

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660251

研究課題名(和文) GnRH遺伝子変異マウスを用いた雌性フェロモンの中枢性分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) GnRH signals in female mice induce male sexual behaviors via vomeronasal organs of males

研究代表者

米澤 智洋 (Yonezawa, Tomohrio)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10433715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：GnRHの変異マウスであるhpgマウスの雌にエストロゲン処置し、GnRHアゴニスト(GnRH $\alpha$ )を脳内投与したところ、雄マウスに追尾される回数が増加した。鋤鼻骨切除雄マウスでは変化がなかった。このhpg雌マウスの尿をGC-MS分析したところ特異的なピークが存在した。以上より、GnRH刺激された雌マウスは雄の繁殖行動を鋤鼻気を介して誘発すること、それにはフェロモンが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When GnRH mutant (hpg) female mice were treated with estrogen and intra cerebrum GnRH, they were significantly chased by normal male mice. These changes were not observed in vomeronasal organ-removed male mice. There were several specific peaks in the urea of the estrogen and GnRH treated hpg mice. These findings suggest that female cerebral GnRH stimulates male sexual behaviors via the male vomeronasal organ and it is mediated by some kind of chemical in mice.

研究分野：獣医生理学

キーワード：繁殖行動 GnRH 性フェロモン エストロゲン

#### 1. 研究開始当初の背景

性フェロモンは、性成熟後の雄や、発情した雌から分泌され、異性の発情行動を引き起こしたり、繁殖に関わるホルモン分泌を誘引したりするなど、動物の生殖にとって重要な役割を担っている。近年では、マウス、ブタなどから性フェロモンが単離・同定されるとともに、性フェロモン受容後の神経ネットワークについても精力的に研究されており、性フェロモンのしくみが具体的に明らかにされつつある。

ところが、性フェロモンの同定と性フェロモン受容後の神経メカニズムは精力的に調べられているのに対し、性フェロモンの産生や放出に関するメカニズムは、大変重要な命題であるにもかかわらず、ほとんど研究されていない。おそらくそれは、手技的な問題もさることながら、性ステロイドが末梢に直接的に作用して、フェロモン分泌を促進しているに違いないと、多くの研究者が思い込んでいるからである。

応募者はこれまでに、遺伝子変異によりゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) を産生しないマウスである hypogonadal (hpg) マウスを用いることで、GnRH と性フェロモンの分泌の関係を明らかにしてきた。

#### 2. 研究の目的

そこで本研究では、性フェロモンの中枢性分泌制御機構について解明することを目的とする。具体的には、本現象の詳細な行動解析、GnRH によって分泌促進される性フェロモンの同定、GnRH シグナルの伝達経路の解明、の3つに挑戦する。

#### 3. 研究の方法

実験では、エストロジェン処置をした雌マウスに対する雄マウスの行動を詳細に解析した。具体的には、雄のマウント、イントロミッション、エジャキュレーション、雌のロードシス、これらから求められるロードシス商などを調べた。さらに、攻撃行動、不安行動などの変化についても観察した。これらの行動の変化が、雄マウスの鋤鼻器の切除または副嗅球の切除によって解除されるかを調べ、鋤鼻系を介した行動変化であるか否かを検討した。

また、エストロジェンを処置した野生型の雌マウスに GnRH の拮抗阻害薬を脳室内投与した場合の行動についても観察し、本現象が GnRH による中枢性制御機構によるものであることを確認した。

実験では、GnRH によって分泌促進される性フェロモンの同定を行った。すでに哺乳類においても複数の性フェロモンが同定されている。性フェロモンは、揮発性物質としては尿や臭腺、体毛などに、タンパク質として

は涙腺に含まれることが知られている。そこで、実験に用いた動物の上記部位から分泌物を採取し、GC-MS による解析を行った。GC-MS は連携研究者の協力の下、北里大学に設置されている QP2010 (島津) を用いた。得られたピークのうち、GnRH 刺激時に特異的に観察されるピークを選び、そのマススペクトルを Wiley ライブラリに照会して候補物質を同定した。これを購入もしくは合成し、実際に雄に嗅がせ、行動を確認した。

