

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658223

研究課題名(和文)コンディショナルノックアウトによる卵胞嚢腫モデルヤギの作出

研究課題名(英文) Establishment of conditional knockout animal model for analyzing the pathogenesis of follicular cyst in the goat.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳領域特異的なキスペプチン遺伝子(KISS1)改変動物の作出に向けた基盤的知見を集積することを目的とし、ゲノムウォーキング法によりヤギKISS1のゲノム構造を明らかにした。また、高濃度エストロゲン投与により、雌雄ヤギにおいて黄体形成ホルモン(LH)サージが誘起され、このとき視索前野キスペプチンニューロンが活性化することを明らかにした。LHサージ発生機構には雌雄による機能差が存在することから、雄ヤギの高濃度エストロゲン応答性LH分泌反応が雌の卵胞嚢腫モデルとして活用できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, as the initial step in establishing a region-specific, conditional KISS1 gene knockout goat, we first revealed the genomic sequence of goat KISS1 gene 5'-upstream region up to 3 kb from translation initiation site. This information can be used for further evaluation of the promoter activity of goat KISS1 gene expression and establishment of conditional knockout model. Second, we demonstrated that an intravenous infusion of estrogen induced surge-like luteinizing hormone (LH) release both in gonadectomized male and female goats, and kisspeptin neurons in the medial preoptic area (mPOA) were activated by estrogen. In castrated male goats, mean peak LH concentration was lower and mean peak time of the LH surge was later than females. These results suggest that deterioration in functioning of mPOA kisspeptin neurons in response to estrogen in male goats can be applied as a model for analyzing the neuronal pathogenesis of follicular cyst in female ruminants.

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：応用動物 神経科学 獣医学 生理学 畜産学 ヤギ キスペプチン 卵胞嚢腫

1. 研究開始当初の背景

卵胞嚢腫牛の卵巣では、異常な大きさの卵胞が排卵することなく存在する。これは排卵を調節する脳機能の異常が原因と考えられる。排卵は、エストロジェンの正のフィードバック作用による性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) および黄体形成ホルモン (LH) のサージ状分泌が引き金となるため、GnRH/LH サージの欠如が卵胞嚢腫の発生要因であると想定できる。われわれは、神経ペプチド、キスペプチンが GnRH/LH 分泌制御に中心的な役割をもつことを示してきたことから (Peptides 30:49-56, 2009)、「サージ中枢におけるキスペプチン神経系の機能不全が卵胞嚢腫の原因」とする仮説を提唱するに至った。卵胞嚢腫を発症した一部の動物では、エストロジェンの正のフィードバック作用を仲介するキスペプチンニューロン群の活性が低下した状態、あるいは、先天的な機能不全が発症のメカニズムとなることが想定された。

従来、卵胞嚢腫の治療には、GnRH 製剤やヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) などを用いてきた。これらの薬剤は、GnRH 投与による内因性の LH サージ、または、hCG 投与による外因性の性腺刺激ホルモンサージによる排卵誘発効果により、嚢腫状卵胞の排卵を促して正常な卵巣周期を回帰させる。しかし、GnRH 製剤は、くり返し投与することにより下垂体前葉の GnRH 受容体の脱感作を引き起こし、ひいては LH 分泌反応性が低下する、いわゆる逆説効果 (paradoxical effect) を誘起することが知られている。また、hCG は家畜にとっては異種のペプチドであり、くり返し使用すると抗体が生成され、効果が減弱するなど問題点も多い。本研究では、これらに代わる家畜の卵胞嚢腫の治療法として、視床下部に作用し GnRH 分泌を直接的に刺激するキスペプチンの作用を利用することを想定した。われわれのこれまでの研究成果から、キスペプチンの活性部位は多くの動物種に共通であること、キスペプチンの強力な GnRH 放出効果は末梢投与によっても十分得られることがわかってきた。そこで、本研究課題において作出をめざした *Kiss1* 遺伝子コンディショナルノックアウトによる卵胞嚢腫モデルヤギを利用し、卵胞嚢腫発生機序の基礎的データを集積することにより、これまでにない画期的な薬剤の開発につながる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、脳内において GnRH のサージ状分泌を制御する中心的な神経ペプチドとして注目されているキスペプチンに着目し、キスペプチン神経系の機能不全による卵胞嚢腫モデルヤギをコンディショナルノックアウト技術により作出することを目的とした。また、この動物を用いて、エストロジェンの正のフィードバック作用を仲介する脳

