

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09148

研究課題名(和文)多価不飽和脂肪酸受容体GPR120を介する精子機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of sperm function mediated by polyunsaturated fatty acid receptor GPR120

研究代表者

淡路 健雄 (Awaji, Takeo)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60297546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、長鎖不飽和脂肪酸受容体であるGPR120が、精子の機能発現にどのような役割を持つか検討した。

これまでの報告では、GPR120が機能している可能性が示唆されていた。しかしながら本研究において、1) GPR120/FFAR4機能解析に有用な優れたウサギ抗GPR120抗体が作成できた。2) マウスの成熟精子においては蛋白レベルで明確な発現は認められなかった。3) シングルセルRNAseqを行った公開データの再解析の結果では低発現ながら精子にmRNAが存在する可能性が示された。GPR120の低濃度転写物が生理学的に有意であるか、蛋白まで翻訳されているかを今後検討する必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

男性不妊治療において凍結保存精子の利用拡大が想定される。しかし、凍結保存による妊娠成立や受精率の低下がヒトにおいては臨床上的問題となっている。これを改善するため精子凍結法や融解法の改善など精子機能の維持を目的とした研究がなされてきたが、低下した精子運動性や受精能を薬物で改善させる研究は稀である。本研究では、精子運動機能改善効果があると報告されるオメガ3不飽和脂肪酸の精子機能改善のメカニズムをその受容体であるGPR120から解明しようとする独創性が高い研究であり、付随して抗体作成が困難であるGPR120研究及びオメガ3長鎖不飽和脂肪酸の研究に有用な特異抗体を作成することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of GPR120, a long-chain unsaturated fatty acid receptor, in sperm function expression.

Previous reports suggested that GPR120 may be working in sperm. In this study, 1) an excellent rabbit anti-GPR120 antibody useful for GPR120 functional analysis could be produced. 2) No clear expression was observed at the protein level in wild-type mouse sperm. 3) The results of reanalysis of the public data obtained by single-cell RNAseq showed that mRNA may be present in sperm despite low expression level. It was considered necessary to investigate whether the low level transcript of GPR120 was physiologically significant or even translated into protein.

研究分野：薬理学

キーワード：長鎖不飽和脂肪酸 長鎖不飽和脂肪酸受容体 精子 リノレン酸

1. 研究開始当初の背景

多価不飽和脂肪酸は、栄養素としての役割以外に炎症やメタボリックシンドロームを含む多くの病態に係るケミカルメディエーターとして、近年精力的に研究が進んでいる。特に、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの 3 多価不飽和脂肪酸は、抗炎症作用・抗メタボリックシンドローム作用などが知られておりその生理機能発現メカニズムの解明が急がれている。長らく 3 長鎖不飽和遊離脂肪酸の生理的作用機序を担う生体側分子は不明であった。しかし我々は新規オーファン G 蛋白共役型受容体 GPR120 をクローニングし、ドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸などの 3 多価不飽和脂肪酸がそのリガンドであることを同定してきた (Nature Med. 2005)。さらに、3 長鎖不飽和遊離脂肪酸により細胞内カルシウムの上昇を引き起こし、腸管においてはグルカゴン様ペプチド-1 を分泌し、その受容体の異常がシグナル変異を引き起こし食餌性肥満が関連することを報告している。この GPR120 の生体内局在を検討すると、腸管以外にも生殖系組織に比較的豊富に発現していることを報告しているが、その生理機能は現在不明である。

不妊症の発症メカニズムは多岐にわたり、その原因は女性側または男性側ともに存在し、単一の疾患としては理解が困難である。明らかな原因を見いだせない特発性不妊症 (原因不明不妊) の発症メカニズムの解明や治療の開発は、困難を極めている。特に、男性不妊の発症メカニズムの理解・治療においてはその多くが手探りの状態が続いている。また近年本邦における社会構造の変化による晩婚化が問題となっている。加齢に伴い明らかな精子の形態異常がなく、運動性の低下が受精率の減少につながる男性不妊が近年増加し、本邦が直面している少子化の大きな一因となっている可能性がある。精子活動性の低下に関して、マウス精子においてドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸の精子細胞膜内濃度の上昇が、精子機能 (運動性) の改善に重要であるとの報告がなされているが、なぜ、ドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸が精子運動性を上昇させるかのメカニズムは現在不明である。