#### 4. 研究成果

hpg 雌マウスにエストロジェン含有シリコンチューブを1週間留置した後、GnRH アゴニストである酢酸フェリチレリン (GnRHa) または溶媒のみを側脳室に投与した。投与から30分後に正常雄マウスのケージに移し、行動を記録、解析した。GnRHa 投与群は、雄マウスに追尾される回数、マウント回数、ロードシス商のいずれも、対照投与群に比べて高かった。一方、同様の処置を行った hpg 雌マウスを鋤鼻骨を切除した雄マウスのケージに移したときには、追尾行動の変化は認められなかった。

次に、同様の処置を行った hpg 雌マウスから尿を採取し、GC-MS 解析を行ったところ、GnRHa 投与群の尿中には対照群では認められないピークが複数個存在した。このうちの1化合物を野生型の去勢雌マウスの外陰部に塗布し、正常雄マウスのケージに移して行動観察を行ったところ、化合物を塗布した雌マウスに対する雄マウスの追尾行動は、対照群に比べて僅かであるが有意に増加した。

以上の結果から、GnRH 刺激された雌マウスは雄の繁殖行動を誘発すること、この現象は鋤鼻器を介して伝達されることが明らかになった。さらに、雌マウスの尿中に GnRH によって放出が刺激される化合物が存在し、それが雄の追尾行動を増加させることが示唆された。

#### 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 6件)

Murakami K, Yonezawa T, Matsuki N. Synovial fluid total protein concentration as a possible marker for canine idiopathic polyarthritis. J Vet Med Sci. 2016 Jan 1;77(12):1715-7. doi: 10.1292/jvms.15-0263. Epub 2015 Aug 2.

Yonezawa T, Watanabe A, Kurusu S, Kawaminami M. Gonadotropin-releasing hormone is prerequisite for the constitutive expression of pituitary annexin A5. Endocr J. 2015 Dec 27;62(12):1127-32. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0410. Epub

2015 Oct 3.

Yonezawa T, Chen KH, Ghosh MK, Rivera L, Dill R, Ma L, Villa PA, Kawaminami M, Walker AM. Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer. *Cancer Lett.* 2015 366: 84-92. doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.010.

Laoharatchathathanin T, Terashima R, Yonezawa T, Kurusu S, Kawaminami M. Augmentation of Metastin/Kisspeptin mRNA Expression by the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Granulosa Cells of Rats: Implications for Luteinization. *Biol Reprod.* 2015 93(1): 15, 1-9.

Sakai K, Yonezawa T, Yamawaki H, Oyamada T. Alteration of somatostatin receptor 2 expression in canine mammary gland tumor. *J Vet Med Sci.* 2015 77(10): 1319-1322

Tomura S, Uchida M, Yonezawa T, Kobayashi M, Bonkobara M, Arai S, Miyazaki T, Tamahara S, Matsuki N. Molecular Cloning and Gene Expression of Canine Apoptosis Inhibitor of Macrophage. *J Vet Med Sci.* 2014 Dec;76(12):1641-5

[学会発表](計 22件)

1. 内田萌菜、酒居幸生、米澤智洋、汾陽光盛 イヌ乳腺腫瘍におけるアネキシン A5 (Anxa5)の発現 第1回日本アネキシン研究会 東京大学 文京区 東京都 2015.10.11
2. Mona Uchida, Kosei Sakai, Tomohiro Yonezawa, Mitsumori Kawaminami Down-regulation of Annexin A5 (ANXA5) expression in canine mammary tumor cells and a possibility of therapeutic application of ANXA5 Annexin Conference 2015 Amrath Grand Hotel De L'Empereur Maastricht Nederland 2015.09.08 Young Investigator Award
3. 村上康平、前田真吾、米澤智洋、松木直章 犬の特発性多発性関節炎における滑液中の多形核白血球走化因子に関する検討 第158回日本獣医学会学術集会 北里大学 十和田市 青森県 2015.09.07
4. Mona Uchida, Shintaro Tomura, Kohei Saeki, Shingo Maeda, Satoshi Tamahara, Tomohiro Yonezawa, Naoaki Matsuki Apoptosis inhibitor of macrophage in dog: molecular characterization and inhibitory effect on histiocytic sarcoma cell proliferation in vitro International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 東