のキスペプチン神経系の機能不全が卵胞嚢腫の発生機序であることを明らかにするとともに、家畜の卵胞嚢腫の有効な治療法に資する基礎データを集積することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、GnRH/LH のサージ状分泌を制御する神経ペプチドとして注目されているキスペプチンに着目し、「エストロジェンの正のフィードバック作用を仲介するキスペプチン神経系の機能不全が家畜の卵胞嚢腫の発生機序である」ことの解明を最終的な目的とした。そのため、以下の二つの実験を実施した。

(1) 脳領域特異的なキスペプチン遺伝子 (*KISS1*) 改変動物の作出に向けた基盤的知見を集積するため、ヤギ *KISS1* プロモーター領域を同定することを目的として、ゲノムウォーキング法によりヤギ *KISS1* のゲノム構造を明らかにすることを試みた。雌シバヤギから血液を採取し、抽出したゲノム DNA 試料を制限酵素で切断後、アダプター配列を結合させた。これを鋳型とし、アダプター配列および一部既知のヤギ *KISS1* 配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた産物のシーケンス解析を実施した。

(2) 性腺を除去した雌雄の成熟シバヤギを用いて、高濃度のエストロジェンを 16 時間連続的に投与し、LH 分泌におよぼす影響および視床下部のキスペプチンニューロン活性におよぼす効果を検討した。実験には去勢オスおよび卵巣除去メスシバヤギを供試した。ペリスタルティックポンプを用いて、頸静脈に留置したカニキュレを通じて生理食塩水 (10 ml/h) またはエストラジオール (E2) (6 µg/10 ml/h) を 16 時間にわたり持続的に静脈内に投与した。投与開始の 4 時間前から 50 時間後まで 2 時間おきに頸静脈留置カニキュレを通じて採血を行い、血中 LH 濃度におよぼす影響を調べた。血漿中の LH 濃度はラジオイムノアッセイにより測定した。また、E2 または生理食塩水を同様に持続的に投与し、投与開始の 16 時間後に 4%パラホルムアルデヒドを含む固定液で灌流固定して脳を取り出し、視床下部における *Kiss1* mRNA 発現を *in situ* hybridization 法により調べた。さらに、細胞活性の指標となる c-Fos タンパク発現解析のため、免疫組織化学法による二重染色により、*KISS1* 陽性細胞の活性を検討した。

4. 研究成果

(1) ゲノムウォーキング法によりヤギ *KISS1* 上流域を解析し、推定翻訳開始点の約 3 kb 上流までの塩基配列を取得した。現在、さらに上流域の配列を取得するため、解析を続けている。今後、この情報に基づき、ルシフェラーゼアッセイによりヤギ *KISS1* プロモーター領域と *KISS1* 遺伝子転写調節因子の同定を

行う予定である。ヤギ *KISS1* のゲノム構造およびプロモーター領域の情報は、脳領域特異的な *KISS1* 遺伝子改変ヤギの作出に活用できる。また、近年公開されたヤギゲノムデータベース (<http://goat.kiz.ac.cn/GGD/>) により他動物種との相同性についても検討する予定である。本実験により、*KISS1* 遺伝子改変ヤギ作出に活用するための必要最低限の情報を得ることができた。

