

令和元年9月3日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18164

研究課題名(和文)安全で有効な新しい免疫抑制剤の開発：生殖学から免疫学への展開

研究課題名(英文)Bipotential semen proteins as sperm-protective and immunosuppressive reagents

研究代表者

河野 菜摘子(Kawano, Natsuko)

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：00451691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの解析より、子宮内液には殺精子因子が、精液タンパク質には精子を保護するタンパク質が存在すると考えられる。これらの因子が体内受精に不可欠であるが、それぞれの詳細なはたらきは不明であった。本研究では、マウス型精液タンパク質を欠損し、さらにヒト型精液タンパク質をKIしたモデルマウスの作製に成功した。このヒト型精液モデルマウスに妊孕性が認められれば、種間に保存された精子保護タンパク質の解明が進み、免疫抑制剤としての応用も期待できる。一方、子宮内の殺精子因子として自然免疫の補体C3を解析した。ほとんど観察されたことの無い形状でC3は精子に結合しており、そのしくみを解明することは生物学的に大きい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの繁殖様式である体内受精には、女性因子と男性因子のバランスで成り立つ複雑さがある。現在の不妊患者のうち、卵や精子には異常が見られない原因不明とされるケースが多数存在する。複雑な体内受精のしくみを少しでも明らかにすることで、不妊原因の究明および、より自然な妊娠を可能にする治療法の開発が可能になると考えている。本研究では、男性の精液タンパク質に異常がある場合は精子形成が正常でも子宮内で精子が死滅すると予想され、女性の免疫力が亢進している場合は過剰に精子が排除されていると予想される。それぞれのしくみを詳細に知ることが、受精率の高い体内受精とはどういう状態のことを意味するのか理解したい。

研究成果の概要(英文)：Internal fertilization is a complicated process, including gametes and liquid factors from both female and male. We hypothesized competitive factors in the internal fertilization: spermicide in female uterine fluid and sperm-protectant in male semen. These factors seem to be essential for the internal fertilization, but the precise mechanism was still unclear. In this study, we produced Svs2-6-/- male mice for deleting mouse-type semen and human Semgl/II knockin male mice for introducing human-type semen. We suppose the possibility for the humanized male mice with high fertility, which suggests that the seminal plasma proteins across the two species protect sperm from female immunity and development for human immunosuppressive reagents. In female spermicide, we found that uterine complement C3 kills sperm in the absence of SVS2. C3 covered the surface of the killed sperm with unique formation. Our research about the internal fertilization may shed light on the new innate immune system.

研究分野：生殖科学

キーワード：体内受精 精液タンパク質 自然免疫 補体

1. 研究開始当初の背景

日本は世界有数の「生殖医療大国」である。いまや不妊に悩むカップルは6組に1組と言われ、体外受精が行われる頻度は過去10年で3倍以上に増えている。しかし不妊原因の究明は進んでいるとは言えず、原因不明のまま体外受精や顕微授精で得た受精卵を移植する医療が繰り返されているのが現状である。

人間は、母親の体内で受精・発生することで子孫を繁栄させてきた。この生殖形式によって、数少ない卵子は父親の精子と高い確率で受精し、高い確率で着床・発生することができる。これら生殖に関わる全ての行程は、女性生殖器なしでは語り得ない。しかし現在の受精研究は、体外受精技術やクローン技術によって女性生殖器なしでも、精子と卵子もしくは卵子のみによって個体発生することが実験的に証明されたことから、子宮や卵管といった生殖器内における精子に生理的意義がないかのような錯覚が広がっている。しかし、先端技術によってバイパスされた過程にこそ、体内受精を行う人間の生殖戦略があるはずであり、真の意味での生殖研究は子宮・卵管・卵子と精子・精漿の相互作用について行われることが妥当である。申請者のこれまでの研究は、女性生殖器内における精子および精漿の機能について検討してきた。

精漿とは精液の液性成分のことであり、精巣上体、精嚢腺、前立腺、尿道球腺などの副生殖腺に由来する分泌液から構成される。一般的に精漿成分の約70%は精嚢腺からの分泌物で構成されている。霊長類およびげっ歯類では、精嚢腺の主要なタンパク質がそれぞれ SemgI/II および SVS2 と名付けられており、その一部の塩基配列や遺伝子座が一致することから相同タンパク質と言われている。しかしそれらのアミノ酸配列の相同性は低く、配列からだけでは同一の機能を持つとは考えにくい。近年、SVS2 欠損マウスを用いた解析から、SVS2 は子宮内において精子を保護する働きがあり、欠損すると子宮内で精子が死滅することによって体内での受精効率が著しく低下することを明らかにした(Kawano et al., PNAS 2014)。同様の作用は相同タンパク質ヒト SemgI/II にも期待されるが、体外で精液タンパク質 SemgI/II および SVS2 の機能解析を行うには限界があり、さらに実際にヒトを用いた解析を行うのは非常に難しい。

