

令和元年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19324

研究課題名(和文)モデルマウス作製による受精障害予防と治療法開発への挑戦

研究課題名(英文) The development of prevention and treatment methods of fertilization failure from mice model

研究代表者

島田 昌之(Shimada, Masayuki)

広島大学・統合生命科学研究科・教授

研究者番号：20314742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：雌にとって異物である精子を除去するが、一方でそれを寛容する仕組みについて不明な点が多かった。本研究において、子宮内は白血球数が少ないが、精子侵入を子宮上皮細胞のTLR2とTLR4が認識し、一過的(慢性ではない)なケモカイン分泌によって白血球を集積するメカニズムが明らかとなった。さらに、この仕組みを回避するために、ミトコンドリアにおける遺伝子発現とタンパク質翻訳機構の高い精子は、直進運動により卵管へ上向が可能になることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内に精子が残存することは、雌にとって異物である精子に対する抗体が産生される要因となる。また、除去するために細胞性免疫が活性化しすぎると子宮内は炎症状態となり、受精卵も攻撃対象となります。このような免疫寛容と炎症のバランスを保つ仕組みとして、子宮上皮細胞によるTLR2とTLR4系の制御機構を理解することで、精子抗体や着床異常の原因探索が可能となると期待される。さらに、人工授精時の子宮内免疫環境の把握が可能となり、繁殖成績向上に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Sperm are non-self for female; however, sperm are ejaculated to uterus for fertilization. To remove the extra sperm in uterus and pass the fertilizing sperm to oviduct, uterus has the specific immune condition where uterus epithelial cells express TLR2 and TLR4. The stimuli activate p38MAPK and JNK but not NFkB to induce the AP-1-regulating gene expression, including chemokine family. The secreted chemokines recruit leucocytes that remove the extra sperm by phagocytosis. The linear motility sperm that have the high transcription and translational activities in mitochondria can transfer to oviduct for fertilization. If the mechanisms were affected by unphysiological factors, such as infections, sperm could not pass to oviduct or the serious inflammation would attack the early embryo transferred from oviduct. Therefore, the basic information about immune functions in uterus are contributed for infertility care and increase the performance of reproductive technology.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：子宮 卵管 精子 免疫機構

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

1. 研究開始当初の背景

1産目の繁殖機能が正常な個体でも、その後、産子(児)が得られない、非遺伝的(後天的)な繁殖障害が発生する。このような個体は、発情回帰を繰り返すため人工授精を繰り返し行うが、全く受胎しないことから、受精障害や着床障害と推定される。着床障害は、染色体異常、性ステロイドホルモンの異常で非自己の胎仔(子)を許容できないことが原因である。受精障害については、雌は100%非自己の精子を寛容することが体内受精の絶対条件であるが、その免疫寛容の仕組みや、その破綻が受精障害の原因となるか、など、全く解明されていない。

申請者は、マウスにおいて、性成熟前に過剰排卵処理をした雌を交尾させると、性成熟後に不妊を呈すること、この個体から回収した卵は体外受精により受精するが、体内では受精障害の表現系になることを発見した。このことから、精子に対する免疫系は、性成熟前、あるいは過剰排卵処理、その両者における異常な内分泌環境によりONになった、と推察した。

免疫系は、まず白血球が精子を異物と認識する、多くの白血球がケモカキスにより集積する、白血球が異物を貪食し、排除する、貪食された異物の一部が抗原提示され、抗体が産生される、という一連のプロセスにより異物を排除する。しかし、子宮内の精子認識と精子除去メカニズムは全く解明されていない。また、この排除システムを乗り越えて、どのように卵管へと上向き、受精が成立するかについても詳細は不明である。

2. 研究の目的

繁殖障害は家畜の生産性低下による深刻な経済的損失を引き起こす。先天的な繁殖障害は、育種改良で淘汰されているが、1産目の繁殖機能が正常な個体でも、その後、産子(児)が得られない2産目以降の後天的な繁殖障害が発生する。雄を変えた人工授精を繰り返し行うが、全く受胎しないことから、雌側要因(受精障害や着床障害)と推定される。

