育成牛に対しては、LH 分泌を活発化させるが、分娩後乳牛では効果が認められなかった。

分娩後乳牛では、下垂体機能が低下していることが知られているため、下垂体機能の回復が本薬剤の効果発現に重要である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Maki S, Kadokawa H. Increased ectopic fat cells in the longitudinal muscularis layer of the oviduct isthmus in obese Japanese Black cows. *Animal Science Journal*, 査読有, Vol. 85, No.3, 2014, 207-212.
DOI: 10.1111/asj.12110

Kadokawa H, Noguchi K, Hajiri Y, Takeshita K, Fujii Y. Transportation decreases the pulse frequency of growth hormone in the blood of prepubertal male calves. *Animal Science Journal*, 査読有, Vol. 84, No.1, 2013, 60-65.
DOI: 10.1111/j.1740-0929.2012.01042.x

Rudolf FO, Kadokawa H. Expression of estradiol receptor, GPR30, in bovine anterior pituitary and effects of GPR30 agonist on GnRH-induced LH secretion. *Animal Reproduction Science*, 査読有, Vol. 139, No.1-4, 2013, 9-17
DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.04.003

Nahar A, Maki S, Kadokawa H. Suppressed expression of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in oviduct ampullae of obese cows. *Animal Reproduction Science*, 査読有, Vol. 139, No.1-4, 2013, 1-8
DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.03.014

Kadokawa H, Sakatani M, Hansen PJ. Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. *Animal Science Journal*, 査読有, Vol. 83, No.6, 2012, 439-445.

DOI: 10.1111/j.1740-0929.2012.01011.x.

Tanaka Y, Kadokawa H. Providing a diet containing only maintenance levels of energy and protein during the latter stages of pregnancy resulted in a prolonged delivery time during parturition in rats. *Reproduction, Fertility, and Development* 査読有、Vol. 24、No.2、2012、317-322.
DOI: 10.1071/RD1104

〔学会発表〕(計2件)

角川博哉、柴田昌宏、戸水一志、日高健雅、中村麗、久保花菜、大塚緑、山田博道、ウシのための新しいキスペプチン受容体に対するアナログの開発、第156回日本獣医学会学術集会、岐阜大学(岐阜市)、2013年9月22日

Kadokawa H 他、G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is expressed, but not for mediation of estradiol suppression of LH secretion in bovine anterior pituitary. The 105th Society for Reproduction and Development Annual Meeting, Tsukuba University (Tsukuba, Ibaraki, Japan), September 5-8, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 新規なペプチド誘導体及びこれを含む医薬

発明者: 角川博哉

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: 特願2014-19236

出願年月日: 2014年2月4日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角川博哉 (KADOKAWA, Hiroya)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号: 80370592

(2) 研究分担者

柴田昌宏 (SHIBATA, Masahiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・近畿中国四国農業研究センター・主任研究員

研究者番号: 60370631