

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850168

研究課題名(和文)反芻家畜の繁殖中枢を制御する神経ペプチド 受容体システムの解明

研究課題名(英文) Analysis of neuropeptide-receptor signalings that control reproductive nerve center in domestic ruminants

研究代表者

松田 二子 (Matsuda, Fuko)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：10608855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はウシのモデル動物であるシバヤギを用いて、KNDyニューロンによる繁殖中枢制御機構を細胞レベルで解明することを目的とした。KNDyニューロンが分泌する神経ペプチド ダイノルフィンの受容体のヤギ視床下部における局在を明らかにし、家畜における繁殖中枢制御神経回路の解明につながる結果を得た。さらにヤギKNDyニューロン由来の不死化細胞株の樹立に成功した。本研究成果は畜産物・農産物の生産性向上につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the neuroendocrine mechanisms that control the reproductive function at cellular level using goats, a good model for ruminants. We focused on KNDy neurons located in hypothalamus, which is thought to be the master regulator of reproductive function and known to secrete 3 neuropeptides, kisspeptin, neurokinin B and dynorphin A. First, we determined the localization of dynorphin receptors in goat hypothalamus. Next, we established an immortalized cell line derived from a goat KNDy neuron. The cell line will be useful to analyze how KNDy neurons are regulated at cellular levels.

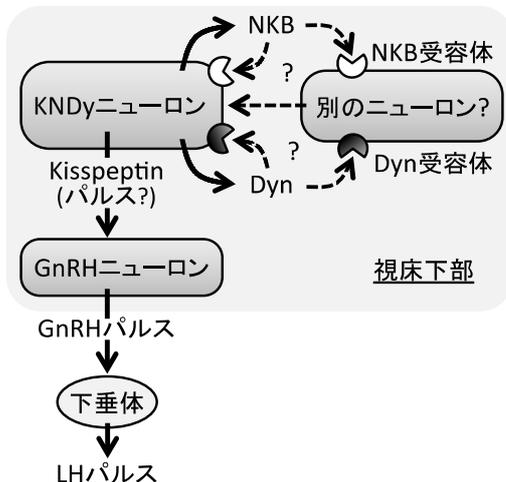
研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ヤギ 視床下部 不死化神経細胞株 KNDyニューロン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の卵巣における卵胞発育と排卵は、視床下部と下垂体が分泌するホルモンによって制御されている。すなわち、視床下部が分泌した性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-Releasing Hormone; GnRH) が下垂体の黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) 分泌を刺激し、これらが卵巣での卵胞発育と排卵を促す。50 年以上に渡り GnRH が繁殖制御の最上位中枢であるとされてきたが、2000 年代に入り、GnRH 分泌をさらに上位で制御する神経ペプチド・キスペプチン (Kisspeptin) が発見された。Kisspeptin は GnRH ニューロンに作用して GnRH を分泌させるシグナルであることが、ウシ・ヤギなどの反芻家畜を含む様々な動物種で明らかになっている。Kisspeptin ニューロンは視床下部のふたつの領域 (反芻動物では視索前野と弓状核) に存在し、弓状核 Kisspeptin ニューロンは GnRH および LH のパルス状分泌を発生させて卵胞発育を促進することがわかってきた。

近年、弓状核 Kisspeptin ニューロンが、神経ペプチド・ニューロキニン B (NKB) とダイノルフィン A (Dyn) を産生することが発見され、KNDy ニューロンと呼ばれるようになった。当研究グループは、KNDy ニューロン局在部位の神経活動と LH パルスが完全に同期していることをヤギを用いて発見した。すなわち、視床下部に存在する“KNDy ニューロン”が哺乳類の繁殖機能を最も上位で制御する中枢 (繁殖中枢) であると考えられる。当研究グループはさらに、ヤギ脳室内への NKB、NKB アゴニスト、Dyn、Dyn アンタゴニストの投与により、NKB は GnRH/LH パルス状分泌を促進し、反対に Dyn は GnRH/LH パルスを抑制することを見いだした。以上の *in vivo* での研究結果は、KNDy ニューロンのパルス状の発火が GnRH/LH パルスを作り出していること、さらに KNDy ニューロンによる GnRH/LH パルス形成に NKB-NKB 受容体および Dyn-Dyn 受容体シグナルが関与することを示唆している (図 1)。