京大学 文京区 東京都 2015.07.09

5. 村上康平、前田真吾、米澤智洋、松木直章 犬の特発性多発性関節炎における新規バイオマーカー: Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4の発見 獣医臨床病理学会 2014年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30
6. 前田真吾、米澤智洋、松木直章、大野耕一、内田和幸、辻本元 イヌの炎症性腸疾患および消化管リンパ腫における Foxp3陽性 regulatory T cellの免疫組織化学的検討 獣医臨床病理学会 2015年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30
7. 内田萌菜、米澤智洋、佐伯巨平、盆子原誠、前田真吾、松木直章 Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)がイヌ組織球性肉腫株化細胞にもたらす影響 獣医臨床病理学会 2015年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30 優秀発表賞
8. 酒居幸生、米澤智洋、松木直章、山脇英之、小山田敏文 イヌの乳腺腫瘍におけるソマトスタチン受容体発現の変化 獣医臨床病理学会 2016年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30
9. 村上康平、米澤智洋、松木直章 特発性多発性関節炎の犬のプレドニゾン治療に伴う滑液蛋白濃度の変化 第11回日本獣医内科学アカデミー学術大会 パシフィコ横浜 横浜市 神奈川県 2015.02.20 JCVIM Award
10. 加藤大貴、高橋雅、米澤智洋、金本英之、福島建次郎、藤野泰人、大野耕一、松木直章、辻本元 犬におけるベッドサイド測定機器による TAT 測定の有用性の基礎検討 第11回日本獣医内科学アカデミー学術大会 パシフィコ横浜 横浜市 神奈川県 2015.02.20
11. 村上康平、米澤智洋、松木直章 犬の特発性多発性関節炎における血漿中 C3-IgG複合体の検出 第157回日本獣医学会学術集会 北海道大学 札幌市 北海道 2014.09.09
12. 米澤智洋、一瀬龍太郎、大畑素子、小玉大空、久留主志朗、汾陽光盛 GnRH 刺激された雌マウスは鋤鼻器を介した雄の繁殖行動を誘発する 第107回日本繁殖生物学会大会 帯広大学 帯広市 北海道 2014.08.21
13. 米澤智洋、武藤顕一郎、進藤順治、久留主志朗、汾陽光盛 マウス間脳視床下部におけるアネキシン A5の発現分布とうつ・不安行動への関与 第29回日本下垂体研究会 八王子セミナーハウス 八王子市 東京都 2014.08.08
14. Yuka Otaki, Tomohiro Yonezawa, Mona Uchida, Kohei Sato, Atusi Yamazaki Presence of contagious yawning in sheep 第74回日本動物心理学会大会 犬山国際

- 観光センター フロイデ 犬山市 愛知県  
2014.07.19
15. Tomohiro Yonezawa, Sora Kodama, Ryutaro Ichinose, Motoko Ohata, Shiro Kurusu and Mitsumori Kawaminami Effects of gonadotropin releasing hormone on courtship behavior and chemoattractants release into the urine of female mice The Endocrine Society's 96th Annual Meeting McCormick Place West Chicago IL, USA 2014.06.21
  16. 戸村慎太郎, 内田萌菜, 米澤智洋, 盆子原誠, 新井郷子, 宮崎徹, 玉原智史, 松木直章 イヌ Apoptosis inhibitor of macrophage の配列決定と各組織における遺伝子発現 獣医臨床病理学会 2014 年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2014.05.31 優秀発表賞
  17. 佐藤康平, 内田萌菜, 山崎 淳, 米澤智洋 ヒツジにおけるあくびと反芻の伝染 日本家畜管理学会・応用動物行動学会 2014 年度春季合同研究発表会 文部科学省研究交流センター つくば市 茨城県 2014.03.25
  18. 白坂美貴, 戸田素弘, 増田加奈子, 治田 悟, 寺島涼太, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 妊娠ラットの生殖組織における Autotaxin の発現と活性 第 156 回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 岐阜市 岐阜県 2013.09.20
  19. 空 純子, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 去勢後のラット前立腺退縮に伴うマスト細胞の浸潤と GnRH-アネキシン A5 系の変化 第 156 回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 岐阜市 岐阜県 2013.09.20
  20. 米澤智洋, Kuan-Hui Chen, Mrinal Ghosh, Lorena Rivera, David Duong, 汾陽光盛, Ameae M Walker プロラクチン受容体ロングフォームの発現抑制による乳腺腫瘍の治療 第 156 回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 岐阜市 岐阜県 2013.09.20
  21. 小野寺桃子, 水品智菜, 尾崎 優, 武藤頭一郎, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 アネキシン A5 ノックアウトマウスの黄体形成ホルモン(LH)分泌 第 156 回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 岐阜市 岐阜県 2013.09.20
  22. 汾陽光盛, 中村祐希, 米澤智洋, 久留主志朗 ラット発情前期の黄体形成ホルモン(LH)サージに伴う下垂体前葉でのアネキシンA5の変化 第 156 回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 岐阜市 岐阜県 2013.09.20
- [図書](計 9 件)  
米澤智洋 病院に勤めはじめた生理学者の神経・筋肉 CLINIC NOTE 2015 127 70-75 Inter Zoo  
米澤智洋 病院に勤めはじめた生理学者の代謝 CLINIC NOTE 2015 125 76-80 Inter