2. 研究の目的

本研究において、精子機能発現に関与していると考えられる 3 多価不飽和脂肪酸の作用が GPR120 を介して発現しているか、また GPR120 の活性化によりどのような細胞伝達系が関与しているかを明らかにし、多価不飽和脂肪酸の受容体として情報伝達を担う GPR120 受容体ノックアウト・トランスジェニックマウスを用い、不妊の理解・治療における多価不飽和脂肪酸及び GPR120 の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規抗 GPR120 抗体の作成

表 1 に表示するペプチド配列を合成した。アジュバンドとともに同一ペプチドをウサギ 2 匹に注入して免疫応答を誘発した。抗体価の上昇を確認の後、30 日後すべてのウサギに追加免疫を施行した。麻酔下に採血を行い。ウサギ血清から protein A カラムを用いて抗体を精製した。精製を行った抗体は、すべて合成したペプチドを吸着したカラムにおいて最終精製を行った。

表 1: 抗体の抗原ペプチド配列

抗体名	抗原配列のアミノ酸番号	抗原配列
100	177-186	CFRVVPQRLPG
101	177-186	CFRVVPQRLPG
102	265-276	CESHQIRVSQQDF
104	306-314	C-C6-QNFKQDLVI
105	306-314	C-C6-QNFKQDLVI
106	177-202	CFRVVPQRLPGGDQEPICITLDWPNRI
107	177-202	CFRVVPQRLPGGDQEPICITLDWPNRI

(2) 新規抗 GPR120 抗体の評価

これまでの研究で利用してきた、HEK293 細胞に GPR120 発現が誘導可能な細胞を用いて抗体の評価を行った。発現誘導後、今回作成した全ての抗 GPR120 抗体で一次標識を行い、FITC 標識抗ウサギ IgG により染色を行った。フローサイトメーター (以下 FACS) を用いて 488nm のレーザー光で細胞の励起を行い、細胞個々の蛍光強度を測定した。発現の誘導の有無と遺伝子導入を行っていない細胞間及び蛍光標識を行っていない細胞における FL1 範囲内 (530±15nm) の蛍光強度の差により抗体の評価を行った。

(3) 精子における GPR120 受容体の検出

本研究においては、C57BL/6 の WT, GPR120 の TG (transgenic), KO (Knockout) マウスを用い以下の実験に使用した。

上記マウスの精巣より組織標本を作成し、抗 GPR120 抗体を用い GPR120 の検出を試みた。

また、マウスに頸椎脱臼を行い、精巣上体を摘出し精巣上体の内容物を PBS 1.5mL で懸濁した。このサンプルを一次抗体・二次抗体で染色しフローサイトメトリーの実験に用いた。全量をフィルターに通してフローサイトメトリー解析を実施した。測定時に、FSC と SSC の de-ta をもとに精子と考えられる細胞集団を選択し解析対象とした。

(4) GPR120 リガンドである リノレン酸刺激による精子活動の評価

今回、GPR120 を介する機能を明らかにする目的のため、刺激薬としてはフルアゴニストである リノレン酸を用いた。ほぼ最大反応が得られる 100 μ M ~ 1 μ M の最終濃度になるように DMSO にて希釈した リノレン酸を使用した。なお DMSO の影響を避けるため DMSO 濃度が 0.5% 以下になるように調整を行った。運動性の評価として顕微鏡下での目視による運動性の評価並びに定量化が可能であるスイムアップの変化について検討した。スイムアップは精子自身の運動性を利用した方法で、分離した精子を培養液に入れ、泳いで上がってきた精子の数を リノレン酸刺激並びに mock と比較検討した。

(5) GPR120 リガンドである リノレン酸刺激による精子機能変化の評価

マウスに頸椎脱臼を行い、精巣上体を摘出し培養液中で精巣上体から遊走してくる精子を HBSS(+Ca 2mM) に 1.0mL で懸濁した。Ca 蛍光指示薬 Fluo3AM を最終濃度 1 μ M になるように加え 37 $^{\circ}$ C 30 分、暗所で染色を行った。リノレン酸を 100 μ M ~ 1 μ M の最終濃度になるように投与を行い、蛍光強度の変化を観察した。

(6) GPR120 リガンドである リノレン酸刺激による精子 Ca カレントの評価

マウスの精巣上体から精子を取り出し、cytoplasmic droplet からパッチクランプ法で記録を試みた。cytoplasmic droplet は未成熟な精子に存在し(成熟過程の最終段階で外れる)この部分がかもっともギガシールを形成しやすいことが報告されている

(7) scRNAseq 解析による精子での GPR120 発現の検討

scRNAseq 実験のデータはすべて NCBI の gene expression omnibus に GSE104556、GSE109033、GSE109037 として公開されたデータを用いた(表 2)。R の Seurat パッケージを用いて行った。まず GEO からデータを取得し、その後各細胞のミトコンドリア遺伝子の発現の割合と発現遺伝子量をもとに QC を行った。次に Seurat のデフォルトである log Normalization を行い、PCA、そして tSNE で次元削減を行った。クラスタリングには Seurat のデフォルトである graph based clustering を用いたクラスラスタと細胞種類の対応は、Seurat で特定後既知のマーカー遺伝子と比較して求めた。

GEO 番号	species	biological replicate	others
GSE104556	C57Bl/6J mice	2	8 weeks old
GSE109033	C57BL6NTac mice	2 (or more)	adult
GSE109037	adult human	28	adult

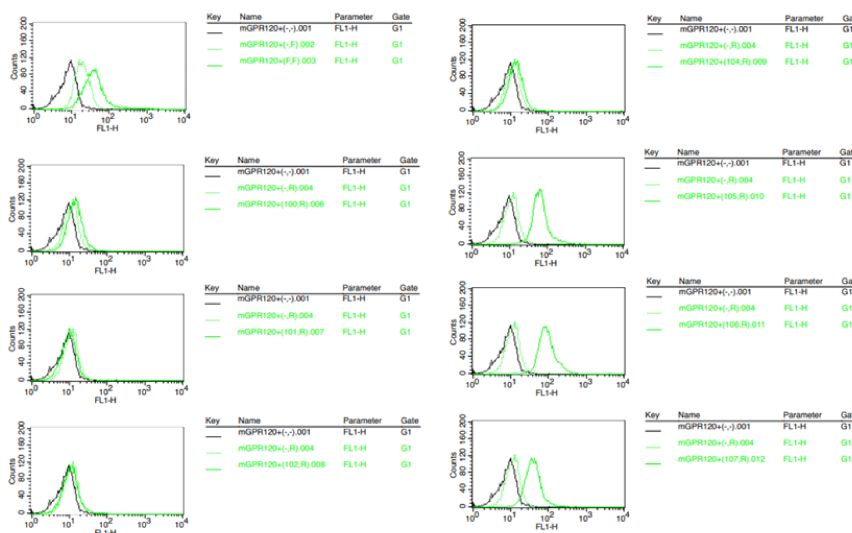
表 2

4. 研究成果

(1) 新規抗 GPR120 抗体の評価

マウス型 GPR120 をドキシサイクリン誘導で発現できるようにした HEK293 細胞を用いてフローサイトメトリーで測定した蛍光強度を図 1 に示す。抗体を加えていないコントロールを黒線で、二次抗体のみのコントロールを緑色の点線で、そして一次抗体と二次抗体を添加時の結果を緑色の線で示した。抗 FLAG 抗体では抗体なし、二次抗体のみ、一次抗体と二次抗体添加時の順に、蛍光強度の幾何平均が 7.8, 19, 37 と増加していった。これより、抗 FLAG 抗体の細胞への一次抗体特異的蛍光標識が確認された。同様に SAJ550105-107 においては、二次抗体のみの蛍光強度の幾何平均が 11.7 であり、105-107 は順に 61, 85, 36 の蛍光強度の増加を示した。ドキシサイクリン誘導を行わなかった場合は一次抗体特異的な細胞の蛍光標識は確認されなかった。

