

学 位 論 文 要 旨

氏名 Kereilwe Onalenna

題 目 :

Discoveries of anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone receptor type 2 in bovine GnRH neurons and gonadotrophs

(ウシ視床下部とゴナドトロフにおけるアンチミュラーホルモンとアンチミュラーホルモン 2 型受容体の発見)

論文要旨 :

Fertility decreases during aging in human and bovine females, but the exact pathophysiological mechanisms in the pituitaries and hypothalamus are not clarified yet. Anti-Müllerian hormone (AMH) is a glycoprotein that belongs to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily. Plasma AMH concentrations can predict the fertility of adult female goats, ewes, cows, and women via unknown physiological mechanisms. This thesis study attempted to clarify whether AMH, and the main receptor for AMH, AMH receptor type 2 (AMHR2) are expressed in pituitaries and hypothalamus, and whether AMH and AMHR2 have important roles for the age-related infertility.

Preantral and small antral follicles may secrete AMH to control gonadotrophin secretion from ruminant gonadotrophs. In first, I investigated whether AMHR2 is expressed in gonadotrophs of postpubertal heifers to control gonadotrophin secretion. Expression of AMHR2 mRNA was detected in anterior pituitaries (APs) of postpubertal heifers using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). An anti-AMHR2 chicken antibody was developed against the extracellular region near the N-terminus of bovine AMHR2. Western blotting using this antibody detected the expression of AMHR2 protein in APs. Immunofluorescence microscopy using the same antibody visualised colocalisation of AMHR2 with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) receptor on the plasma membrane of gonadotrophs. AP cells were cultured for 3.5 days and then treated with increasing concentrations (0, 1, 10, 100, or 1000 pg mL⁻¹) of AMH. AMH (10–1000 pg mL⁻¹) stimulated ($P < 0.05$) basal FSH secretion. In addition, AMH (100–1000 pg mL⁻¹) weakly stimulated ($P < 0.05$) basal LH secretion. AMH (100–1000 pg mL⁻¹) inhibited GnRH-induced FSH secretion, but not GnRH-induced LH secretion, in AP cells. I also compared expression levels between old Holsteins (79.2 \pm 10.3 months old) and young (25.9 \pm 0.6 months old) and old Japanese Black females (89.7 \pm 20.3 months old), but no significant differences were observed among the groups. Therefore, AMHR2 is expressed in gonadotrophs of postpubertal heifers to control gonadotrophin secretion.

Other important hormones for endocrinological gonadotroph regulation (e.g. GnRH, inhibin and activin) have paracrine and autocrine roles. Therefore, in the next study, I evaluated AMH expression in bovine gonadotroph cells and the relationships between AMH expression in the bovine AP and

oestrous stage, age and breed. AMH mRNA expression was detected in APs of postpubertal heifers (26 months old) by RT-PCR. Based on western blotting using an antibody to mature C-terminal AMH, AMH protein expression was detected in APs. Immunofluorescence microscopy utilising the same antibody indicated that AMH is expressed in gonadotrophs. The expression of AMH mRNA and protein in APs did not differ between oestrous phases ($P > 0.1$). I compared expression levels between old Holsteins (79.2 ± 10.3 months old) and young (25.9 ± 0.6 months old) and old Japanese Black females (89.7 ± 20.3 months old). The APs of old Holsteins exhibited lower AMH mRNA levels ($P < 0.05$), but higher AMH protein levels than those of young Japanese Black females ($P < 0.05$). Therefore, bovine gonadotrophs express AMH and this AMH expression may be breed-dependent.

Circulating concentrations of AMH can indicate fertility in various animals, but the physiological mechanisms underlying the effect of AMH on fertility remain unknown. I recently discovered that AMH has extragonadal functions via its main receptor, AMHR2. Specifically, AMH stimulates the secretion of LH and FSH from bovine gonadotrophs. Moreover, gonadotrophs themselves express AMH to exert paracrine/autocrine functions, and AMH can activate GnRH neurons in mice. The next study aimed to evaluate whether AMH and AMHR2 are detected in areas of the brain relevant to neuroendocrine control of reproduction: the preoptic area (POA), arcuate nucleus (ARC), and median eminence (ME), and in particular within GnRH neurons. RT-PCR detected both AMH and AMHR2 mRNA in tissues containing POA, as well as in those containing both ARC and ME, collected from postpubertal heifers. Western blotting detected AMH and AMHR2 protein in the collected tissues. Triple fluorescence immunohistochemistry revealed that most cell bodies or fibers of GnRH neurons were AMHR2-positive and AMH-positive, although some were negative. Immunohistochemistry revealed that 75% to 85% of cell bodies and fibers of GnRH neurons were positive for both AMH and AMHR2 in the POA, ARC, and both the internal and external zones of the ME. The cell bodies of GnRH neurons were situated around other AMH-positive cell bodies or fibers of GnRH and non-GNRH neurons. Therefore, AMH and AMHR2 are detected in most cell bodies or fibers of GnRH neurons in the POA, ARC, and ME of heifer brains.

Cow fertility decreases with age, but the hypothalamic pathomechanisms are not understood. AMH stimulates GnRH neurons via AMHR2 in rodent, and most GnRH neurons in the POA, ARC, and ME express AMH and AMHR2. Therefore, in my thesis study I hypothesized that both protein amounts would differ in the anterior hypothalamus (including POA) and posterior hypothalamus (including ARC and ME) between young post-pubertal heifers and old cows. Western blot analysis showed lower ($P < 0.05$) expressions of AMH and AMHR2 in the posterior hypothalamus, but not in the anterior hypothalamus, of old Holstein cows and old Japanese Black cows compared to young heifers. Therefore, AMH and AMHR2 were decreased in the posterior hypothalami of old cows, suggesting decreased AMH and AMHR2 in ARC and/or ME.