(2) 去勢オスにおいて、E2 投与群 (n=4) のうち3個体では明瞭な LH サージが観察され、1個体において振幅の小さい LH 濃度亢進がみられた (図 1)。卵巢除去メスの E2 投与群では、すべての個体で明瞭な LH サージが観察された (図 1)。雌雄ともに、対照群では LH 濃度に変化がなかった。E2 または生理食塩水の投与開始から投与開始 32 時間後までの曲線下面積を比較すると、雌雄ともに E2 投与群は対照群を有意に上回り (P<0.05)、高濃度エストロジェン投与により LH サージが誘起されることが明らかとなった。次に、LH サージの各パラメーターを指標として、ヤギにおけるエストロジェン応答性 LH 分泌反応の雌雄差を検討した。高濃度エストロジェンにより誘起される LH サージのピーク濃度はメスに比しオスで低く、ピーク時間はメスに比しオスで遅かったことから (図 1)、LH サージ中枢には雌雄による機能差があることが明らかとなった。また、視索前野キスペプチンニューロンにおける c-Fos 共発現率が、高濃度エストロジェン投与により雌雄ともに有意 (P<0.05) に増加した (図 2)。一方、弓状核キスペプチンニューロンにおける c-Fos 発現は、雌雄ともにほとんどみられなかった。この結果は、視索前野のキスペプチンニューロンが高濃度エストロジェンの正のフィードバック作用を仲介し、GnRH/LH サージ発生機構に関与することを示唆している。以上本実験により、視索前野特異的な *KISS1* 遺伝子改変ヤギが作出できたときの *in vivo* 表現型解析系が確立できた。

(3) 研究期間全体を通じ、脳領域特異的な *KISS1* 改変動物の作出には至らなかったが、その基盤的知見としてヤギ *KISS1* 遺伝子のゲノム構造を明らかにできた。さらに、性腺除去した雌雄ヤギを用いて、高濃度エストロジェンの持続的投与により雌雄ともに LH サージが誘起され、このとき視索前野キスペプチンニューロンが活性化していることを明らかにした。この結果は、視索前野のキスペプチンニューロンがエストロジェンの正のフィードバック作用を仲介し、GnRH/LH サージ発生機構に関与することを示唆している。また、本研究により、高濃度エストロジェン投与により誘起される LH サージのパラメーターを指標とした解析から、GnRH/LH サージ発生機構には雌雄による機能差が存在することが明らかとなったことから、雄ヤギのエストロジェン応答性 LH 分泌反応が、雌の卵巣腫瘍モデルとして活用できる可能性を示す

ことができた。すなわち、視索前野のキスペプチン神経系の機能低下が家畜の卵巣腫瘍の発生機序であることが示唆された。

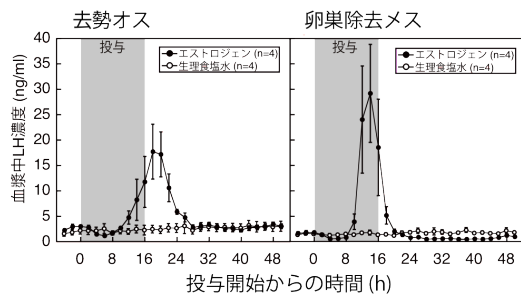


図 1. 高濃度エストロジェン投与が去勢オスヤギおよび卵巢除去メスヤギの LH 分泌におよぼす効果。エストロジェンは網掛けの時間帯 (16 時間) に静脈内に投与した。

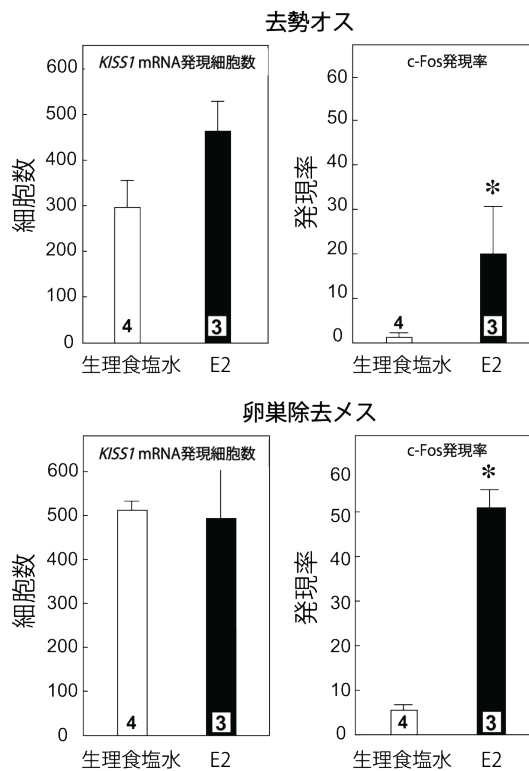


図 2. 高濃度エストロジェン投与が去勢オスヤギおよび卵巢除去メスヤギの視索前野キスペプチンニューロン活性におよぼす効果。

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10件)