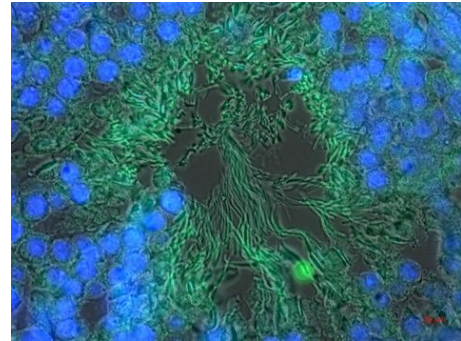
図 1



(2) マウス精子における GPR120 発現の検討

本実験においては、C57BL/6 の WT, TG, KO マウスを用いた。初期検討として WT の精巣組織標本を用い精巣内精子における発現を検討した。図2 に示す用にセルトリ細胞で GPR120 の染色が確認されたが、精巣内精子においては明らかな染色が認められなかった。このため、今回作成した特異性が高い新規抗体を用い、より検出力の高いフローサイトメトリーにて WT/KO/TG の三種類の精巣内精子を用い GPR120 のシグナルが捉えられるか検討を行った結果を図3 に示す。WT・KO の精子において今回作成した特に特異性が高い 105・106・107 の抗体においても蛍光強度の増加は確認できなかった。TG マウスに関しては、抗体染色による蛍光強度の増加傾向が見とめられたが、有意であるとは判定できなかった。GPCR の免疫化学染色において検出力を上げると報告されている Triton 処理による増感処理を行った場合においても TG 特有な蛍光強度の増加は確認されず、今回作成した抗体を用いた実験においては C57BL/6 の精子においては GPR120 の発現は認められなかった。またウエスタンブロットにおいては今回作成した全ての抗体において明らかな発現を認められなかった。

図2



(3) 機能的 GPR120 発現の検討

はじめに、顕微鏡下での精子運動の変化について リノレン酸 (100 μM~1mM) の投与の効果について検討を行った。37 10 分間顕微鏡下での目視に寄る観察において明らかな活動性の変化は リノレン酸 (100 μM~1mM) 投与において認められず、より定量的な評価が可能である、精子活動の指標となるスイムアップする精子数について GPR120 のフルアゴニストである リノレン酸 (100 μM~1mM) の投与の効果について検討を行った。遊走してきた精子を 10³ になるように調整を行い 37 30 分間でのスイムアップする精子数の差について検討を行ったが、mock 群並びに リノレン酸のどの濃度の投与群においても明らかなスイムアップする精子数には有意な差が認められなかった。

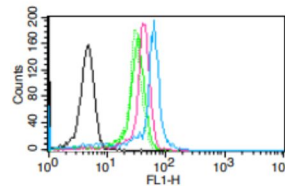
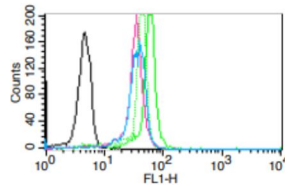
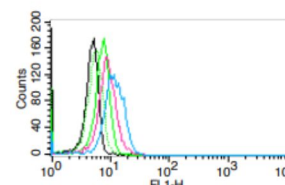


図3

Key	Name	Parameter	Gate
—	KO(-,R).001	FL1-H	G1
—	KO(105,R).004	FL1-H	G1
—	KO(106,R).005	FL1-H	G1
—	KO(107,R).006	FL1-H	G1
—	KO(107,R).007	FL1-H	G1



Key	Name	Parameter	Gate
—	WT(-,R).001	FL1-H	G1
—	WT(105,R).004	FL1-H	G1
—	WT(106,R).005	FL1-H	G1
—	WT(107,R).006	FL1-H	G1
—	WT(107,R).007	FL1-H	G1



Key	Name	Parameter	Gate
—	TG(-,R).001	FL1-H	G1
—	TG(105,R).004	FL1-H	G1
—	TG(106,R).005	FL1-H	G1
—	TG(107,R).006	FL1-H	G1
—	TG(107,R).007	FL1-H	G1

(4) 精子細胞内カルシウム濃度に対する リノレン酸の効果

カルシウム指示薬である Fluo3 で染色した精子をガラスボトムチャンバーに移し、ガラス面に張り付いている精子について細胞内カルシウムの測定を行った。細胞外液としては HBSS に 2mM の Ca²⁺ を含む条件で測定を行った。これまで報告してきた リノレン酸 (100 μM~1mM) の投与により精子においてはカルシウムの上昇は認められず、GPR120 の細胞機能への影響は殆ど認められないと考えられた。今回の測定においては精子の運動は止めておらず、動きの少ない精子での測定となっており、今後キュベットを使った多精子でのカルシウム測定を試みる予定である。