着床障害(流産)は、染色体異常、あるいは性ステロイドホルモンの異常に起因する細胞性免疫の活性化が原因である。妊娠環境は、胎児(子)を異物と認識しない寛容状態であり、この寛容不全が流産を引き起こす。一方、雌側要因における受精障害の原因は、解明されていない。

申請者は、性成熟前の雌マウスに過剰排卵処理し、交尾させると、不妊になることを発見した。この個体は、体外受精により正常受精卵が得られるが、体内受精に異常がみられたことから、子宮機能ではなく、受精障害が原因であり、本マウスが受精障害解析モデルになると考えた。つまり、雌にとって、精子は100%非自己であるため、精子を許容する環境が整っていない性成熟前において、過剰排卵という異常な内分泌環境下では、精子に対する免疫系がONになると推定した。

本研究では、この免疫系がONになる仕組みの解明とその免疫系を突破して受精が成立するメカニズムに焦点を当て、家畜の繁殖障害の原因解明から繁殖管理法の開発に挑戦する。

3. 研究の方法

子宮内における精子認識機構の解明

- 子宮内で精子を認識する第一候補である白血球の動態解析を行うため、発情発見後の雌豚から経時的に子宮内容物をウシの受精卵回収用バルーンカテーテルを用いて回収し、解析する。
- 交配許容時(人工授精適期)には、精子侵入(注入)前に白血球数は少ないのに対して、精子注入直後に白血球数が著しく増加することから、白血球以外に精子を認識する仕組みがあると仮説立てた。この仮説を立証するため、ウシ子宮上皮細胞の体外培養系を用いて、精子と白血球の共培養系というアッセイ系を開発し、子宮上皮細胞のケモカイン発現およびそのケモカイン発現に関与すると推定されるシグナル伝達系、さらにはシグナル伝達系を活性化する受容体の探索をreal time PCR法およびwestern blotting法により行った。

子宮上皮細胞および集積した白血球に認識されない精子上向きメカニズムの解析

- 子宮内で精子が白血球による貪食を回避して卵管へと上向きできる仕組みを解明するため、子宮内腔粘液のメタボローム解析とその栄養基質による精子運動メカニズムの解明を以下のように試みた。まず、ブタの子宮内腔粘液を交尾6時間後にバルーンカテーテルを用いて回収し、その栄養基質をメタボローム解析した。

クレアチンの精子運動パターンへの役割

- クレアチントランスポーターの局在を免疫蛍光染色法により解析し、尾部に強局在したことから、尾部の運動に関わる解糖系への影響をヘキソキナーゼ活性を指標に解析した。
- クレアチンによるエネルギー蓄積機構についてATP量の揭示的变化により解析した。
- 精子の受精能獲得へのクレアチン添加の影響を解析し、体外受精系の改善を試みた。
- 体内におけるクレアチンの影響を検討するため、クレアチン受容体拮抗剤をマウスに腹腔投与し、卵胞発育、排卵、受精に及ぼす影響を検討した。

低グルコース条件における精子運動パターンの解析

- 子宮環境を模倣した精子培養液を開発し、その環境における精子運動パターンをコンピュータ解析した。

- 精子の代謝機構について解糖系とミトコンドリア代謝系に及ぼす影響を検討した。
- ミトコンドリア代謝におけるミトコンドリア内タンパク質ターンオーバー機構についてフローサイトメーターとwestern blotting法に解析した。

4. 研究成果

子宮内における精子認識機構の解明

- ブタの子宮内では、発情発見時には白血球数は低値であった。しかし、精子注入により3時間後には多量の白血球が検出され、その白血球は精子を貪食していた。
- そこで、精子を認識するのは子宮上皮細胞であり、その認識により白血球が遊走されてくると仮説立て、子宮上皮細胞培養系における精子との共培養の影響を検討した。その結果、精子添加により1時間以内に子宮上皮細胞におけるケモカイン発現が有意に増加した。発現上昇するケモカイン類について、それをコードする遺伝子のプロモータ領域に着目し、共通する転写因子結合サイトを予測した。その結果、NFκB と AP-1 転写因子が候補化されたことから、これらと上流のシグナル伝達系について解析を試みた。精子との共培養により子宮上皮細胞内で p38MAPK と JNK が活性化するが、NFκB のリン酸化は上昇しないことが示された。この結果から、精子は p38MAPK と JNK を介して AP-1 系転写因子を活性化し、ケモカイン類を発現することが明確化された(図1)。この両シグナル伝達系を活性化させる受容体として、TLR2 と TLR4 の重要性が示唆された(図1)。
- このケモカインに暴露された白血球は、精子への貪食能が高まることも明らかとなった。

