

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05259

研究課題名(和文) アジアゾウにおける精子成熟因子の調査研究

研究課題名(英文) Study of sperm maturation factors on Asian Elephant

研究代表者

佐藤 陽子 (YOKO, SATO)

東海大学・生物学部・教授

研究者番号：50398963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゾウの射出精子の低い運動性は、ゾウの精巣および精巣上体の解剖学的位置が他の哺乳類と異なることによる高温ストレスを原因とする可能性がある。本研究では、ゾウ精子成熟過程で重要な精巣上体試料を用い、精子成熟過程の熱タンパク関連因子と精子成熟関連因子を解析し、これらの因子が他の哺乳類と異なる部位及び強度で発現をしていること、また精巣上体組織培養系を用いて熱ストレスへの反応が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、これまで人工授精が不可能であったゾウから採取した精液でも人工授精が可能となる手法を提供するための基礎条件を検討するもので、今後、希少動物であるゾウの保護技術を確立する上での活用が期待される。さらに、ゾウ以外のヒトを含む他の哺乳動物においても、成熟精子形成能力が低下した希少品種および造精機能障害等の疾患に応用できる技術に繋がると思われる。

研究成果の概要(英文)：Elephant low quality of sperm may be caused by maturation process of epididymis, because the elephant sperm might receive the heat stress much longer than other mammals by their location. Here we investigated the expression of heat shock related molecules in elephant epididymis. HSF1 and HSP70 were quite highly expressed in the elephant epididymis compared to the other mammals, suggesting that there are endogenous heat stresses and heat responses in the epididymis. The localization area of these molecules was also different among elephants and the other animals. The heat shock responses, such as elevation of HSF1 and HSP70 were observed using tissue culture under the experimental heat stress, however, the timing of HSP70 response to the heat was delayed compared to the other animals. Because the regionalized epididymal fluid microenvironments are essential to the sperm maturation, the expression of these molecules by different way may affect the maturation process of elephant sperm.

研究分野：生殖生物学 発生生物学

キーワード：精子成熟 精子形成 熱ストレス ゾウ 停留精巣

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

アジア地域に生息するアジアゾウの推定個体数は約6万6千頭(野生5万頭、飼育1万6千頭)と年間約3%の割合で減少を続けている。特にゾウは他の動物と比較し妊娠期間が約600日と長く、自然状態下の繁殖は5-8年に一回と生涯での繁殖率は他の動物と比較し著しく低い。そのため、個体の保護保全には人工的な手法の補助が必要となってきた。子孫の個体数を増加させる方法として、自然交配または人工授精による方法があるが、人工授精には運動性の良好な精子が必要である。しかし、ゾウの射出精子の運動性は約30%程度と低く、また安定して良好な精子が得られないという大きな問題点がある(Kiso *et al.* Pros One: 2014)。このような背景から自然交配に頼らざるを得ず、ゾウの地理的、生理的不一致等の要因もあり増頭が現在まで大変困難な状態であった。

通常、哺乳動物は精巣および精巣上体は、陰嚢に包まれ体腔外に存在し、精子形成や精子成熟は体温より低い状態で行われる(Chudhury and Steinberger, *Am. J. Anat.*:1964, Kokak *et al.*, *Asian J. Androl.*:2002)。しかし、ゾウでは精子形成を行う精巣が高温の腹腔内で停留している。すなわち他の哺乳動物種と比較して、ゾウの精子形成や精子成熟は極度の熱ストレス下で発生・成熟していることとなる。精巣につながる長いゾウの精巣上体は、精巣と共に熱ストレスを受けており、精子成熟過程が他の多くの哺乳動物と異なる可能性があると考えた。つまりゾウ射出精子の低い運動性には、熱ストレスに関与する因子と精子成熟に関わる因子が関連付けられる可能性がある。しかし、ゾウはゾウがワシントン条約の附属書Iの対象種であることから、科学材料としての国外での研究には制限があり、精子成熟過程の報告がなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、特に精子成熟過程で重要な部位である精巣上体に注目し、①熱ストレス下で精子成熟ができる精巣上体部域(頭部、体部、尾部)ごとの熱ストレス防御機構を明らかにすること、②精子成熟に及ぼす精巣上体由来の発現因子の解析を行い、精巣上体におけるゾウの精子成熟過程の分子機構を明らかにすること、③その結果を他の熱ストレスのない動物種における精子成熟過程の分子機構と比較した上で、ゾウ精巣上体上皮細胞培養系を用い、精子成熟過程に必要な因子を確定し、人工授精の指標となる運動性60%が達成される精子成熟促進培養法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、アジアゾウ(*Elephas maximus*)精子成熟に関して、精子の解析、精巣上体の解析、精子成熟培養系、精子保存方法の4方向から行う。ゾウ試料を用いた研究はタイ王国チュラロンコーン大学獣医学部との共同研究により研究者が現地で共同研究者と共にを行い、試料写真を基に画像解析や統計処理等は日本国内で行った。