(5) GPR120 リガンドである リノレン酸刺激による精子 Ca カレントの評価

本研究では、記録をする前のギガシールの状態を作ることができなかった。cytoplasmic droplet は精子の鞭毛にあるため、動いている鞭毛が電極に当たるタイミングで、電極にかけてある陽圧を陰圧に替えることで、ギガシールの状態を作るように工夫したが、それだけでは抵抗は上がらなかった。記録できなかった原因としては、論文には書かれていないコツがある、あるいは技術不足、などが考えられた。このように、パッチクランプ法で精子からの記録を試みたが、ギガシール形成が極めて困難で記録することができなかった。

(6) scRNAseq 再解析による精子での GPR120 発現量解析

代表例として GSE109033 の再解析の結果を図 4 に示す。GPR120 と GPR137 の発現量と発現細胞を確認した。本データの解析において、GPR120 の転写物はクラスター 3 以外の細胞において 97% 以上が 0 であった。しかし、発現量の尺度を変えて TP10K が 1.0 以上の場合に発現しているとすると、クラスターで一定量発現している可能性が指摘できた。特にクラスター 3 では、12.9% の細胞が発現量がわずかながら検出できた。クラスター 1-3 は Dyrk4 の発現が確認されるため、精子形成過程の精子細胞の尾部成長時期以降に対応する。ライディッヒ細胞とセルトリ細胞での GPR120 の発現を次に確認したところ、ライディッヒ細胞とセルトリ細胞ともにほとんど発現が認められなかった。

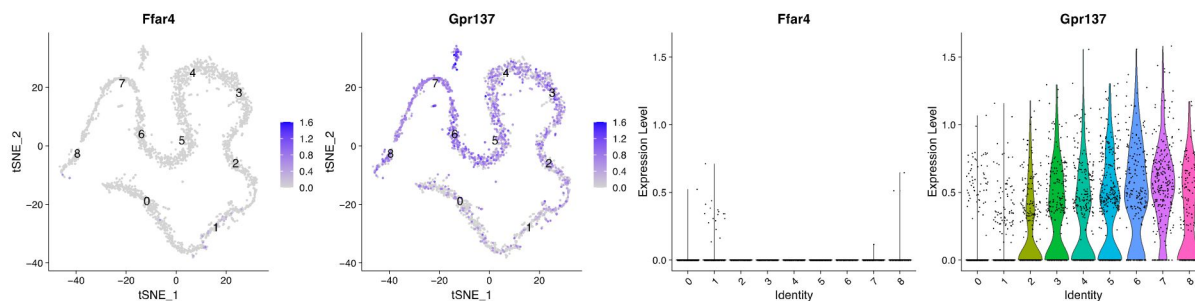


図 4

まとめ

今回の研究において作成した抗体 SAJ550105-107 は抗 mouseGPR120 抗体として、抗体標識とその後の FACS 解析に使用が可能であり、今後の GPR120 研究及びオメガ 3 長鎖不飽和脂肪酸の研究に対して有用なツールを作成することが確認できた。本研究においては C57BL/6 マウスの成熟精子において明らかな GPR120 蛋白の発現は確認できなかった。一方 scRNAseq においては、極めて低発現ながら成熟精子においても GPR120 の遺伝子の転写物が存在する可能性が示されたが、蛋白レベルへの翻訳や発現は確認できなかった。またフルアゴニストの刺激による GPR120 を介する明らかなカルシウム上昇反応・精子運動性の活性化は確認できなかった。これまでのオメガ 3 長鎖不飽和脂肪酸の精子に対する作用の研究においては、リノレン酸より GPR120 に対して力価の低い DHA や EPA の効果として報告されており、薬理学的特性が異なること、今回の結果として、マウス精子においては GPR120 の発現はあったとしても極めて微量であり、GPR120 を介するオメガ 3 長鎖不飽和脂肪酸の精子運動能に対する影響は極めて小さい可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwasa Kensuke, Yamamoto Shinji, Yamashina Kota, Yagishita-kyo Nan, Maruyama Kei, Awaji Takeo, Takei Yoshinori, Hirasawa Akira, Yoshikawa Keisuke	4. 巻 18
2. 論文標題 A peripheral lipid sensor GPR120 remotely contributes to suppression of PGD2-microglia-provoked neuroinflammation and neurodegeneration in the mouse hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-021-02361-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	田丸 文信 (Tamaru Fuminobu) (70337541)	埼玉医科大学・医学部・講師 (32409)	
研究分担者	梶原 健 (Kajiwara Ken) (80286103)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究分担者	平澤 明 (Hirasawa Akira) (70242633)	京都大学・薬学研究科・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------