

令和元年6月13日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08438

研究課題名(和文) サイトカインを介した精子-卵丘細胞間相互作用の解析

研究課題名(英文) Study of sperm-cumulus cell interactions mediated by cytokines

研究代表者

谷井 一郎 (Tanii, Ichiro)

富山大学・教養教育院(杉谷)・教授

研究者番号：40207171

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)：哺乳類の卵丘細胞がPACAPに反応して受精を促進する機構について解析した。排卵後の卵-卵丘細胞複合体周囲には卵胞液および精子先体由来する下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)が存在し、卵丘細胞にはPACAP受容体が発現している。卵丘細胞がPACAPに反応して、発現上昇する遺伝子にはサイトカインおよび神経ペプチド遺伝子が含まれており、それらの中で、CCL2は精子の誘引作用をもつこと、ニューロキニンAは精子の透明帯通過を促進することを示した。本研究はPACAPによる卵丘細胞の活性化によって体外受精率を高められることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、不妊治療のための体外受精-胚移植(IVF-ET)の成功率は3割程度で、体外受精が成功しないケースでは顕微授精が行われるが、妊娠に至る率は30%程度である。体外受精による受精率・妊娠率を高めることは家畜繁殖の分野でも重要なテーマとなっている。とりわけウシの体外受精-胚移植による繁殖の成功率を高めるための研究が続けられているが、妊娠率は年々下がり続けている。卵丘細胞の働きに着目すると、卵丘細胞の機能を活性化することにより、体外受精-胚移植あるいは顕微授精-胚移植による妊娠率を高められる可能性があり、本研究は不妊治療や家畜繁殖の分野に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanism in which cumulus cells promote fertilization in response to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). PACAP is present around ovulated cumulus-oocyte complexes, and the PACAP receptor PAC1R is expressed in cumulus cells. Exogenous PACAP caused elevation of gene expression of several cytokines and neuropeptides in cumulus cells. Among them, CCL2 showed potent chemoattractant activity for sperm, and neurokinin A promoted sperm penetration through zona pellucida. This study suggests that IVF-ET is possibly improved when cumulus cells are activated by using PACAP.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 卵丘細胞 精子 精子誘因性 透明帯通過 サイトカイン 神経ペプチド 体外受精

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵丘細胞層の役割は卵に向かう精子の障壁と考えられてきたが、近年、受精に必要な分子を産生しているという証拠が挙がっている。卵丘細胞を除去の影響を調べた研究(Tokuhiro et al 2012, ほか数編), 卵丘細胞を培養した培地に精子を活性化する分子があることを証明した研究(Gomez-Torres et al 2015, ほか多数), 卵丘細胞が分泌する精子活性化分子を同定した研究(Tamba et al 2008, ほか多数)などである。しかし、その詳細な機序に関してはほとんど未解明である。私たちは、マウス精子先体に PACAP が存在すること、卵丘細胞には PACAP 特異的受容体 PAC1 が存在することを示した(Tanii et al 2011)。ヒト卵胞液には PACAP が存在することからも、卵丘細胞は排卵前後で PACAP の作用を受けていると推測された。卵丘細胞-卵複合体を PACAP 処理すると、体外受精率が促進された(Tanii et al 2011)。実際に、PACAP が雌性機能制御に重要であることは PAC1 欠損マウスおよび PACAP 欠損マウスでメスの繁殖能力が大幅に減少することで示された(Jamen et al 2000; Shintani et al 2002)。しかし、PACAP による受精促進の作用メカニズムについては十分に解明されていない。

2. 研究の目的

卵丘細胞に PACAP を作用させたときに受精を促進する分子が放出されると推測されるので、それらの分子を同定し、その作用を解析することを目的とした。標的とする分子は ELISA での検出を試みるが、ELISA での検出には限度があり、重要な役割を持つ分子が見逃されてしまう可能性がある。そこで、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現の解析を行い、PACAP に応答して発現上昇する遺伝子を調べ、その中から細胞外で周辺の細胞に作用すると考えられるサイトカインと神経ペプチドを研究対象分子として絞り込む。研究対象分子の中で精子に作用して、受精率を高めるものや精子誘引性をもつものがあるかどうかを調べる。また、精子の細胞膜にそれらの受容体が存在するかどうかを合わせて調べる。