【図 1】 KNDy ニューロンの制御機構

2. 研究の目的

近年、繁殖中枢を制御する因子として 2 つの神経ペプチド (NKB と Dyn) が報告されたが、Dyn 受容体の局在と作用メカニズムは未だ不明である。本研究はウシのモデル動物であるシバヤギを用いて、(1) Dyn 受容体の局在を明らかにすること、さらに (2) KNDy ニューロン不死化細胞株を樹立して繁殖中枢制御機構を細胞レベルで解明することを目的とした。

(1) シバヤギ視床下部における Dyn 受容体の発現解析

実際に *in vivo* において NKB 受容体・Dyn 受容体が KNDy ニューロンで発現するのか、あるいはそれ以外のニューロンで発現するのかは、反芻家畜ではもちろん、マウス・ラット等の実験動物でも明確になっていない。本研究では、シバヤギの視床下部における Dyn 受容体の局在を明らかにすることで、反芻家畜における繁殖中枢の制御メカニズム解明につながる知見を得ることを目的とした。

(2) ヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株の樹立と、繁殖中枢制御機構の *in vitro* 解析

具体的にどのようなメカニズムで KNDy ニューロンのパルス状の発火が引き起こされるかを解明するためには、適切な細胞を用いた *in vitro* の解析が必須である。申請者らは反芻家畜の繁殖中枢の機能を *in vitro* で解析可能な細胞株を樹立する目的で、シバヤギ雌胎子弓状核の初代培養細胞を不死化し、多数の神経細胞クローンを得た。本研究では、これらの細胞株の遺伝子発現を解析し、KNDy ニューロン細胞株の同定を試みた。さらに、特定した KNDy ニューロン不死化細胞株を用いて反芻家畜の繁殖中枢制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

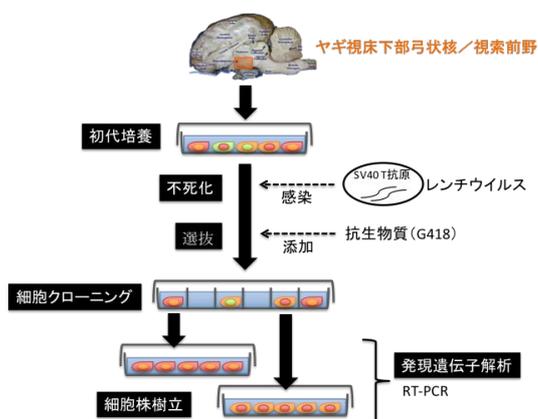
(1) シバヤギ視床下部における Dyn 受容体の発現解析

卵巣除去した成熟雌シバヤギに性ステロイドホルモン (エストロゲン) を処置し、卵胞期の状態を再現した。このヤギの視床下部を採取し、固定・凍結して組織切片を作製した。*In situ hybridization* 法により Dyn 受容体 mRNA が局在する細胞を検出した。また、キスペプチンニューロンに Dyn 受容体が局在するかを調べるため、免疫組織化学によって可視化したキスペプチンニューロンをレーザーマイクロダイセクション法を用いて切り出し、Dyn 受容体の遺伝子発現の解析を試みた。

(2) ヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株の樹立と、繁殖中枢制御機構の *in vitro* 解析

申請者らがこれまでに得ているシバヤギ視床下部神経由来細胞株について (図 2) Kisspeptin、NKB、Dyn、NKB 受容体、Dyn 受容体、エストロゲン受容体の遺伝子発現を確認した。遺伝子発現解析の結果から、KNDy