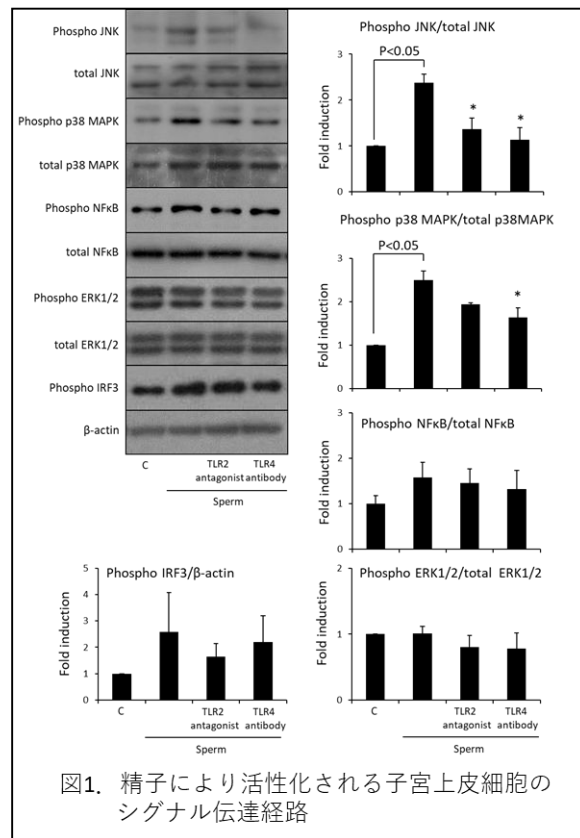


図1. 精子により活性化される子宮上皮細胞のシグナル伝達経路

子宮上皮細胞および集積した白血球に認識されない精子上向メカニズムの解析

発情期の子宮内では、グルコース濃度は低いこと、精子の運動性が良好な子宮環境ではクレアチンが高濃度含有していることが明らかとなった。

クレアチンの精子運動パターンへの役割

- クレアチンは、クレアチントランスポーターに取り込まれ、クレアチンキナーゼによりリン酸化されて、それにより PO_3^{2-} をチャージする因子である。そこで、精子の ATP 量の変化と受精能獲得への影響を検討した結果、クレアチン添加により ATP 量は高値で維持され、精子はジグザグ運動の幅が広がるとともに曲線速度が高まった(図2)。さらに、受精能獲得の指標であるチロシン残基のリン酸化も誘起されたことから、クレアチン添加が受精能獲得を促進することが明確化された。さらに、これまでの受精能獲得の指標に加えて、クレアチン添加はジグザグ運動による直進速度も早めるという新知見が得られた。
- 体内受精におけるクレアチンの影響について、クレアチン拮抗剤をマウス腹腔に投与し検討した結果、卵胞発育と排卵に影響はないが、受精率が著しく低下した(図3)。つまり、クレアチンが精子の受精能力に重要な因子であると結論付けられた。

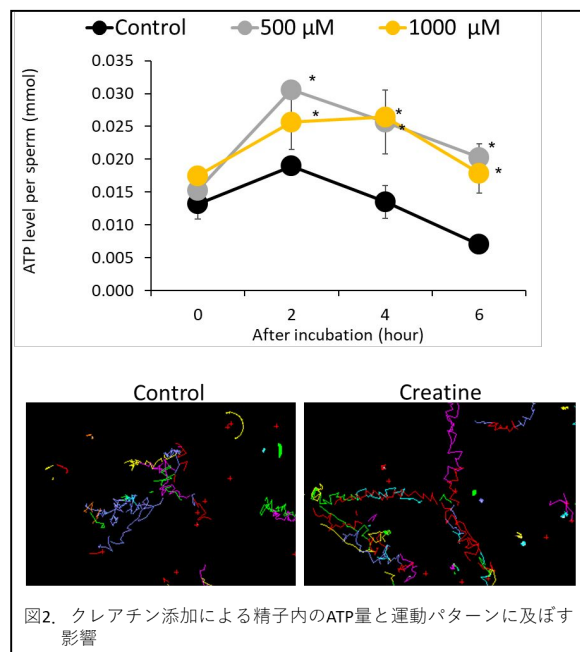
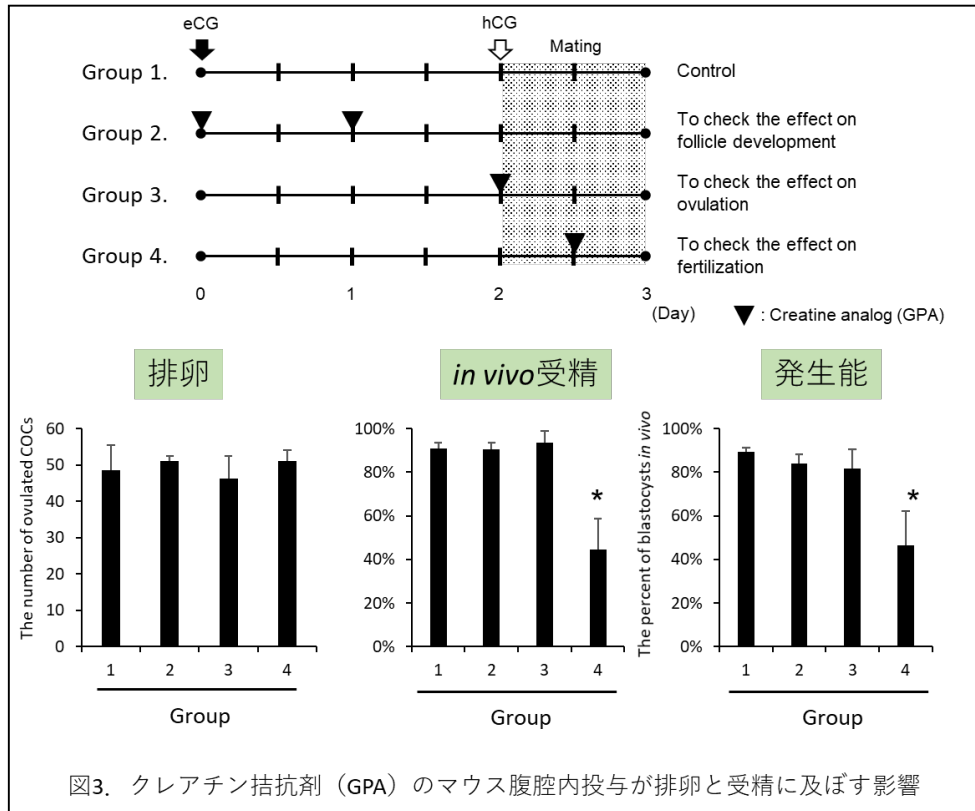