3. 研究の方法

(1) サイトカイン・神経ペプチド受容体の精子における発現

PACAP により発現上昇を示す卵丘細胞遺伝子から、研究対象をサイトカインおよび神経ペプチドに絞り込む。対象とした分子に対する受容体がマウス精子細胞膜で局在・発現しているかどうかを、免疫蛍光抗体法とウェスタンブロットで調べる。

(2) サイトカイン・神経ペプチドの受精への影響

サイトカイン・神経ペプチドの精子機能に及ぼす影響を、先体反応の起こりやすさ、鞭毛運動の変化、透明帯通過率を指標として調べる。については、可溶化した透明帯によって先体反応を誘導したときに、サイトカインが先体反応率を変化させるかどうか調べる。については、精子の運動能変化は精子運動能解析装置(SMAS)を使用して解析する。については、精子と卵の融合を抗 CD9 抗体によってブロックして多精子受精阻止機構を働かなくして、一定時間後に囲卵腔に侵入した精子をカウントする。さらに、サイトカイン・神経ペプチドの影響がアンタゴニストによって阻害されることを確かめる。

(3) サイトカインの精子誘因性の解析

対象とした分子の中で、特に走化性因子であるケモカインに分類される分子について、マウス精子に誘引作用をもつかどうかを調べる。これまでマウス精子に対する走化性因子は特定されていないので、いくつかの方法を用いて調べる。結果的に最も良い結果を得た方法は、ポイデンチャンパー法(ダブルチャンパー法)である。これは 24 穴のウェルの中に挿入するインナーウェルを用い、インナーウェルの底には精子が通り抜けるだけの穴の開いた膜が張ってある。インナーウェルに精子懸濁液を入れ、アウターウェルの培地にはケモカインを入れ、インナーウェルからアウターウェルに移動した精子をカウントして、ケモカインを含まない培地と比較する。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイで 2 倍以上の遺伝子発現上昇を示した分子には、細胞外に分泌されて作用する分子が 21 種類含まれていた(下の表にリストを示す)

表. 2 倍以上の発現上昇を示した分泌性タンパク質 / ペプチドのリスト

| Gene name | Gene | Fold |
|-------------------------------------|--------------|--------|
| | symbol | change |
| Anterior gradient 2 | <i>Agr2</i> | 20.1 |
| Demilune cell and parotid protein 1 | <i>Dcpp1</i> | 15.4 |
| Oviductal glycoprotein 1 | <i>Ovgp1</i> | 12.4 |
| Lactotransferrin | <i>Lft</i> | 12.2 |

| | | |
|---|----------------|------|
| Augurin | <i>C2orf40</i> | 9.25 |
| Lipocalin 2 | <i>Lcn2</i> | 7.27 |
| Extracellular proteinase inhibitor | <i>Expi</i> | 6.95 |
| Tachykinin 1 | <i>Tac1</i> | 6.29 |
| Heparin-binding EGF-like growth factor | <i>Hbegf</i> | 4.62 |
| Complement component 3 | <i>C3</i> | 3.95 |
| Colony stimulating factor 3 | <i>Csf3</i> | 3.26 |
| lipopolysaccharide binding protein | <i>Lbp</i> | 3.18 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 3 | <i>Ccl3</i> | 2.71 |
| lipase, gastric | <i>Lipf</i> | 2.63 |
| tissue inhibitor of metalloproteinase 2 | <i>Timp2</i> | 2.29 |
| Dickkopf homolog 3 | <i>Dkk3</i> | 2.26 |
| Fibroblast growth factor 1 | <i>Fgf1</i> | 2.21 |
| Fibrinogen-like protein 2 | <i>Fgl2</i> | 2.13 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 2 | <i>Ccl2</i> | 2.10 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 7 | <i>Ppbb</i> | 2.09 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 | <i>Cxcl1</i> | 2.02 |