2. 研究の目的

「不妊」は、もはや人類の存続を脅かす難治性の疾患として扱われるのが妥当であるが、社会システムの問題、主に晩婚といった女性のライフスタイルが主な原因であるとの考え方が一般的であり、根本的な対処法の確立には程遠いのが現状である。不妊症の原因は多岐に渡っており、男性および女性因子によって単独で引き起こされる疾患の他に、双方が複雑に絡み合った結果としての病態も考慮されるべきである。本研究では、今まで注目されてこなかった精液成分に着目し、その機能不全による女性・男性の両側の体内環境システムの異常によって引き起こされる不妊病態の解明を試みる。本研究が成功することにより、精液タンパク質の免疫抑制効果に着目した免疫抑制剤としての創薬へつながる。

これまで申請者は、メスマウスの生殖器には精子を殺す因子が存在すること、その因子から精子を保護するために精液中のSVS2が存在することを明らかにしてきた(Kawano et al., PNAS 2014)。SVS2の精子を保護する作用は、SVS2が主となって働いているとは考えられるが、精液中にはSVS2の遺伝子重複産物であるSVS3-6のタンパク質も多く存在しており、その機能は未知なままである。子宮内にSVS2が単独で存在した場合は、SVS2-6が存在した場合と比較して、精子を保護する能力が弱まる傾向にあることから、SVS2以外のSVS3-6も体内受精において関与している可能性は高い。

そこで、マウスSVS2とヒトSemgI/IIの機能比較を行うためには、SVS2単独欠損マウスの解析だけでは不十分であり、SVS3-6も含むファミリー遺伝子全てを欠損させたマウスを作製し、さらにはヒトSemgI/IIを導入した「ヒト型精液タンパク質のマウス」を作製する必要があると考える。本研究ではマウスSVS2-6の遺伝子群をヒトSemgI/IIで置き換えたマウスを作製し、その表現型を解析することで、ヒト型精液タンパク質SemgI/IIはマウスでも機能し得るのか否か解析を行う。その結果、マウスSVS2とヒトSemgI/IIの機能は相同であるか否かをマウス体内で検証することが出来ると考える。ヒトSemgI/IIにも精子を保護するはたらきがある場合、ヒトの免疫抑制剤としての創薬開発につながる。

3. 研究の方法

本研究計画では、ヒト型精液タンパク質のマウスを作り、その表現型を解析することによって種間における生殖の共通性を明らかにする。マウス型精液のタンパク質ファミリーSVS2-6を欠損したマウスが既に作製できているため、その欠損領域にヒト型のタンパク質ファミリーSemgI/IIを導入する。その一連の作業には、ゲノム編集が短期間で効率よく行えるCrispr/Cas9システムを用いる。作製されたマウスの解析は、野生型メスと交配させて産仔数を調べる。オスマウスの妊孕性や、子宮内に射出された精子の観察などを予定しており、ヒト型タンパク質はマウスの体内受精においても機能し得るのか否か、に焦点をあてて解析する。

4. 研究成果

本研究では、実験計画どおりにマウスの作製が進んだ。2017年度には精液タンパク質 SVS2-6 をコードする 100kbp の領域を欠失したマウスが準備でき、その表現型が SVS2 単独の欠損マウスより不妊傾向が強まることを明らかとした。一方で、SVS2-6 欠損マウスでも完全な不妊になることはなかったため、マウス精液中に含まれる SVS2-6 のタンパク質のうち体内受精において主としてはたらくタンパク質は SVS2 であると結論付けた。また 2018 年には SVS2-6 が欠失した領域へヒト *SemgI/II* 遺伝子を導入したマウスの作製にも着手した。期間内にヒト *SemgI/II* タンパク質の発現までは確認できなかったが、ゲノムが導入された KI マウスを 2 系統作製することに成功した。この結果により、マウス型の精液タンパク質の欠損、およびヒト型の精液タンパク質の導入を実現したことになる。