- Zoo  
米澤智洋 病院に勤めはじめた生理学者の内分泌・筋肉 CLINIC NOTE 2015 123 84 - 90 Inter Zoo  
米澤智洋 病院に勤めはじめた生理学者の眼科 CLINIC NOTE 2015 121 84-90 Inter Zoo  
米澤智洋 病院に勤めはじめた生理学者の泌尿生殖器 CLINIC NOTE 2015 119 Inter Zoo  
米澤智洋 症候シリーズ Vol.5 「発作」高ナトリウム血症、低リン血症 SA Medicine 2015 10 Inter Zoo  
米澤智洋(監訳) イラストレイテッド 獣医代謝・内分泌学(著書) 2015 -- 1-205 Inter Zoo  
米澤智洋、松木直章 症例から学ぶ鑑別診断「嘔吐を呈した症例」 SA Medicine 2014 91 4-10 Inter Zoo  
米澤智洋 陰茎と Os Penis の関係 日本医事新法 2014 4729 57-58 日本医事新報社

[産業財産権]  
出願状況(計 4 件)

名称: Therapeutic agent for tumor derived from immune cells and use thereof  
発明者: Tomohiro Yonezawa, Mona Uchida, Naoaki Matsuki  
権利者: 東京大学  
種類: US Prov Appl  
番号: 62/167,274  
出願年月日: 2015 年 5 月 28 日  
国内外の別: 国外

名称: 抗癌剤及び癌の診断キット  
発明者: 汾陽光盛、米澤智洋  
権利者: 北里大学  
種類: 特願  
番号: 2015-160409  
出願年月日: 2015 年 8 月 17 日  
国内外の別: 国内

名称: Mouse mating inducer, mouse mating promotion method, and rodent trapping method  
発明者: Tomohiro Yonezawa, Motoko Ohata  
権利者: Kitasato University  
種類: PCT  
番号: WO2013051562 A1  
取得年月日: 2013 年 4 月 11 日  
国内外の別: 国外

名称: Splice modulating oligonucleoties that inhibit cancer  
発明者: Ameae Walker, Mrinal Ghosh, Kuan-Hui Chen, Tomohiro Yonezawa  
権利者: University of California, Riverside  
種類: PCT、WO

番号 US2013/070445、WO/2014/078749  
取得年月日：2012 年 11 月 16 日、2014 年 5  
月 22 日

取得状況（計 3 件）

名称：骨成長に対するエストロゲン作用の判  
定

発明者：米澤智洋、武藤顕一郎

権利者：北里大学

種類：特許

番号：第 5229093 号

取得年月日：2013 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

名称：子豚の唾液採取方法及び唾液採取器具

発明者：米澤智洋、入交眞巳、高橋あさひ

権利者：北里大学

種類：特許

番号：第 5547676 号

取得年月日：2014 年 5 月 23 日

国内外の別：国内

名称：マウスの交配誘引剤、マウスの交配促  
進方法およびネズミ類の捕獲方法

発明者：米澤智洋、大畑素子

権利者：北里大学

種類：特許

番号：第 5757543 号

取得年月日：2015 年 6 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/vcpb/yonezawa.html>

<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/physiology/YoneBranch/0.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米澤智洋 (YONEZAWA, Tomohiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10433715

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

大畑素子 (OHATA, Motoko)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：60453510