### 1) ゾウ精子の解析

射出精子、精巣上体(頭部、体部、尾部)、精巣からの回収した精子について、成熟精子マーカーを確定し、成熟精子及び未成熟精子の割合を調査する。

### 2) ゾウ精巣上体の解析

ゾウ精巣上体(頭部、体部、尾部)、精巣において、精子成熟に関与する因子、熱ショック因子や熱ショックタンパク質などの熱ストレスにより発現変動する因子、それぞれの発現とその相互作用について免疫組織学的に検出し画像解析を行う。さらに、熱ストレスに弱い多くの哺乳動物の典型的なモデルとしてマウス及びブタの精巣と精巣上体を用い、精子

成熟因子の発現レベルを免疫組織学的に検出し比較解析する。

### 3) ゾウ精巣上皮培養系の作成

ゾウ精巣上皮サンプルより、頭部、体部、尾部の三カ所からそれぞれ精巣上皮細胞を単離し、飢餓状態を与えることにより、部域の由来の異なる細胞株を作製する。これらの細胞株を組み合わせ、精子成熟に関わる因子の発現調節を行い、未成熟精子との共培養下で精子成熟培養系の確立を目指す。

### 4) 精子成熟と熱ストレスの影響についての解析

ゾウ精巣上皮の熱ストレスへの応答を確認するため、精巣上皮組織の培養条件を改良し、培養下で熱ストレスを人工的に与えた場合の熱ストレス関連蛋白質の発現状態を免疫組織化学的手法により解析する。

### 5) ゾウ精子の精子凍結方法の検討

人工授精に適応する運動性の高いゾウ精子の保存方法を冷却方法や添加物質の点より検討する。

## 4. 研究成果

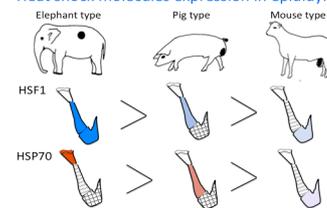
### 1) ゾウ精子の解析

精子自身の成熟度を検討するため、精子膜ラフトドメインの局在の検討を行った。初めに、熱に感受性の高い、マウス、ネコ、イヌの新鮮精子及び凍結精子の未固定及び固定（4%PFA/PBS）標本を用い、ラフトドメインの主構成物 GM1 に結合する Cholera Toxin B subunit (CTB) の生体染色及び、ラフトドメイン構成物の Flottilin に対する抗体を用いた免疫細胞染色を行った。CTB の染色結果から、新鮮精子と固定標本を染色したもの、また新鮮精子を染色後に固定した標本では局在が異なり、固定後の試料ではラフトドメイン内の GM1 の局在を正確に検討できないことが明らかとなった。一方、ゾウ精巣上皮精子では、Flottilin 固定した抗体染色で今迄に報告のあるヒト精子と同様の局在を示したことから、固定標本においてマーカーとして使用できる可能性が示唆された。さらに Flottilin に加え、CD59 もゾウ精巣上皮精子での局在を確認でき、固定標本においてマーカーとして使用できる可能性が示唆された。しかし、ゾウの新鮮な射出精子での解析は十分な試料が得られなかったため、今後の検討課題である。

