

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660215

研究課題名(和文) 哺乳類精子におけるオキシトシンの新規機能解明と生殖技術への応用

研究課題名(英文) Studies on new mechanisms of oxytocin on sperm and its application to reproductive technologies in mammals

研究代表者

柏崎 直巳 (Kashiwazaki, Naomi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90298232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：一般に、凍結融解精子の運動性は低く、受精能も低い。凍結保存精子からの効率的個体復元法の開発を目的に、凍結融解精子に対するオキシトシン(OXT)がラット凍結融解精子の精子運動性に与える影響を調べた。さらに、精子におけるオキシトシン受容体(OXTR)の存在についても検討した。融解5時間目において、OXTを10 nM添加した区がControlより高い精子運動率を示した。さらに、ブタ凍結融解精子では、運動性改善効果は認められなかった。ラット凍結融解精子でOXTR遺伝子が発現しており、OXTレセプターが存在することが確認された。本研究により、OXT感作により凍結精子の運動性改善の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In general, motility of cryopreserved sperm is low, and that its fertility is low, too. The aim of this study was to develop a method to efficiently restore offspring from cryopreserved sperm, we examined that effect of oxytocin (OXT) on motility of frozen/thawed sperm. In addition, we examined existence of oxytocin receptors (OXTR) in sperm. At 5 h culture after thawing, the motility of sperm exposed to 10 nM of the Peptide OXT was significantly higher than the control (0 nM). In the porcine sperm, there is no effect of OXT on motility of the frozen/thawed sperm. In the present study, OXTR were detected in frozen/thawed sperm in the rat, mouse, and pig. The results of the present study showed that motility of cryopreserved sperm could be improved by exposure to OXT.

研究分野：動物生殖工学

キーワード：精子 凍結保存 オキシトシン オキシトシンレセプター 運動精子率 凍結融解精子 ラット ブタ

## 1. 研究開始当初の背景

現在、多くの研究分野で実験動物としてのマウス、ラットおよび家畜のブタなどで遺伝子改変動物が作製されている。これらの遺伝子改変動物は、精子あるいは胚・受精卵の状態では液体窒素中に超低温保存され、マウスでは、凍結融解精子を用いた体外受精により個体復元が行われている。一方、ラットでは凍結融解精子を用いた体外受精法が汎用的な技術となっていないことから、外科的人工授精による個体復元が行われており、我々が世界で初めて報告した人工授精プロトコルがナショナルバイオリソースプロジェクト(ラット)をはじめ、現在、標準的な方法として世界中で広く利用されている。一方、より簡便な人工授精法として、家畜で用いられているような非外科的人工授精法の開発がラットにおいても望まれている。しかし、凍結融解後のラット精子の運動率は10%程度と低いことから、現在まで、その成功例は報告されていなかった。

我々は、オキシトシン(Oxytocin, OXT)を適用してラット人工授精法の改良を試みた。OXTは視床下部で合成され、下垂体後葉から分泌される9つのアミノ酸から構成されるペプチドホルモンであり、主に平滑筋の収縮に関与することから、分娩時の子宮収縮や乳腺の筋線維を収縮することで乳汁の分泌を促すことが知られている。一方、多くの動物において自然交尾あるいは人工授精後、射出精子はわずか数分から数十分で子宮あるいは卵管上部に到達することが報告されており、この短時間での精子の移動には精子自身の運動性のみならず、子宮収縮などの雌性生殖道の運動が関わっていると考えられている。そこで、OXTを腹腔内投与したレシピエント雌ラットに凍結融解精子を非外科的に注入したところ、卵管に到達した精子の数は有意に増加し、レシピエント雌の妊娠率および産子率も有意に改善され、結果として、凍結融

解精子を用いたラット非外科的人工授精に初めて成功した。

本研究によりOXTの精子における新たな役割を明らかにすることができれば、各動物種における体外受精、人工授精等を含めた生殖工学技術に応用できるものと考えられる。これらの方法は、凍結融解後の精子にOXTを暴露するだけという極めて簡便な方法で精子運動性を改善できる可能性がある。さらに、すでにバイオリソースとして保存されている凍結精子にも直ちに利用可能となり、家畜やヒトにおける生殖工学技術の改良にも応用できると期待される。