ニューロン由来の細胞株を特定した。この KNDy ニューロン不死化細胞株を用いて、繁殖中枢の詳細な制御機構を解析した。



【図2】ヤギ視床下部由来細胞株の樹立方法。ヤギ胎子視床下部の初代培養細胞に SV40 T 抗原遺伝子を導入して不死化した。得られた細胞集団の細胞クローニングを実施し、各細胞クローンの cDNA を用いて、RT-PCR により遺伝子発現解析を実施した。神経細胞マーカー、グリア細胞マーカー、KNDy ニューロンで発現する種々の神経ペプチドおよび受容体の発現を解析し、KNDy ニューロン由来の不死化神経細胞株を特定した。

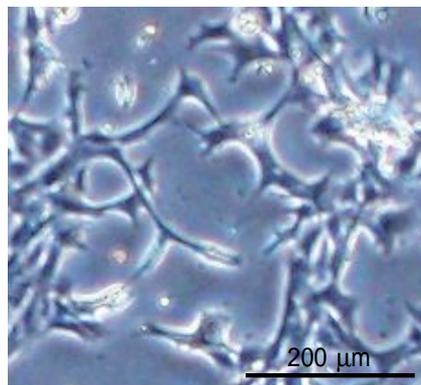
4. 研究成果

Dyn 受容体の *in situ* hybridization の結果、成熟雌シバヤギの視床下部において弓上核、室房核、腹内側核に明瞭なシグナルが得られ、ヤギ視床下部における Dyn 受容体の局在を明らかにできた。

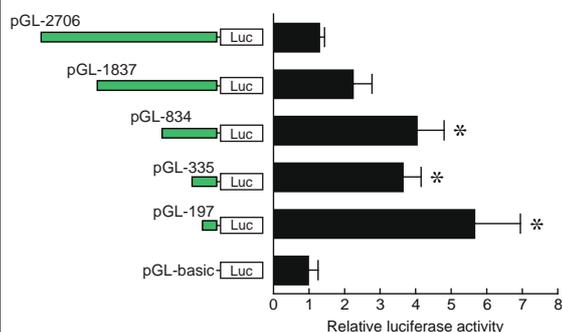
ヤギ視床下部弓上核のキスペプチンニューロンを免疫組織化学にて可視化し、レーザーマイクロダイセクションにてキスペプチンニューロンを切り出すことに成功した。しかし、切り出した細胞からは微量の RNA しか抽出できなかったため、今後、組織の固定方法を始めとする種々の条件検討を行う必要がある。

ヤギ視床下部神経由来細胞株のうち、KNDy ニューロン細胞株 (GA28) を特定した (図3)。この細胞株は KNDy ニューロンが発現する遺伝子群 (キスペプチン遺伝子、NKB 遺伝子、Dyn 遺伝子、エストロゲン受容体遺伝子、NKB 受容体遺伝子、Dyn 受容体遺伝子) を全て発現しており、KNDy ニューロン由来の細胞株であることが強く示唆された。この細胞株も含めて「家畜視床下部繁殖中枢由来不死化神経細胞株」の名称で特許出願を完了した。GA28 を用い、KNDy ニューロンの繁殖中枢の詳細な制御機構の解析を開始した。NKB 遺伝子の転写制御領域をルシフェラーゼアッセイ法により解析し、転写活性化領域が転写開始点の近傍に存在することを明らかにした (図4)。この細胞株を用いて様々な解析を行うことが今後可能であり、家畜の繁殖中枢制御機構の解明が飛躍的に進むと期待さ

れる。



【図3】ヤギ KNDy ニューロン細胞株 GA28 を光学顕微鏡下で観察した写真。



【図4】ヤギ KNDy ニューロン細胞株 GA28 を用いた NKB 遺伝子 (*TAC3*) の転写制御機構の解析。NKB 遺伝子の 5' 上流域をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) につなげたコンストラクトを GA28 に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を指標として、転写活性を測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Misu R, Oishi S, Yamada A, Yamamura T, Matsuda F, Yamamoto K, Noguchi T, Ohno H, Okamura H, Ohkura S, Fujii N. Development of novel neurokinin 3 receptor (NK3R) selective agonists with resistance to proteolytic degradation. *J Med Chem.* 2014;57:8646-51. (査読有り)