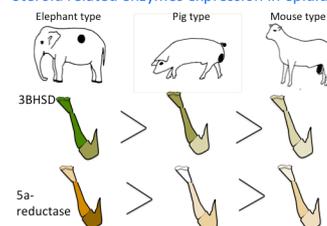
### 2) ゾウ精巣上皮の解析

ゾウ未成熟個体の精巣上皮の頭部、体部、尾部を 4%PFA/PBS で一晩固定し、パラフィンブロックを作成、免疫組織学染色を行った。まず熱ストレスに関与する HSF1、HSP70、HSP90A の発現を検討した。HSF1 は基底細胞では発現せず主細胞では全ての部位において発現していたが、体部、尾部での発現が多く、HSP70 は精巣では発現がみられないが、精巣上皮ではほぼ頭部でのみ両細胞において発現していた。HSP90A は主細胞では発現せず、体部及び尾部の基底細胞の一部で発現していた。また、精子成熟に関わる lactoferrin は頭部の主細胞でのみ発現をしているが、 $\alpha$ -mannosidase は体部よりも頭部の主細胞で多く発現していた。ゾウとブタやマウスの精巣上皮における各分子の発現個所を比較したところ、熱ストレス関連分子 HSF1、HSP70 とホルモン産

Heat shock molecules expression in epididymis



Steroid related enzymes expression in epididymis



生に關与する  $3\beta$ -HSD、 $5\alpha$ -reductase の発現部位や強度が異なる事が明らかとなった。

### 3) ゾウ精巢上体培養系の作成

ゾウ精巢上体サンプルより、頭部、体部、尾部の三カ所からそれぞれ精巢上体上皮細胞を単離し、単離したゾウ精巢上体細胞由来の細胞株作製を試みた。これらの細胞の細胞増殖を促進することは現時点ではできていないが、HDGF の添加により、1ヶ月以上培養することが可能になった。また、精巢上体組織培養系の確立も行った。今後、良好な精子を産生するゾウ精子成熟促進培養系の開発へとつなげていく必要がある。

### 4) 精子成熟と熱ストレスの影響についての解析

ゾウ精巢上体の熱ストレスへの応答を確認するため、精巢上体組織の培養条件を改良し、培養下で熱ストレスを人工的に与えた場合の熱ストレス関連蛋白質の発現状態を免疫組織化学的手法により解析した。HSF1 は、ゾウ精巢組織を培養した場合と同様に熱ストレスを受けてから精巢組織とほぼ同じタイミングで精巢上体組織でも誘導された。またゾウ精巢では発現しない HSP70 は、精巢上体において熱ストレスにより誘導されるものの、その誘導には非常に時間がかかることが明らかとなった。他の精子成熟に關与する因子の発現状態の熱ストレスとの関係については、現在画像解析中であるが、少なくとも、ゾウ精巢上体の細胞は熱ストレスに対し反応を行うが、その反応性は他の動物とは異なることが示唆された。