子宮から受精の場である卵管への精子の輸送に関して子宮収縮が積極的に関与し、その収縮にOXTが関与している可能性は以前から考えられてきた。近年、東北大学の西森らのグループは、OXTおよびOXT受容体(OXTR)のノックアウトマウス(KO)を作製し、生殖機能に関する解析を行った。その結果、OXT-KO、OXTR-KOマウスともに乳汁分泌は行えないこと、しかし、分娩や産子の数には全く異常がなかったことから、子宮の収縮による精子の輸送は少なくとも、通常の分娩においては必須ではないと報告した。我々の予備検討においても、新鮮精子を用いたラット非外科的人工授精ではOXT処置を行わなくても、通常と同様に産子が得られている。また、これまでOXTによる精子輸送に関しては否定的な報告が多かったが、その原因の一つとしてほとんどの研究者は、子宮収縮と精子の関係にのみ着目してきたことが考えられる。

本研究においてOXTの精子への直接的な役割を調べるという点は、極めて斬新であると考えられる。さらに、精子凍結保存は、体外受精や人工授精等の多くの生殖工学技術において重要であり、融解後の精子運動性を改善することで、生殖工学技術の成功率を著しく改善できる可能性を含んだ非常にチャレンジ性に富んだユニークな研究であると考

えられる。

現在、多くの動物種において体外受精や人工授精等の生殖工学技術が確立されている。そのなかでもあらかじめ精子を凍結保存し、それらの技術に用いることは、雄を飼育する必要がなく、飼育スペースや飼料代等のコストが削減できることから実験動物から家畜にいたるまで、動物応用の基幹技術となっている。本研究により OXT の精子における直接的な役割が明らかになれば、それまで OXT の役割として知られていた乳汁分泌や子宮筋の収縮等とは異なる新規な知見を得られる可能性があり、生物学的にもその意義は非常に大きい。また、凍結融解後の精子運動率が低いことで知られているブタやラット等の動物、さらには精子数が十分に確保できない絶滅危惧種等の動物の人工授精や体外受精の効率改善にも応用できることから、実験動物をもちいた基礎研究のみならず畜産等の分野にも貢献できることが期待される。さらには、ナショナルバイオリソースプロジェクト等で既に凍結保存されている精子においても、融解後 OXT を添加することで運動性を改善できる可能性があることが、本研究で十分な成果が得られれば直ちに実用化することが可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、各動物種における精子の運動性における OXT の役割を分子レベルで明らかにし、凍結融解精子の運動性の改善を試み、それらの知見を生かし、実験動物・家畜における新たな生殖工学技術の開発に応用する事を目的とした。

本研究は、現在まで報告されてこなかったオキシトシンの精子における役割を明らかにし、凍結融解精子における運動性の改善を試みる。さらに運動性が改善された精子を人工授精などの生殖工学技術の改良に応用する。

## 3. 研究の方法

本研究は、オキシトシンの精子における新たな役割を明らかにすることで、凍結融解精子における運動性の改善を試みた。

また、凍結融解精子の運動性に及ぼす役割を明らかにする目的で、融解後の精子の運動性が低いことで知られている実験動物であるラットの精巢上体精子を凍結保存してモデルとして用いた。精子に暴露させる OXT は生物由来の OXT (Hormone OXT) と合成ペプチドより生成された合成ペプチド OXT (Peptide OXT) の 2 種類を比較した。Hormone OXT 濃度は 1/40000 IU、1/4000 IU、1/400 IU とし、Peptide OXT は 1 nM、10 nM、100 nM とした。さらに、それぞれの試験区に OXT を投与しない Control を加えて 4 試験区とした。融解直後より 1 時間ごとに 5 時間運動率と前進率を測定した。

ブタ射出精子およびマウス精巢上体精子も凍結保存して、融解後に OXT を種々の濃度に調整した精子培養液で一定時間培養を行い、精子運動率等をそれぞれ測定し、それぞれの動物種に至適な OXT 濃度を調べた。

OXT の検出実験ではラット用ポリクローナル抗体を用い、ラット精子を用いて RRT-PCR、western blot および免疫蛍光染色を行った。一方、ブタ射出凍結精子およびマウス凍結精巢上体精子を融解後、OXT 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、ブタ、イヌおよびマウスの精子における OXT の局在を調べた。

上記ラット精子で至適と考えられた OXT 濃度を添加した精子希釈液を開発し、ラットの凍結融解精子の人工授精を行った。

## 4. 研究成果

ラット凍結融解精子に対する OXT の影響を調べるために、メディウム R1ECM に様々な濃度の OXT を添加して、その精子運動性を調べた。この OXT は生物由来の OXT (Hormone OXT) と合成ペプチドより生成

された合成ペプチド OXT (Peptide OXT) の 2 種類を比較した。Hormone OXT は 1/40000 IU、1/4000 IU、1/400 I.U. の試験区、Peptide OXT は 1 nM、10 nM、100 nM とした。さらに、それぞれの試験区に OXT を投与しない Control を加えて 4 試験区とした。融解直後より 1 時間ごとに 5 時間運動率と前進率を測定したところ、Peptide OXT を 10 nM 添加した区が Control と比べて有意に高い運動率を示した ( $P < 0.05$ )。しかし、他の試験区間においては有意な差は認められなかった。本実験の結果より、Peptide OXT を凍結融解精子に感作させることで、その精子運動性を改善させる可能性が示唆された。さらにブタ凍結融解精子についても同様な実験を実施したが、OXT が精子運動性に対する効果は認められなかった。

また、ラット精子における OXTR に対する免疫抗体染色を施した。その結果、ラット凍結融解精子で OXTR 遺伝子が発現しており、OXTR が精子尾部に存在することが確認された。同様にマウス精子においても、OXTR が精子尾部に存在することが確認された。また、ブタおよびイヌの凍結融解精子においても、OXTR が精子頭部に存在することが確認された。

さらに、ラット凍結融解精子を 10 nM Peptide OXT に暴露したサンプルを偽妊娠誘起させた雌ラットの子宮へ注入することによって産子が得られた。

本研究では、ラット凍結精子に OXT を暴露させることにより、その運動性が改善する可能性が示唆された。また、ラット凍結精子の尾部には、OXTR が存在することが確認された。これらの研究成果から、人工授精等の生殖工学技術が改善する可能性が示唆された。

##### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Sathanawongs A, Fujiwara K, Kato T, Hirose M, Kamoshita M, Wojcikiewicz RJ, Parys JB, Ito J, Kashiwazaki N. The effect of M-phase stage-dependent kinase inhibitors on inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 (IP<sub>3</sub>R1) expression and localization in pig oocytes. *Animal Science Journal* 86: 138-147. 査読有. 2015. DOI: 10.1111/asj.12258.
2. Hisamatsu S, Sakaue M, Takizawa A, Kato T, Kamoshita M, Ito J, Kashiwazaki N. Knockout of targeted gene in porcine somatic cells using zinc-finger nuclease. *Animal Science Journal* 86: 132-137. 査読有. 2015. DOI: 10.1111/asj.12259.
3. Kaneko H, Kikuchi K, Tanihara F, Noguchi J, Nakai M, Ito J, Kashiwazaki N. Normal reproductive development of pigs produced using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *Theriogenology* 82: 325-331. 査読有. 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.04.012.
4. Nakai M, Ozawa M, Maedomari N, Noguchi J, Kaneko H, Ito J, Onishi A, Kashiwazaki N, Kikuchi K. Delay in cleavage of porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) shows poorer embryonic development. *J Reprod Dev* 60: 256-259. 査読有. 2014. DOI: 10.1262/jrd.2013-100.
5. Somfai T, Yoshioka K, Tanihara F, Kaneko H, Noguchi J, Kashiwazaki N, Nagai T, Kikuchi K. Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for in vitro embryo production. *PLOS ONE* 9: e97731. 査読有. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0097731.
6. Shibao Y, Fujiwara K, Kawasaki Y, Matsumura K, Hyon SH, Ito J, Kashiwazaki N. The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated ε-poly-L-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage. *Cryobiology* 68: 200-204. 査読有. 2014. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.01.008.
7. Watanabe H, Kohaya N, Kamoshita M, Fujiwara K, Matsumura K, Hyon SH, Ito J, Kashiwazaki N. Efficient production of live offspring from mouse oocytes vitrified with a novel cryoprotective agent, carboxylated

ε-poly-L-lysine. PLoS ONE 8: e83613. 査読有. 2013.

