

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21098

研究課題名(和文) 免疫担当細胞と共生細菌が織りなす精子成熟誘導因子の発動

研究課題名(英文) Sperm maturation induced by immunocompetent cells and symbiotic bacteria

研究代表者

渡邊 仁美 (Watanabe, Hitomi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：80624056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精子活性化機能を有するLipocalin2(Lcn2)の子宮粘膜からの発現制御機構の解明を進め、これにより生殖粘膜の微小環境がもたらす受精制御機構が明らかとなり、不妊症の診断・治療法開発の基礎となる分子基盤確立を目的とした。研究の結果、脳下垂体-卵巣軸における性ホルモン制御システムは、子宮粘膜からのLcn2発現の周期性をもたらすが、恒常的発現については、RAG2依存性の免疫細胞や常在細菌叢の存在が介する別の分泌因子により制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of expression control of Lipocalin 2 (Lcn 2), a sperm maturation factor derived from uterine mucosa, was elucidated, thereby clarifying the fertilization control mechanism caused by the microenvironment of reproductive mucosa, and establishing the method of diagnosis and treatment of infertility. As a result of the study, the sex hormone control system in the pituitary - ovary axis leads to the periodicity of Lcn2 expression from uterine mucosa, but its constitutive expression is mediated by the presence of RAG2 - dependent immune cells and resident flora.

研究分野：生殖発生工学 実験動物学

キーワード：精子 Lipocalin2 免疫担当細胞 常在細菌叢 性ホルモン制御

1. 研究開始当初の背景

受精能を獲得した機能的な精子が形成されるためには、精巣内のみならず子宮、卵管内において多階層的な成熟過程を必要とする。これまで申請者は、子宮、卵管内で起こる精子の受精能獲得プロセスの分子メカニズムの研究を継続しておこなっており、このプロセスの初期過程(キャパシテーション)に雌側因子としてLCN2が関与することや精子膜ラフトの局在変化と受精能が相関することをあきらかにしてきた。なかでもグラム陰性菌の増殖を抑制する自然免疫因子として知られていたLCN2が、子宮・卵管内で精子細胞膜のフォスファチジルエタノールアミンと結合し、プロテインキナーゼA依存的にキャパシテーションを誘導することを見だし、子宮・卵管内での精子受精能獲得誘導メカニズムを解明するきっかけをつかんだ。

2. 研究の目的

本研究は、精子活性化機能を有するLipocalin2(Lcn2)の子宮粘膜からの発現制御機構の解明を進め、これにより生殖粘膜の微小環境がもたらす受精制御機構が明らかとなり、不妊症の診断・治療法開発の基礎となる分子基盤確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、Lcn2の発現制御機構を解明するために、分子生物学的手法、免疫学的手法、遺伝学的手法等多様な研究方法を適宜駆使して行なった。

4. 研究成果

1) Lcn2の恒常的発現にRAG2依存性免疫細胞や常在細菌叢が関与している; 2) Lcn2の性周期依存的発現上昇・下降には、脳下垂体ホルモンが関与している; 3) 脳下垂体ホルモン分泌を負に制御する卵巣由来分泌因子インヒビンを中和抗血清

によりブロックすると、Lcn2が低値となり発現の周期性も消失する。そこでインヒビンを遺伝的に欠損したマウス(InhaK0)をCRISPR-Cas9ゲノム編集法により作製し、子宮でのLcn2の発現を調べたところ恒常的かつ非周期的な強い発現上昇がみられ、中和抗血清投与とは逆の結果をみた。一方、InhaK0マウスでは、理由は不明であるが、極めて高頻度に間質細胞由来の卵巣腫瘍が発生する。そこで、この卵巣腫瘍と正常卵巣の間でマイクロアレイ比較解析を行なったところ、卵巣腫瘍においていくつかの分泌因子の高い発現上昇を認めた。また、これらの因子の発現比較を定量PCR法にて行なったところ、20倍~30倍の強い発現上昇を確認した。これらの結果から、脳下垂体-卵巣軸における性ホルモン制御システムは、子宮粘膜からのLcn2発現の周期性をもたらすが、恒常的発現については、RAG2依存性免疫細胞や常在細菌叢の存在が介する別の分泌因子により制御されている可能性が示唆された。

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12件)

1. Tsuchiya, Y., Y. Minami, Y. Umemura, H. Watanabe, D. Ono, W. Nakamura, T. Takahashi, S. Honma, G. Kondoh, T. Matsuishi, and K. Yagita. Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mouse. *Genes to Cells*, 20-12, 992-1005 (2015).
2. Yoshimoto, Y., A. Takimoto, H. Watanabe, Y. Hiraki, G. Kondoh, C. Shukunami. *Scleraxis* is required for maturation of tissue domains for proper integration of the musculoskeletal system. *Scientific Reports* 7:45010. doi: 10.1038/srep45010 (2017).
3. Das, N-R., H. Miyata, H. Hara, K. Uchiyama, J. Chida, M. Yano, H. Watanabe,

G. Kondoh, S. Sakaguchi. Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. *Arc. Virol.* doi: 10.1007/s00705-017-3295-3 (2017).

4. Watanabe, H., R. Takeda, K. Hirota, G. Kondoh. Lipid raft dynamics linked to sperm competency for fertilization in mice. *Genes to*

Cells<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28425215> (2017).

5. Mochizuki, A-L., A. Katanaya, E. Hayashi, M. Hosokawa, E. Moribe, A. Motegi, M. Ishiai, M. Takata, G. Kondoh, H. Watanabe, N. Nakatsuji, S. Chuma. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. *Mol Cell Biol.*, 37-23, pii: e00117-17, (2017).

6. Hara, H., H. Miyata, N-R. Das, J. Cida, T. Yoshimochi, K. Uchiyama, H. Watanabe, G. Kondoh, T. Yokoyama, S. Sakaguchi. Prion protein devoid of the octapeptide repeat region abrogates BSE pathogenesis in mice. *J. Virol.*, 92-1, pii: e01368-17, (2017).

7. Ohashi, M., Y. Umemura, N. Koike, Y. Tsuchiya, Y. Inada, H. Watanabe, T. Tanaka, Y. Minami, O. Ukimura, T. Miki, T. Tajiri, G. Kondoh, Y. Yamada, K. Yagita. Disruption of circadian clockwork in in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes to Cells*, 2018 Feb;23(2):60-69. doi: 10.1111/gtc.12552. Epub 2017 Dec 22.

8. Tsubaki, T., T. Kadonosono, S. Sakurai, T. Shiozawa, T. Goto, S. Sakai, T. Kuchimaru, T. Sakamoto, H. Watanabe, G. Kondoh, S. Kizaka-Kondoh. Novel Adherent CD11b+ Gr-1+ Tumor-infiltrating Cells Initiate an Immunosuppressive Tumor

Microenvironment.

Oncotarget,<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24359> (2018).

9. Shukunami, C., A. Takimoto, Y. Y. Nishizaki, Y. Yoshimoto, S. Tanaka, S. Miura, H. Watanabe, T. Sakuma, T. Yamamoto, G. Kondoh, Y. Hiraki. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Scientific Reports*, 8(1):3155. doi: 10.1038/s41598-018-21194-3 (2018).

10. Morita, M., T. Sato, M. Nomura, Y. Sakamoto, Y. Inoue, R. Tanaka, S. Ito, K. Kurosawa, K. Yamaguchi, Y. Sugiura, H. Takizaki, Y. Yamashita, R. Katakura, I. Sato, M. Kawai, Y. Okada, H. Watanabe, G. Kondoh, S. Matsumoto, A. Kishimoto, M. Obata, M. Matsumoto, T. Fukuhara, H. Motohashi, M. Suematsu, M. Komatsu, K-I. Nakayama, T. Watanabe, T. Soga, H. Shima, M. Maemondo, N. Tanuma. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell*, 33(3):355-367.e7.doi:10.1016/j.ccell.2018.02.004 (2018).

11. Seike, M., Y. Omatsu, H. Watanabe, G. Kondoh, T. Nagasawa. Stem cell niche-specific EBF3 maintains the bone marrow cavity. *Genes Dev.*, doi: 10.1101/gad.311068.117 (2018). [Epub ahead of print]

12. Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and

Augment Autoimmune Arthritis. *Immunity*.

2018 May 22. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計3件)

1. 渡邊 仁美、竹田 理恵、廣田 圭司、近藤 玄：マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について 第63回日本実験動物学会総会、川崎、2016年5月5-8日

2. Hitomi Watanabe, Takatoku Oida, Gen Kondoh and Keiji Hirota: Development and characterization of monoclonal antibodies against a stable sperm surface antigen. 第45回日本免疫学会学術集会、那覇、2016年12月5-7日

3. Gen Kondoh, Hitomi Watanabe, Rie Takeda, Keiji Hirota Lipid raft dynamics linked to sperm competency for fertilization in mice. 第4回国際生殖生物学会、那覇、2017年9月27-29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 仁美 (WATANABE, Hitomi)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教
研究者番号：80624056

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()