### 5) 精子凍結方法の検討

ゾウ精子の凍結過程における冷却速度と orvus es paste(OEP)の添加効果を検討した。2頭のアジアゾウから採取した精液を用い、2種類の冷却速度(1°C/min, 0.1°C/min)で室温から5°Cまで冷却し、0.74%OEP添加群及び無添加群の4群で凍結保存し、融解後の精子性状について比較した。その結果、冷却速度及びOEP添加に關係なく、精子の融解後の運動性は低く、特に、他の精子群と比較して、OEP無添加群の0.1°C/minで冷却・凍結保存した精子における生存率は有意に低下した。なお、凍結前の運動性は約64%で、凍結融解後に1-3%に低下することから、例数を増やし、凍結液の改善をすることが必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Y, Kuriwaki R, Hagino S, Shimazaki M, Sambuu R, Hirata M, Tanihara F, Takagi M, Taniguchi M, Otoi T	4. 巻 55
2. 論文標題 Abnormal Functions of Leydig Cells in Crossbred Cattle-Yak Showing Infertility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Domest Anim.	6. 最初と最後の頁 209-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/rda.13609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimazaki M, Urasako S, Tanaka M, Sato Y, Tanihara F, Hirata M, Taniguchi M, Takagi M, Otoi T	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of orvus es paste (OEP) on the viability of bull spermatozoa after double freezing and thawing.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intern J Appl Res Vet Med	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nguyen TV, Tanihara F, Do L, Sato Y, Taniguchi M, Takagi M, Van Nguyen T, Otoi T	4. 巻 52
2. 論文標題 Chlorogenic acid supplementation during in vitro maturation improves maturation, fertilization, and developmental competence of porcine oocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reprod Domest Anim.	6. 最初と最後の頁 969-975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/rda.13005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wayan Kurniani Karja N, Fahrudin M, Setiadi MA, Tumbelaka LI, Sudarwati R, Hastuti YT, Mulia BH, Widiанти A, Sultan K, Terazono T, Namula Z, Taniguchi M, Tanihara F, Takemoto T, Kikuchi K, Sato Y, Otoi T.	4. 巻 37
2. 論文標題 CHARACTERISTICS AND FERTILITY OF SUMATRAN TIGER SPERMATOCYTES CRYOPRESERVED WITH DIFFERENT SUGARS.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cryoletters	6. 最初と最後の頁 264-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） ISSN 0143-2044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimazaki M, Sambuu R, Sato Y, Kim Do LT, Tanihara F, Taniguchi M, Otoi T.	4. 巻 36
2. 論文標題 EFFECTS OF ORVUS ES PASTE ON THE MOTILITY AND VIABILITY OF YAK (BOS GRUNNIENS) EPIDIDYMAL AND EJACULATED SPERMATOZOA AFTER FREEZING AND THAWING.	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Cryo Letters.	6. 最初と最後の頁 264-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Do LT, Luu VV, Morita Y, Taniguchi M, Nii M, Peter AT, Otoi T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes.	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 86-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1016/j.repbio.2015.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 佐藤陽子
2. 発表標題 哺乳類停留精巢における精子形成と精子成熟
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤陽子
2. 発表標題 熱ストレスと造精機能障害について考える
3. 学会等名 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第11回学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Sato, T. Tharasanit, N. Tiptanavattana, A. Sudsukh, P. Phakdeedindan, C. Songird, C. Thitaram, S. Mahasawangkul, M. Taniguchi, T. Otoi, M. Techakumphu.
2. 発表標題 HSP90A may control spermatogenesis of Asian elephant ( <i>Elephas maximus</i> ) cryptorchid testes
3. 学会等名 The 13th international symposium on Spermatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A. Sudsukh, Y Sato, T Tharasanit
2. 発表標題 CDC25A expression on the immunolocalization of Asian Elephant ( <i>Elephas maximus</i> ) testis.
3. 学会等名 Annual meeting of Chulalongkorn University Veterinary Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤陽子
2. 発表標題 熱ストレスと造精機能について考える
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第36回学術大会/第25回精子形成・精巣毒性研究会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato Y, Tharasanit T, Tiptanavattana N, Phakdeedindan P, Thitaram C, Songird C, Mahasawangkul S, Thongtip N, Taniguchi M, Otoi T, Techakumphu M.
2. 発表標題 Unique expression of heat shock related molecules may control the spermatogenesis in Asian elephant ( <i>Elephas maximus</i> ) cryptorchid testes
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuriwaki R, Sato Y, Hagino S, Shimazaki M, Samboo R, Do LTK, Tanihara F, Takagi M, Taniguchi M, Otoi T.
2. 発表標題 Evaluation of the Leydig cell function on crossbreeding yak showing infertility.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato Y, Tharasanit T, Tiptanavattana N, Thitaram C, Songird C, Mahasawangkul S, Thongtip N, Taniguchi M, Otoi T, Techakumphu M.
2. 発表標題 Unique expression patterns of heat shock related molecules in elephant testis and epididymis compared to those in other animal organs showing weak heat tolerance.
3. 学会等名 The 3rd seminar of priority universities for cooperation in Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Sato Y., Tharasanit T., Tiptanavattana N, Somgrid C, Thitaram C, Mahasawangkul S, Taniguchi M, Otoi T, Techakumphu M.
2. 発表標題 Molecular analysis of testicular cells in Asian elephant ( <i>Elephas maximus</i> ) cryptorchid testis.
3. 学会等名 The 2nd Seminar of Priority University for Cooperation in Thailand between Chulalongkorn University, Kasetsart University and Yamaguchi University. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	音井 威重  (Otoi Takeshige)  (30311814)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授   (16101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	谷口 雅康  (Taniguchi Masayasu)  (40625018)	山口大学・共同獣医学部・准教授     (15501)	