Matsuda F, Nakatsukasa K, Suetomi Y, Naniwa Y, Ito D, Inoue N, Wakabayashi Y, Okamura H, Maeda KI, Uenoyama Y, Tsukamura H, Ohkura S. The luteinising hormone surge-generating system is functional in male goats as in females: involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. *J Neuroendocrinol.* 2015;27:57-65. (査読有り)

Misu R, Yamamoto K, Yamada A, Noguchi T, Ohno H, Yamamura T, Okamura H, Matsuda F, Ohkura S, Oishi S, Fujii N.

Structure-activity relationship study on senktide for development of novel potent neurokinin-3 receptor selective agonists. *MedChemComm* 2015;6:469-76. (査読有り)

Uenoyama Y, Tomikawa J, Inoue N, Goto T, Minabe S, Ieda N, Nakamura S, Watanabe Y, Ikegami K, Matsuda F, Ohkura S, Maeda KI, Tsukamura H. Molecular and Epigenetic Mechanism Regulating Hypothalamic Kiss1 Gene Expression in Mammals. *Neuroendocrinology* (in press) (査読有り)

〔学会発表〕(計9件)

加藤雅大、末富祐太、伊藤太祐、佐々木拓弥、難波陽介、三須良介、大石真也、藤井信孝、松田二子、大蔵聡。ニューロキニンB作動薬の末梢投与は黒毛和種雌ウシの黄体形成ホルモン分泌および卵胞発育を促進する。第107回日本繁殖生物学会大会、2014年8月、帯広

奥田雄大、松田二子、末富祐太、小林憲太、大蔵聡。アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いたシバヤギ視床下部への遺伝子導入法の検討。第107回日本繁殖生物学会大会、2014年8月、帯広

Suetomi Y, Kato M, Matsuyama S, Kimura K, Tsukamura H, Ohkura S, Matsuda F. Establishment of immortalized neuronal cell lines derived from domestic ruminant hypothalamus. 9th International Ruminant Reproduction Symposium, 2014年8月、帯広

Suetomi Y, Tsukamura H, Ohkura S, Matsuda F. Establishment of immortalized neuronal cell lines derived from goat hypothalamus. World Congress of Reproductive Biology 2014, 2014年9月、エジンバラ、イギリス

舘林亮輝、佐久間哲史、山本卓、大蔵聡、松田二子。TALENを用いたシバヤギ体細胞の遺伝子改変。第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月、宮崎

末富祐太、奥田雄大、小林憲太、大蔵聡、松田二子。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いたヤギ神経細胞への遺伝子導入法の検討。第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月、宮崎

Suetomi Y, Matsuda F, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H, Ohkura S. Molecular Cloning and Identification of the Transcriptional Regulatory Domain of the Goat Neurokinin B Gene *TAC3*. International Conference on Biology and Pathology and Pathology of Reproduction in Domestic Animals, Gdansk, Poland, 2015年9月

尾崎理穂、末富祐太、松山秀一、木村康二、大蔵聡、松田二子。ウシ GnRH ニューロン不死化細胞株の樹立。日本畜産学会第121回大会、2016年3月、東京

Suetomi Y, Tatebayashi R, Tsukamura H, Ohkura S, Matsuda F. Establishment of a

neuronal cell line derived from KNDy neuron in a goat. The 49th Society for the Study of Reproduction Annual Meeting, 2016年7月、サンディエゴ、アメリカ合衆国

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：家畜視床下部繁殖中枢由来不死化神経細胞株

発明者：松田二子、大蔵聡

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2015-243719

出願年月日：2015年12月15日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし