

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450427

研究課題名(和文)ブタ夏季不妊症精子の発症要因解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Etiology of boar spermatozoa affected with summer infertility in an attempt to develop a novel therapy

研究代表者

村瀬 哲磨 (Murase, Tetsuma)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30303514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：夏季にブタ精子の先体反応が過敏誘起される原因の一つは精子内cAMP濃度([cAMP]i)が上昇することであると思われた。希釈液へのコレステロール添加あるいは希釈液からの重碳酸除去は冷蔵保存した精子の[cAMP]iに影響しなかった。コレステロール添加が先体反応を遅延する機序は、反応進行中である可能性が考えられた。マグネシウムの添加は先体反応を濃度依存的に低下させた。FITC-PNA染色の方法に改良を加えた。脂肪幹細胞の存在下で前培養した精子は体外受精能力が上昇した。今後コレステロール、マグネシウムおよび脂肪幹細胞が夏季不妊症精子の治療へ応用される可能性が切り開かれた。

研究成果の概要(英文)：It was considered that one of the mechanisms underlying the hypersensitive induction of the acrosome reaction may be due to an increased content of cAMP [cAMP]i in boar spermatozoa collected during summer. Addition of cholesterol or removal of bicarbonate in the semen extender did not affect [cAMP]i of spermatozoa. Thus, a mechanism that cholesterol delays the induction of the acrosome reaction may be the effect on the generation of cAMP during the process of the acrosome reaction rather than during storage. Addition of magnesium lowered the occurrence of the acrosome reaction. The staining method of sperm acrosomes with FITC-PNA was modified. Preincubation of boar spermatozoa with adipose-derived stem cells (ADSC) increased the ability of in vitro fertilizing ability. Cholesterol, magnesium and ADSC are prospective in applying to a 'therapy of boar spermatozoa' suffering from summer infertility.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：ブタ 夏季不妊症 精子 人工授精 体外受精 先体反応

## 1. 研究開始当初の背景

豚において毎年夏季に繁殖能力が低下する、いわゆる夏季不妊症が古くから国内外を問わず知られており、豚肉の生産と食料の安定的供給を脅かす脅威となっている。地球温暖化の影響はこのことを増悪させており、猛暑の年の豚肉生産量は低下する。現場から夏場における精子の受胎能力低下を防止する方法が強く求められている。

ブタにおいて、受胎率が1年のうちで最低となる夏季に採取される精子において先体損傷の精子が増加し、また体外で先体反応が過敏に誘起されることを示した。またウシにおいても種雄牛の不妊症の大きな一因が人工授精直後における精子の時期尚早な受精能獲得と先体反応であることが示されており、これらことは卵子へ受精するはるか前に時期尚早に受精能力発現が過剰進行することが精子の受精機能不全の大きな要因の一つであることを示している。しかし、過剰進行を引き起こす原因(機序)については不明であり解明の必要がある。

哺乳動物精子の受精能獲得を発現する共通の機構として、精子細胞膜からのコレステロール喪失(雌性生殖道内のアルブミン等がアクセプター)、重炭酸イオンによる精子内のカルシウム濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )上昇及び精子内cAMP濃度( $[cAMP]_i$ )上昇は国内外で広く知られている。また受精部位へ到達するために精子は直進運動性を必要とし、卵子に侵入する直前には受精能獲得、鞭毛の超活性化運動及び先体反応と呼ばれる一連の受精能力発現が必須である。さらに家畜精子の鞭毛の超活性化運動の制御機構においてcAMP依存性のシグナリング経路によりタンパクキナーゼAを介して活性化されるチロシンキナーゼがキーファクターとして機能しているが報告されている。

## 2. 研究の目的

「夏季における時期尚早の受精能獲得/先体反応の過敏誘起の原因が $[Ca^{2+}]_i$ 及びcAMP濃度が上昇していることである」という仮説を実証し、次いで「このような過敏誘起を防止することにより夏季に採取される精子の受胎成績低下を抑制できる」という仮説を実証することを目的とした。このような誘起過敏を抑えんと考えられるコレステロールを希釈液へ添加すること及び希釈液から重炭酸を除去すること(HEPESへ置換する)が、過剰発現する精子(夏季の精子)の精子内コレステロール、 $[Ca^{2+}]_i$ 及びcAMP濃度上昇を回復させるか否かを明らかにし、夏季不妊症の発症機序の解明と治療法の開発を目指す

した。以下の3点について検討を行った。

- (1) ブタ精漿及び精子中のコレステロール含有量及び精子内の $[Ca^{2+}]_i$ 及び $[cAMP]_i$ を測定し、その周年変化を明らかにする。また同一サンプル中の精子の詳細な性状(FITC-PNA染色による先体損傷パターン及びチロシンリン酸化タンパク質の免疫局在解析)及び体外において誘起される精子の先体反応の誘起パターンを調べ、三者の関連を明らかにする。
- (2) ここでは実際に受精する能力を明らかにすることを目的として、体外受精により精子の受精能力を解析し、前述の精子の詳細な性状解析、コレステロール含有量、 $[Ca^{2+}]_i$ 及び $[cAMP]_i$ と体外受精との関連を明らかにする。
- (3) 冷蔵保存精液へのコレステロールを添加(通常のBTS希釈液を使用)及び重炭酸をHEPESに置換することによる重炭酸の希釈液からの除去(BTS-H希釈液とする)が、精子のコレステロール含有量、 $[Ca^{2+}]_i$ 及び $[cAMP]_i$ へ及ぼす影響を明らかにする。同様にして保存した精子における先体反応の誘起状況及び体外受精能力を指標として、夏季の精子にみられる過剰な受精能獲得誘起がコレステロール添加と重炭酸除去により防止できるか否かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ブタ精液の採取と冷蔵保存精液の作成

