

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20884

研究課題名(和文)ブタの精漿タンパクが子宮に及ぼす免疫変化の機序の解明と受胎性に関する研究

研究課題名(英文)The relationship between porcine seminal plasma proteins and immune response on uterine affecting in pig conception

研究代表者

奥山 みなみ (OKUYAMA, Minami)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50756781

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)：本研究は精漿を利用したブタの繁殖成績の向上を目指し、精漿に含まれるタンパク質の機能と子宮内膜上皮の免疫反応に焦点をあて、精漿が受胎性におよぼす影響を明らかにすることを目的としている。

本研究では、精漿のろ過条件を探ると共に、子宮内膜上皮細胞を単離し培養する条件を見出した。この培養下の細胞に対し精漿を添加した結果、複数の伝達因子についてmRNA発現量の変化が認められた。特に、精漿中の低分子物質が子宮内膜上皮細胞におけるIL-8およびCOX-2発現に寄与すること、IL-6発現には低分子物質が関与しないこと、さらにはIL-1 発現には補体等以外のタンパク質が作用する可能性があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内でのブタ研究は飼養管理や衛生管理に主眼が置かれており、基礎繁殖学的研究は立ち遅れている。本研究の結果は、ブタの精漿が子宮の免疫動態に及ぼす効果とその機序を知る足がかりとなり、基礎繁殖学分野の発展に寄与する。また、母体の子宮において受胎の成立と失敗をわける原因因子を特定することで、不妊の治療法の開発につなげることができるなど獣医学的意義も深い。さらに本研究を進展させ、精漿が本来もつ子宮の機能調節作用を利用した新たな繁殖促進技術の開発につなげることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study focused on roles of seminal plasma proteins and immune response of uterine epithelial cells in order to reveal how porcine seminal plasma affect conception. This study goal is to improve pig reproduction performance with using seminal plasma.

First, the methods of filtration of seminal plasma was established. Second, uterine epithelial cell isolation and culture were established. Third, cytokine mRNA expressions were measured in culture cells incubated with 10% seminal plasma medium. As the results, it is clarified that low-molecular substances in seminal plasma affected IL-8 and COX-2 expression in epithelial cells, on the other hand, did not influence IL-6 expression. Additionally, IL-1 expression might be affected by proteins without presence of complements.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：豚 受胎 精漿 免疫 子宮内膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精漿とは精液に含まれる液体成分のことである。近年、精漿が雌の生殖器に与える影響について着目されるようになり、妊娠に際し精漿が子宮機能を調節する役割をもつことが知られるようになってきた。妊娠時には母体が非自己である胚を受け入れるために、母体免疫が攻撃性のものから抑制性のものに変わる必要がある。そのため子宮内膜上皮における増殖因子や免疫系の働きが、妊娠に向けて免疫寛容へと変化する。

これまでに申請者はブタ生体において人工受精後の子宮内膜のインターロイキン(IL)発現の経時的変化と産子の有無を調べた。その結果、受胎の成立には走化因子である IL-8 の発現が早期に下降し免疫細胞の誘導が抑制される必要があり、さらに精漿の作用により炎症性サイトカインである IL-2 発現が抑制されることで産子数が増えることを示している。しかし、精漿中のどのような物質が子宮内膜に作用しているのか、これらサイトカインの変化がどのような免疫機序によって引き起こされるのか、など不明な点が多い。

2. 研究の目的

受胎を成立させ妊娠の維持につながる精漿の役割を模索するためには、精漿が受胎の成立に及ぼす免疫系の制御メカニズムの詳細を解析する必要があると考えられる。本研究では、どのような機序で子宮内膜における伝達因子の変化がおこるのか、また、精漿中のどのような成分がこの機序に関わるのかを知るため、精漿に含まれるタンパク質に着目し、その機能と子宮内膜上皮の免疫反応を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 精漿のろ過およびクロマトグラフィー法を用いた精漿タンパクの分画化

培養系に精漿を添加するためには微生物の混入増殖を防ぐため、精漿を事前に滅菌ろ過することが望ましい。そこで、ろ過の条件の検討を行った。また、タンパク分離用担体を使い、含まれるタンパク質を分画ごとに分けるための条件検討を行った。更に、蛋白質とそれ以外の成分との比較を行うため、透析、非働化処理による精漿成分の変化を確認した。

(2) ブタ子宮内膜上皮細胞の分離および培養条件の検討

屠畜場より入手したブタの子宮を用いて、子宮内膜上皮細胞を単離し培養する条件を検討し、その方法を確立した。細胞単離のための酵素の種類、酵素液の濃度、反応時間などを調整するとともに、培養条件の検討も併せて実施した。

(3) 精漿投与試験による子宮内膜上皮の免疫関連因子の発現解析

(2) で培養した子宮内膜上皮細胞において、(1) でろ過した精漿を添加し、その後、上皮細胞の反応性を評価した。複数のサイトカインと増殖分子をターゲットとして、それらの mRNA 発現変化についてリアルタイム PCR を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 精漿のろ過およびクロマトグラフィー法を用いた精漿タンパクの分画化

精漿は粘度が高く夾雑物の混入割合が非常に高いため、ろ過の試みは難航した。しかし、いくつかのフィルターおよび遠心条件を組み合わせることで、可溶化タンパクの化学的性質に影響をあたえることなくコンタミネーションを可能な限り排除しろ過することに成功した。

また、可溶化タンパクの分画化にあたり、分離担体 Superdex G-200 を使い、0.005M リン酸緩衝液 + 0.15M NaCl の溶媒条件で分画化を行うことが出来た。また、透析膜を用いた精漿の透析および非働化処理を行った場合も、可溶化タンパクの電気泳動像に変化は認められなかった。