また子宮内の殺精子因子についても解析が進んだ。C3 を欠損するマウスを導入し、解析したところ子宮内液による殺精子効果は減弱した。野生型マウスの子宮内には大量の補体 C3 が存在し、共培養すると精子を死滅させることが分かった。この死滅した精子を回収したところ、精子膜表面に大量の C3 が結合していること、またその分子量から一般的な活性化は起こっていないことが判明した。詳細に調べたところ、生体内ではほとんど確認されたことの無いフォームで精子細胞膜に結合することが分かってきた。また精子細胞膜には特異的なレセプターが存在すると考えられ、そのレセプターを同定することが母体免疫が精子を殺すメカニズム、ならびに、精液タンパク質が母体免疫から精子を守るメカニズムの鍵になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice.
Iwai M, Harada Y, Miyabayashi R, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Miyamoto Y, Yamada M, Hamatani T, Miyado M, Yoshida K, Saito H, Tanaka M, Umezawa A, Miyado K.
Heliyon 4(11) e00944 2018.

Autophagy-disrupted LC3 abundance leads to death of supporting cells of human oocytes.
Kang W, Ishida E, Yamatoya K, Nakamura A, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Tatsumi K, Saito T, Saito K, Kawano N, Hamatani T, Umezawa A, Miyado K, Saito H.
Biochemistry and biophysics reports 15 107-114, 2018.

Degradation of phosphate polymer polyP enhances lactic fermentation in mice.
Nakamura A, Kawano N, Motomura K, Kuroda A, Sekiguchi K, Miyado M, Woojin K, Miyamoto Y, Hanai M, Iwai M, Yamada M, Hamatani T, Saito T, Saito H, Tanaka M, Umezawa A, Miyado K.
Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms, 2018.

Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg.
Yoshida K, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Hanai M, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Hamatani T, Saito H, Miyado K, Umezawa A.
Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 76 71-77, 2018.

Membrane protein CD9 is repositioned and released to enhance uterine function
Iwai M, Hamatani T, Nakamura A, Kawano N, Kanai S, Kang W, Yoshii N, Odawara Y, Yamada M, Miyamoto Y, Saito T, Saito H, Miyado M, Umezawa A, Miyado K, Tanaka M.
Laboratory Investigation, 2018.

Exosomes versus microexosomes: Shared components but distinct functions.
Miyado K, Kang W, Yamatoya K, Hanai M, Nakamura A, Mori T, Miyado M, Kawano N.
Journal of plant research 130(3) 479-483, 2017.

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

Birthweights and Down syndrome in neonates that were delivered after frozen-thawed embryo transfer: The 2007-2012 Japan Society of Obstetrics and Gynecology National Registry data in Japan.

Yamatoya K, Saito K, Saito T, Kang W, Nakamura A, Miyado M, Kawano N, Miyamoto Y, Umezawa A, Miyado K, Saito H.

Reproductive medicine and biology 16(2) 228-234, 2017.

〔学会発表〕(計 7 件)

河野 菜摘子、吉田 薫、岩本 晃明、吉田 学、宮戸 健二

母性の自然免疫が妊孕性に及ぼす影響

第 40 回日本分子生物学会 (招待講演), 2017 年

Takeo Yamazaki, Natsuko Kawano and Kenji Miyado.

Antibacterial activities of seminal vesicle secretions in SVS2-6 KO mice.

12Th TOIN Internationa Symposium on Biomedical Engineering, 2017.

Ryo Matsushita, Kenji Miyado, Natsuko Kawano.

Analysis of Syrian hamster eggs - Identification of fusogenic factors.

12Th TOIN Internationa Symposium on Biomedical Engineering, 2017.

Daiki Sakaguchi, Kaoru Yoshida, Kazuma Hayashi, Natsuko Kawano.

Protective effects of seminal plasma proteins on uterine sperm.

12Th TOIN Internationa Symposium on Biomedical Engineering, 2017.

Maito Hanai, Kenji Yamatoya, Woojin Kang, Natsuko Kawano, Kenji Miyado.

Functional analysis of CD9 and micro-exosome facilitating sperm-egg membrane fusion.

12Th TOIN Internationa Symposium on Biomedical Engineering, 2017.

河野 菜摘子、坂口 大樹、金井 誠也、出雲 信夫

ラクトフェリンと女性機能

第 19 回 応用薬理シンポジウム、2017 年

河野菜摘子、今泉明音、吉田 薫、吉田 学、齊藤英和、宮戸健二

精液研究からわかってきた子宮の免疫機構

第 58 回 日本卵子学会 (招待講演) 2017 年

〔図書〕(計 1 件)

Encycropedia of Reproduction 2nd. Edition Vol. 1: Male Reproduction.

Yoshida, M., Kawano, N., Iwamoto, T., and Yoshida, K.

Elsevier, 3864, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

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

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(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。