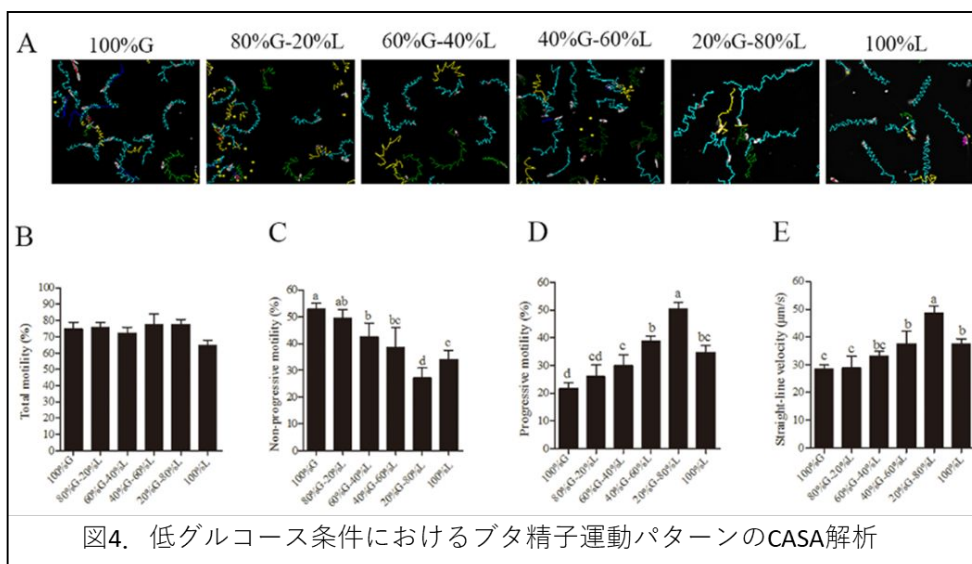
図2. クレアチン添加による精子内のATP量と運動パターンに及ぼす影響

- さらに、このクレアチンの精子受精能保持作用に着眼し、微少数精子による体外受精系の開発を試みた結果、1つの卵当たり5匹という超微少数の体外受精系を開発した。



低グルコース条件における精子運動パターンの解析

- 子宮内腔内の低グルコース条件を再現し、精子の運動パターンを解析した結果、精子の直進性が向上し、その直進速度も早まった(図4)。この時、精子のミトコンドリア活性が上昇し、ATP産生が高まることも明らかとなった。
- そこで、精子のミトコンドリアにおける電子伝達系酵素の動態を解析した結果、その量に変化はなかった。しかし、それらのうちミトコンドリアDNAがコードする遺伝子の発現が有意に上昇した。そこで、ターンオーバーが生じていると仮定し、ミトコンドリア特異的タンパク質翻訳抑制剤の影響を検討した結果、ミトコンドリアDNAにコードされるタンパク質量が減少し、直進速度も低下した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Ezz MA, Marey MA, Elweza AE, Kawai T, Heppelmann M, Pfarrer C, Balboula AZ, Montaser A, Imakawa K, Zaabel SM, Shimada M, Miyamoto A. TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro. PLoS One. 査読有, 14(4), 2019, pp.e0214516. doi: 10.1371/journal.pone.0214516.
2. Zhu Z, Umehara T, Okazaki T, Goto M, Fujita Y, Hoque SAM, Kawai T, Zeng W, Shimada M. Gene Expression and Protein Synthesis in Mitochondria Enhance the Duration of High-Speed Linear Motility in Boar Sperm. Front Physiol 査読有, 10, 2019, pp. 252. doi: 10.3389/fphys.2019.00252.
3. Bai R, Latifi Z, Kusama K, Nakamura K, Shimada M, Imakawa K. Induction of immune-related gene expression by seminal exosomes in the porcine endometrium. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 495(1), 2018 pp.1094-1101. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.100.
4. Elweza AE, Ezz MA, Acosta TJ, Talukder AK, Shimizu T, Hayakawa H, Shimada M, Imakawa K, Zaghoul AH, Miyamoto A. A proinflammatory response of bovine endometrial epithelial cells to active sperm in vitro. Mol Reprod Dev. 査読有, 85(3), 2018, pp.215-226. doi: 10.1002/mrd.22955.
5. Umehara T, Kawai T, Goto M, Richards JS, Shimada M. Creatine enhances the duration of sperm capacitation: a novel factor for improving in vitro fertilization with small numbers of sperm. Hum Reprod. 査読有, 33(6), 2018, pp. 1117-1129. doi: 10.1093/humrep/dey081.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 島田昌之, 比較生殖生物学, 精子の動物種間差, 第 24 回 日本臨床エンブリオロジスト学会, 招待講演, 2019, 広島市
2. 島田昌之, 精液成分が決定する精子の直進運動性, 第 18 回 日本 Men's Health 医学会, 招待講演, 2018, 東京都
3. 島田昌之, ブタ人工授精技術のイノベーション, 第 111 回日本繁殖生物学会, 招待講演, 2018, 長野県
4. Umehara T, Shimada M. Creatine enhances sperma capacitation and is associated with successful in vivo and in vitro fertilization in mice. 50th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, USA, 2017.
5. 島田昌之, 内分泌・代謝学的アプローチから畜産の生産性アップへ, それに貢献する繁殖技術開発, 日本分子生物学会・日本生化学会合同総会, 招待講演, 2017, 神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔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:
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)研究協力者

研究協力者氏名：宮本 明夫

ローマ字氏名：Akio Miyamoto

研究協力者氏名：今川 和彦

ローマ字氏名：Kazuhiko Imakawa

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。