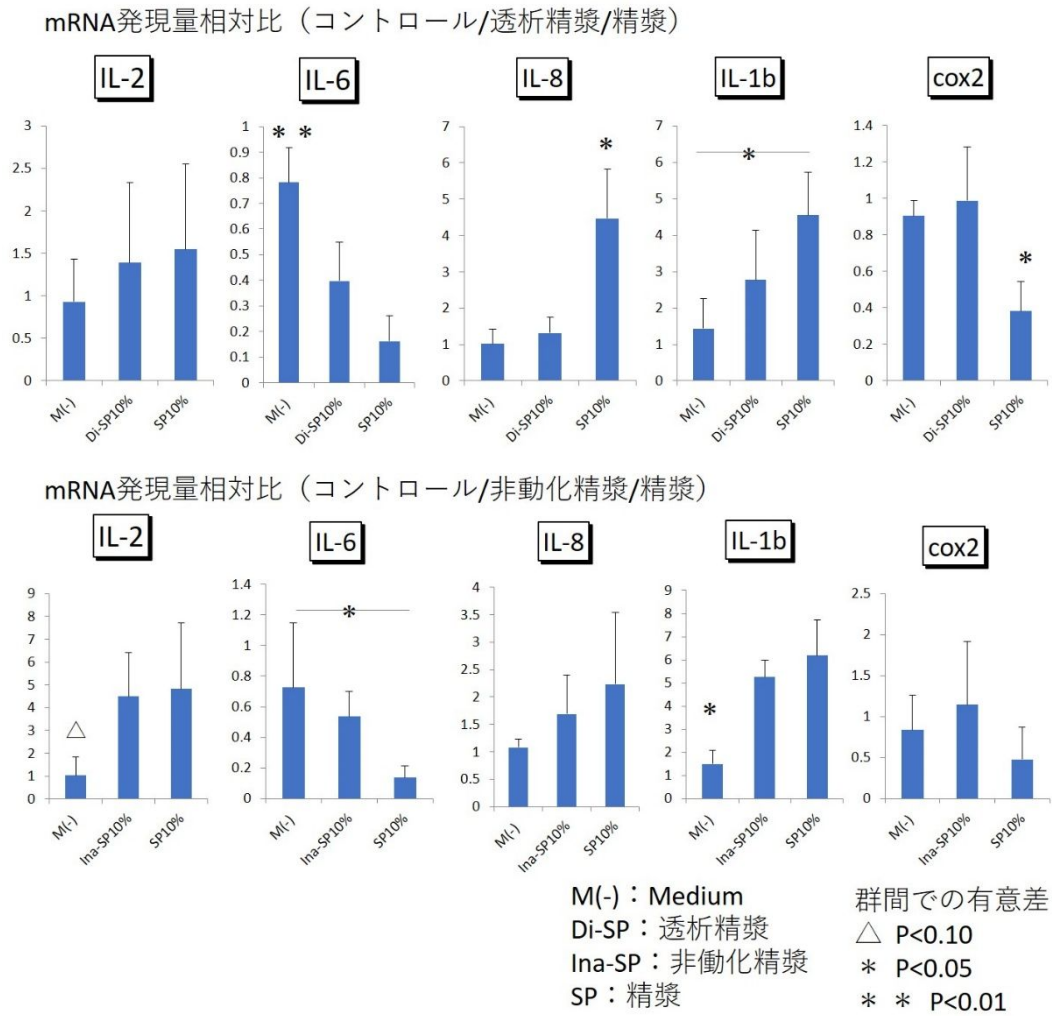
(2) ブタ子宮内膜上皮細胞の分離および培養条件の確立

様々な酵素の組み合わせ・濃度・反応時間・反応条件などを組み合わせて検討した結果、消化酵素 Dispase を HBSS 液にて 0.24% に希釈し、37 90 分のインキュベートすることによって、子宮内膜上皮細胞を単離することができた。ただし、安定的に分離が可能であったのは黄体期の卵巣を持つ子宮であり、卵胞期の卵巣を持つ子宮では分離される細胞数が少ないのに加え、その後の培養において細胞が定着せず死滅するケースが多かった。この原因は明らかではないが、今後は卵胞期の子宮の一次培養において安定培養ができる条件を明らかにしていく必要がある。

(3) 精漿投与試験による子宮内膜上皮の免疫関連因子の発現解析および受胎性の評価

精漿に含まれるどの成分が子宮内膜上皮細胞の遺伝子発現に作用するかを明らかにするために、精漿原液、透析処理を行った精漿および非働化処理を行った精漿の 3 種類を培養系に添加し反応を評価した。その結果、複数のサイトカイン発現が精漿添加後に上昇し、遅くとも培養開始 12 時間後には、培養液のみの対照群に対し有意差を認めた。特に、透析により除去された低分子物質が子宮内膜上皮細胞における IL-8 および COX-2 発現に寄与すること、IL-6 発現には低分子物質が関与しないことがわかった。また IL-1 発現には補体等の蛋白質以外の物質が作用する可能性があることが明らかになった(図 1)。

図1 培養開始 0h の発現量を 1 としたときの 12h 後の相対 mRNA 発現量



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥山みなみ、内倉健造、田島茂行、榎原久司、西園晃
2. 発表標題 精漿の透析あるいは非働化処理がブタの子宮内膜上皮細胞におけるサイトカイン発現変化に及ぼす影響
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥山みなみ
2. 発表標題 胚死減少による一腹産子数増加を目指した新技術の開発
3. 学会等名 平成30年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019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