In conclusion, this thesis study discovered and revealed AMH and AMHR2 expression in gonadotrophs and GnRH neurons, which have important contribution for the age-related infertility.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Kereilwe Onalenna
審査委員	主 査：山口大学・准教授 角川博哉
	副 査：山口大学・教授 高木光博
	副 査：鳥取大学・教授 菱沼 貢
	副 査：山口大学・教授 日下部健
	副 査：山口大学・教授 佐々木直樹
題 目	Discoveries of anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone receptor type 2 in bovine GnRH neurons and gonadotrophs (ウシ視床下部とゴナドトロフにおけるアンチミュラーホルモンとアンチミュラーホルモン 2 型受容体の発見)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>婦人や雌ウシなどでは、加齢に伴い妊孕性が低下し不妊になるが、その発症機構には不明点が多く、特に下垂体前葉や視床下部での病理機構は未解明である。Anti-Müllerian hormone (AMH) は Transforming growth factor (TGF)-β ファミリーに属するタンパクである。メカニズムは不明だが、ウシ、ヤギ、ヒツジ、婦人などでは、血中 AMH 濃度が妊孕性と相関する。そこで本学位論文は、AMH、ならびに、その受容体である AMHR2 が、下垂体前葉や視床下部で発現しているか、また加齢に伴いそれらの発現量に違いが生じるかなどを明らかにすることにした。</p> <p>卵巣の微小卵胞は、AMH を分泌している。そこで下垂体前葉に存在し、LH や FSH といった性機能調節ホルモンを分泌する細胞、ゴナドトロフは AMHR2 を発現しているか調べた。まず RT-PCR 法により、未経産雌牛の下垂体前葉での AMHR2 の mRNA が発現を発見した。次に、AMHR2 の N 末端の細胞外領域に対する独自抗体を作製、利用し、未経産雌牛の下垂体前葉での AMHR2 のタンパクの発現も確認した。さらに同抗体と、抗 GnRH 受容体抗体、ならびに、LH または FSH に対する抗体を用いた多重蛍光免疫染色法を実施し、ゴナドトロフが AMHR2 を発現していることを発見した。</p> <p>ウシ下垂体前葉の初代培養系を用いて、リコンビナント AMH による LH や FSH に対する分泌刺激作用も評価した。その結果、AMH による LH や FSH の基底分泌に対する刺激作用を発見した ($P < 0.05$)。</p> <p>しかし加齢後のホルスタイン種雌ウシ (79.2 \pm 10.3 ヶ月齢)、ならびに若い黒毛和種雌ウシ (25.9 \pm 0.6 months old) と加齢後の黒毛和種雌ウシ (89.7 \pm 20.3 ヶ月齢) の下垂体前葉の AMHR2 の発現量を比較では、群間差は認められなかった。</p> <p>GnRH やインヒビンなどの既知のゴナドトロフ調節ホルモンは、ゴナドトロフ自身が合成、分</p>	

2,000 字以内

泌し、パラクライン・オートクラインの機構で調節することが知られており、離れた場所に位置する臓器が分泌し血流を介して到達、作用する、エンドクライン作用と協調作用を発揮することが重要であることも知られている。そこでゴナドトロフ自身が、AMH を合成しているか、その合成量には、性周期、ならびに、年齢・品種は影響するかを調べた。まず RT-PCR 法や AMH の C 末端に対する抗体を用いて、未経産雌牛の下垂体前葉における AMHR2 の発現を発見した。また多重蛍光免疫染色法を実施し、ゴナドトロフが AMH を発現していることも発見した。発現量には、性周期による差は認められなかった。加齢後のホルスタイン種雌ウシ、ならびに若い黒毛和種雌ウシと加齢後の黒毛和種雌ウシの下垂体前葉を比較したところ、加齢後のホルスタイン種雌ウシでは AMH の mRNA 量は低下していたが ($P < 0.05$)、タンパク量はむしろ多かったことから、加齢による分泌機能の低下が考えられた。

次に、下垂体前葉で受容体が発現しているならば、その上位の調節臓器である視床下部でも AMH や AMHR2 が発現しているという仮説を検証した。視床下部の中で特に、GnRH/LH サージの調節中枢である視索前野、GnRH/LH パルスの調節中枢である弓状核、また下垂体門脈に様々な神経ペプチドを分泌する部位である正中隆起に重点を置いて調べた。これらの部位に対して RT-PCR 法やウエスタンブロット法を用いた結果、両者の発現が認められた。さらに多重蛍光免疫染色により、GnRH ニューロンがこれらを合成していること、さらに下垂体門脈に AMH を分泌していることも発見された。

この発見と同時期に、マウスにおいて AMH は GnRH ニューロンを刺激することが報告された。そこで本学位論文の最後の実験として、ウエスタンブロット法を用いて加齢後のホルスタイン種雌ウシ、ならびに若い黒毛和種雌ウシと加齢後の黒毛和種雌ウシの視床下部での AMH や AMHR2 の発現量を比較した。その結果、弓状核と正中隆起を含む視床下部後方で、若い黒毛和種雌ウシと比較して、加齢後のホルスタイン種雌ウシと加齢後の黒毛和種雌ウシの AMH と AMHR2 の発現量が有意に低下していることを発見した ($P < 0.05$)。

本学位論文の研究により、ウシの下垂体前葉のゴナドトロフ、ならびに、視床下部の GnRH ニューロンで、新規のホルモンである AMH、ならびに、その受容体 AMHR2 が発現していることが発見され、さらに加齢に伴う不妊の発症機構の中で AMH や AMHR2 が重要な役割を担っていることも発見された。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと審査員一同は判定した。