Suetomi, Y., Matsuda, F., Uenoyama, Y., Maeda, K.-I., Tsukamura, H. and Ohkura, S. (2013). Molecular cloning and identification of transcriptional regulatory domain of the goat neurokinin B gene TAC3. *Journal of Reproduction and Development* 59,

463-469. 査読有
DOI:10.1262/jrd.2013-037
Naniwa, Y., Nakatsukasa, K., Setsuda, S., Oishi, S., Fujii, N., Matsuda, F., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I. and Ohkura, S. (2013). Effects of full-length kisspeptin administration on follicular development in Japanese Black beef cows. *Journal of Reproduction and Development* 59, 588-594. 査読有
DOI:10.1262/jrd.2013-064
Tanaka, T., Ohkura, S., Wakabayashi, Y., Kuroiwa, T., Nagai, K., Endo, N., Tanaka, A., Matsui, H., Kusaka, M. and Okamura, H. (2013). Differential effects of continuous exposure to the investigational metastin/kisspeptin analog TAK-683 on pulsatile and surge mode secretion of luteinizing hormone in ovariectomized goats. *Journal of Reproduction and Development* 59, 563-568. 査読有
DOI:10.1262/jrd.2013-060
Tanaka, T., Ohkura, S., Wakabayashi, Y. and Okamura, H. (2012). Effect of peripherally administered kisspeptin-10 on GnRH neurosecretion into the hypophyseal portal circulation in ovariectomized goat does. *Small Ruminant Research* 105, 273-276. 査読有
DOI:10.1016/j.smallrumres.2012.01.007
前多敬一郎・大蔵 聡・松田二子・難波陽介・若林嘉浩・岡村裕昭・井上直子・上野山賀久・束村博子 (2012). 繁殖障害の根本治療に向けての新たな方法論：KNDyニューロンの応用. *家畜診療* 59 (7), 387-393. 査読無
http://www.nosai.or.jp/nosai/modules/pico/index.php?content_id=125&PHPSESSID=3d6e14b3ef9f35ef86e1661902e43e7b

[学会発表](計19件)

Ohkura, S. Estrogen induces surge-like luteinizing hormone secretion in gonadectomized male and female goats: involvement of kisspeptin neurons in the medial preoptic area in both sexes. The 46th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2013年7月24日, Montreal, Canada.
末富祐太. 去勢雄シバヤギ視索前野のキスペプチンニューロンは高濃度エストロジェンにより誘起されるサージLH分泌を仲介する. 日本畜産学会第116回大会, 2013年3月28日, 広島県広島市.
Nakatsukasa, K. Kisspeptin neurons in the medial preoptic area of castrated male goats mediate the surge-like luteinizing hormone secretion induced

by acute elevations in circulating estrogen. The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, 2012年11月7日, Tokyo, Japan.

大蔵 聡. 動物の生殖機能を制御する神経内分泌メカニズム. 第153回日本獣医学会学術集会, 2012年3月27日, 埼玉県さいたま市.

Ohkura, S. Male kisspeptin neuronal network and its interaction with GnRH neurons in goats. The 2nd World Congress on Reproductive Biology, 2011年10月11日, Cairns, Australia.

[図書](計2件)

Okamura, H., Tsukamura, H., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y. and Maeda, K.-I. (2013). Chapter 14: Kisspeptin and GnRH pulse generation. In *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*, pp. 297-324. Eds. A.S. Kauffman and J.T. Smith. Springer, Berlin.

大蔵 聡 (2013). 視床下部および下垂体ホルモン. 「繁殖生物学」, pp. 66-83. 日本繁殖生物学会 編. インターズー, 東京.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~laps/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大蔵 聡 (OHKURA, Satoshi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 20263163

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

古澤 軌 (FURUSAWA, Tadashi)
独立行政法人農業生物資源研究所・動物科学
研究領域・研究員
研究者番号: 00343997

(4) 研究協力者

松田 二子 (MATSUDA, Fuko)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授
研究者番号: 10608855