この中から，その受容体に対する特異抗体とアンタゴニストが入手可能である点で，研究対象を MIP1- (CCL3)，MCP-1 (CCL2)，CXCL1，HB-EGF，ニューロキニン A の 5 分子のサイトカイン・神経ペプチドに絞り込んだ。なお，ニューロキニン A はタキキニン類神経ペプチドで，*Tac1* 遺伝子にコードされる。蛍光抗体法によってマウス精子での受容体の局在・発現を調べたところ，いずれの受容体も精子先体を被う部位に局在が示され，MIP1- (CCL3) と CXCL1 の受容体については精子頭部だけでなく鞭毛にも局在が示された。電気泳動用に精子細胞膜分画を調製して，ウェスタンブロットを行ったところ，ニューロキニン A と CCL2 の受容体に相当するバンドが確認できた。そこで，研究対象をこのニューロキニン A と CCL2 の 2 分子に絞り込んで，以下の解析を行った。

(2) ニューロキニン A は精子の機能を向上させることが明らかとなった。精子をニューロキニン A で処理すると，可溶化した透明帯によって誘導される先体反応が促進された。鞭毛運動への影響を SMAS で解析すると，ニューロキニン A によって鞭毛運動の振幅が増大した。透明帯を通過して困卵腔に侵入した精子をカウントすると，ニューロキニン A は精子の透明帯通過を促進することが示された。

(3) 研究対象分子の中でケモカインに分類される MIP1- (CCL3)，MCP-1 (CCL2)，CXCL1 について，マウス精子を誘引するかどうかをボイデンチャンバー法で調べたところ，CCL2 が精子を誘引することが示された。

以上の結果は，卵丘細胞は PACAP の作用を受けて，精子の先体反応や鞭毛運動を促進する因子と，精子を誘引する因子を放出して，受精率を高めることを示している。PACAP に応答して発現上昇した遺伝子のリストの中には，初期発生を促進すると考えられている分子も含まれている。Demilune cell and parotid protein 1 は胚盤胞までの発生を促進する。Complement component 3 は栄養膜（栄養外胚葉）の発生とハッチングを刺激する。このように PACAP による卵丘細胞の活性化は，ヒトの不妊治療や家畜の繁殖における体外受精率の成功率を高める方法に応用できる可能性があるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

谷井一郎，荒館忠，高崎一朗，小宮顕．精子機能に対するニューロキニン A の役割．日本

アンドロロジー学会第 35 回学術大会，2016 年 6 月 24-25 日（前橋）

荒舘忠，谷井一郎，小宮顕．マウス体外受精に対するフラバン二量体の効果とその超活性化誘導機構の解析．日本アンドロロジー学会第 35 回学術大会 2016 年 6 月 24-25 日（前橋）

谷井一郎，荒舘忠．ケモカイン CCL2 のマウス精子に対する誘引性．第 123 回日本解剖学会総会 2018 年 3 月 28-30 日（東京）

谷井一郎，荒舘忠．マウス精子 - 卵丘細胞のサイトカインを介した相互作用．第 111 回日本繁殖生物学会大会 2018 年 9 月 13-15 日（上田）

谷井一郎，荒舘忠．卵丘細胞が分泌するサイトカインおよび神経ペプチドによる受精の促進．第 78 回日本解剖学会中部支部学術集会 2018 年 10 月 13-14 日（富山）

谷井一郎，荒舘忠．卵丘細胞が分泌するサイトカインおよび神経ペプチドによる受精の促進．第 124 回日本解剖学会総会 2019 年 3 月 27-29 日（新潟）

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：荒舘 忠

ローマ字氏名：ARADATE, Tadashi

所属研究機関名：富山大学

部局名：教養教育院

職名：助教

研究者番号（8 桁）：30303233

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。