DOI: 10.1371/journal.pone.0083613.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 鴨下 真紀、加藤 翼、藤原 克祥、小畑 仁美、松村 和明、玄 丞然、伊藤 潤哉、柏崎 直巳、カルボキシル基導入ポリリジンを含むガラス化保存液がブタ前核期胚の発生能に及ぼす影響、日本畜産学会 第 119 回大会、2015 年 3 月 29 日、宇都宮大学(栃木県宇都宮市)

2. 柏崎 直巳、家畜のゲノム編集 地球と共生する食料や医薬品の生産系をめざして、平成 26 年度日本農学会シンポジウム「ここまで進んだ! 飛躍する農学」(招待講演)、2014 年 10 月 4 日、東京大学弥生講堂(東京都文京区)

3. Kamoshita M, Kato T, Sagara E, Hisamatsu S, Sakaue M, Sakuma T, Yamamoto T, Ito J, Kashiwazaki N. The effect of crRNA concentration of artificial nuclease microinjected cytoplasmically to pronuclear porcine embryos on survival and development in vitro. World Congress of Reproductive Biology 2014 (WCRB 2014) 2014 年 9 月 4 日、エジンバラ(スコットランド)

4. Kashiwazaki N, Fujiwara K, Kato T, Kamoshita M, Obata H, Takakusa S, Ito J. Generation of rats from vitrified oocytes with surrounding cumulus cells via in vitro fertilization with cryopreserved sperm. World Congress of Reproductive Biology 2014 (WCRB 2014) 2014 年 9 月 3 日、エジンバラ(スコットランド)

5. 鴨下 真紀、加藤 翼、小畑 仁美、松村 和明、玄 丞然、伊藤 潤哉、柏崎 直巳、カルボキシル基導入ポリリジンを含む保存液によりガラス化保存したブタ前核期胚の生存性および発生能、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 23 日、帯広畜産大学(北海道帯広市)

6. 加藤 翼、鴨下 真紀、伊藤 潤哉、柏崎 直巳、エイジングを起こしたブタ卵のカフェイン添加による ICSI 後の胚発生率の改善、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 22 日、帯広畜産大学(北海道帯広市)

7. 小畑 仁美、加藤 翼、鴨下 真紀、伊藤 潤哉、柏崎 直巳、体外発生培養液への EDTA、グルタミン添加がラット前核期胚の発生能に与える影響、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 22 日、帯広畜産大学(北海道帯広市)

8. 越智 梓、藤原 克祥、栗原 義裕、加藤 翼、鴨下 真紀、松村 和明、玄 丞然、伊藤 潤哉、柏崎 直巳、ガラス化保存した C57BL/6J マウス未成熟卵の体外受精能および産子への発育能、第 55 回日本卵子学会、2014 年 5 月 17 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区)

9. 立野 萌、藤原 克祥、加藤 翼、鴨下 真紀、伊藤 潤哉、持田 慶司、小倉 淳郎、柏崎 直巳、体外培養したラット桑実胚の High Osmolality Vitrification 法もしくはは Cryotop 法によるガラス化保存後の生存性および発生能、第 55 回日本卵子学会、2014 年 5 月 17 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区)

〔図書〕(計 4 件)

1. 柏崎 直巳、養賢堂、シリーズ 21 世紀の農学 ここまで進んだ! 飛躍する農学 日本農学会編「第 7 章 家畜のゲノム編集 - 地球と共生する食料や医薬品の生産系をめざして -」, 2015. 171 (103-119)

2. 翻訳 伊藤 潤哉、緑書房、カラーアトラス動物発生学「第 5 章 受精」, 2014. 504(63-75)

3. 翻訳 柏崎 直巳、緑書房、カラーアトラス動物発生学「第 21 章 生殖補助技術」, 2014. 504 (437-474)

4. 柏崎 直巳、朝倉書店、哺乳動物の発生工学「卵子および胚の超低温保存」, 2014. 200 (47-61)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柏崎 直巳 (KASHIWAZAKI, Naomi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号: 90298232

##### (2) 研究分担者

伊藤 潤哉 (ITO, Junya)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 30454143