

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	Laoharatchatathanin Titaree (4DV10005 獣医生理学)
学位論文題目	Expression of Gonadotropin releasing hormone (GnRH), metastin and related peptides in the ovary: dynamic changes and their regulation during estrous cycle of rats
担当者	主査 北里大学教授 汾陽 光盛 副査 北里大学教授 渡辺 清隆 副査 北里大学教授 佐々田 比呂志 副査 北里大学准教授 伊藤 道彦

論文審査の要旨 (3,000字以内)

雌性動物の生殖周期は、様々な生殖ホルモンによって引き起こされる周期的現象の連鎖と言える。様々なホルモンの中でも性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、内分泌系の最上位に位置することから、生殖のマスターホルモンとも呼ばれる。GnRH は下垂体に作用してゴナドトロピン分泌を刺激し、ゴナドトロピンは性腺に作用して配偶子の発育、排卵、各種ホルモンの分泌を調節する。興味深いことに、GnRH は卵巣や精巣を始めとする末梢組織にも発現しているが、その合成調節や機能はほとんど分かっていない。本研究では、卵巣の GnRH 産生とその調節機序について、及び視床下部

で GnRH 分泌に関与するメタスチン（キスペプチン）を始めとする各種関連ペプチドについて、卵巣での発現とその調節機序を明らかにしたもので、その成果は、以下のように要約される。

まず卵巣の GnRH 合成活性の性周期中の変動が経時的に測定された。ラットから各時刻に卵巣を摘出し、RNA を抽出後にリアルタイム RT-PCR 法で GnRH mRNA 量が測定された。ラットの性周期は、2 日間続く発情休止期と発情前期、発情期の 4 日からなるが、GnRH mRNA 発現は、周期中に大きく変動し、発情休止期 2 日目の 20 時と発情前期 20 時にピークを示した。この上昇は性周期特異的で、排卵後の経過時間が同じでも妊娠の成立した場合には観察されなくなる。卵巣内でどの区分（卵胞、黄体、間質）が GnRH 生産に関わるかを明らかにするために、レーザーキャプチャー・マイクロダイセクション（LMD）法が用いられた。発情前期の 20 時に卵巣を採取し、LMD で各区分を採取すると、GnRH mRNA は全ての区分で測定され、区分間に有意な差は認められなかった。免疫組織化学法で GnRH の分布を調べると、顆粒層細胞、間質、黄体に認められたが、分布の認められない黄体の存在すること、黄体内でも一部の細胞にのみ染色像が観察されるなど、発現を精妙に調節する機序の存在が推定された。間質組織はびまん性に染色されたが、その中でマスト細胞が濃染された。腹腔洗い液から調整されたマスト細胞とマスト細胞株 P815 を用いて、マスト細胞が GnRH mRNA を発現していることが確かめられた。トルイジンブルーのメタクロマジーを用いて、卵巣中のマスト細胞が染色され、経時的にその数が計数された。マスト細胞は性周期の進行に伴って変動し、GnRH 発現量の推移に類似した増減パターンを示した。また、偽妊娠、妊娠、泌

乳期などの黄体相にはマスト細胞数が減り、これがプロラクチン分泌の増加によることが示唆された。卵巢嚢内に GnRH 作動薬を微量投与すると、卵巢中のマスト細胞が増加したことから、GnRH にはマスト細胞のケモアトラクタントとしての機能もあることが示唆された。更に、腹腔マスト細胞の初代培養で GnRH 作動薬を投与すると、マスト細胞の GnRH 発現の増加することも観察された。これらの結果から、卵巢内マスト細胞は GnRH によって卵巢内に導かれ、更に GnRH 合成を増加させていることが示唆された。遺伝的にマスト細胞を欠く C57BL/6-Wsh/Wsh マウスの性周期の長さに違いは認められなかったが、日齢が進むと共に卵巢中に大きな黄体が認められるようになり、卵巢重量も増加した。以上の結果から、卵巢では性周期の進行に伴い、卵巢外からマスト細胞が組織中に進入して GnRH を付加的に増加させていることが示唆された。

メタスチン(キスペプチン)が卵巢内で合成されていることは、既に報告があるが、その産生調節、産生部位、生理的役割は分かっていない。本研究では、性周期中のメタスチン発現率の詳細な推移と共に産生細胞、関連ペプチドである Neurokinin B (NKB)と dynorphin、メタスチン受容体である GPR54 についても併せて調べられた。卵巢のメタスチンと dynorphin の mRNA 発現は発情前期 20 時に急激に上昇した。NKB mRNA も同時期に増加を開始したが、頂値に達するのは翌午前 2 時まで遅れた。GPR54 mRNA は、メタスチンの上昇に伴って減少した。マウスに hCG を投与すると、メタスチンと dynorphin の発現が用量反動的に促進されたが、NKB は変化無かった。メタスチン発現の変動パターンは GnRH のそれに一致せず、メタスチン作用を持つ Kiss-10 の投与も GnRH 発現に影響

響しなかった。これらの結果から卵巣ではメタスチンは GnRH 発現に関与しないことが示唆された。LMD を用いて、メタスチン mRNA がほとんど卵胞にしか発現していないことが明らかになった。一方、dynorphin と NKB は主に間質組織に発現していること、GPR54 の発現は全てのコンパートメントに見られることが示された。メタスチンの免疫組織化学も行われ、卵胞のメタスチンが卵巣内に広く供給されていることが明らかになった。ラット顆粒層細胞の初代培養系を確立してインビトロ実験も行われた。25 日齢のラットに PMSG が投与され 48 時間後に機械的に顆粒層細胞が分離された。この培養細胞に hCG を投与することでメタスチン、NKB、dynorphin の発現が有意に刺激された。ラット卵巣嚢内にメタスチン拮抗物質である p234 を発情前期から浸透ミニポンプで微量局所投与すると、3 日目に回収した卵巣内で一部黄体の組織像に周辺部の不明瞭になる変化がみられた。初代培養顆粒層細胞で、hCG は用量反応的にプロジェステロン分泌を促進したが、p234 を同時投与するとその促進効果が阻害された。

以上の本研究の結果から、卵巣における GnRH 発現の詳細な変動が始めて明らかにされた。過去の研究報告を考え併せると、2 回の GnRH 発現のピークは、発情休止期 2 日目 20 時の増加が性周期黄体の退行に関連し、発情前期 20 時の増加は卵胞の閉鎖に関与していることが示唆された。本研究では、GnRH の発現変動にマスト細胞の関与することが示唆された。GnRH は化学走性によってマスト細胞を卵巣内に導き、マスト細胞は GnRH 合成を行うことで卵巣 GnRH 発現のピークを作っている可能性が考えられた。メタスチンが LH サージの影響下で顆粒層細胞、dynorphin が間質組織で主に

生産されていることも明らかにされた。視床下部では、NKBを含めた3つのペプチドが同一細胞で合成されていることが示されており、顆粒層細胞でも同様に3つのペプチドが合成されることが示された。本研究では、神経系の伝達物質や修飾物質とされている化学物質が、卵巣にも発現し、視床下部とは異なる機序で発現調節を受け、視床下部で認められている相互作用とは異なる、卵巣に特異的なネットワークを作っていることが示唆された。

以上のごとく、本研究結果は類似する先行研究の無い極めて独創性に富むものである。ティタリー君の研究能力は明らかであり、試問で示された学識の高さも踏まえ、同君を博士（獣医学）の学位に相応しいものと認め、審査員一同は合格と判定した。