農事組合法人富士農場サービス(静岡県富士宮市)で飼養されている種雄豚より手圧法にて採取された濃厚部精液を提供頂き、常法に従い一般性状検査の後希釈・冷蔵保存し実験室まで持ち帰った。必要な場合は冷蔵保存精液を送付して頂き実験室で受け取った。

### (2) 精漿及び精子内コレステロール含有量(Chol含有量)、 $[Ca^{2+}]_i$ 及び $[cAMP]_i$ の測定

精子からライセートを作成し凍結保存した。市販のキットに従い精漿中とChol含有量、 $[Ca^{2+}]_i$ 及び $[cAMP]_i$ を測定した。

### (3) 先体の損傷パターン解析:

先体染色方法に若干の改良の余地があったため、ウシ凍結融解精子を用いてFITC-PNAによる先体染色方法の方法論について検討を加えた。

### (4) 精子におけるチロシン残基のリン酸化したタンパク質の局在解析

精子の塗抹標本を作製し、チロシン残

基のリン酸化したタンパク質に対する抗体を使用して間接蛍光免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 希釈液へ Chol-PEG 添加が冷蔵保存後のブタ精子の先体反応誘起へ及ぼす影響：濃度依存的に先体反応の誘起を遅延させる効果が確認された。天然型コレステロールを添加する計画であったが、適切な溶媒が見つからず希釈液への添加が不可能であった。そのため、PEG 化により水溶性となっている Cholesterol-PEG (Chol-PEG) を使用した。

(2)  $[cAMP]_i$  の周年変化：夏季に高く冬季に低くなる傾向が認められた (Fig. 1)。保存

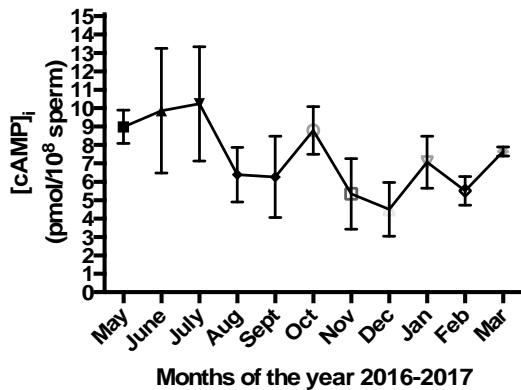


Fig. 1.  $[cAMP]_i$  の周年変化。

後の精子の直進運動率 (%) と  $[cAMP]_i$  との相関を見たところ 8 月に採取した精子においては  $[cAMP]_i$  と有意な負の相関が見られ、逆に 12 月では、有意な正の相関が認められた。3 月においては有意な相関は認められなかった (Fig. 2)。

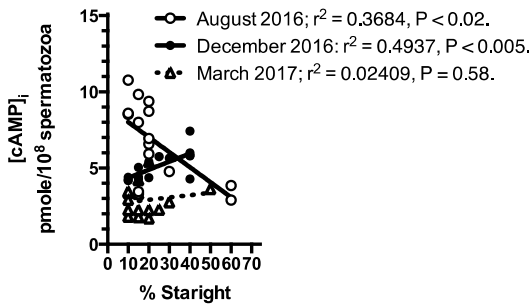


Fig. 2. 直進運動率と  $[cAMP]_i$ 。

(3) 種々の濃度の Chol-PEG を添加して希釈冷蔵保存した精子における  $[cAMP]_i$ ：冷蔵保存中に Chol-PEG を添加した影響は、保存後の精子における  $[cAMP]_i$  には明らかな影響を及ぼさなかった。採取月 8 月 (Fig. 3)、12 月 (Fig. 4) 及び 3 月 (Fig. 5) 間で  $[cAMP]_i$  を比較すると、8 月が高く、12 月と 3 月で低い傾向が見られ、周年変化を調べた結果と一致した。同様に、希釈液中の重炭酸の存否も  $[cAMP]_i$  に影響を及ぼさなかった。

(4) FITC-PNA 染色法の改良：これまでの方法に若干の改善の余地が考えられたので、ウシ凍結融解精子をモデルに用いて検討した

#### August 2016

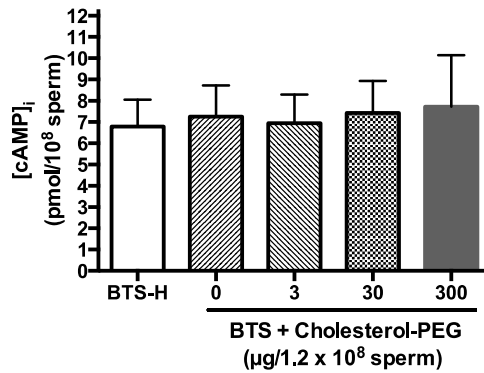


Fig. 3. 8 月における  $[cAMP]_i$ 。

#### December 2016

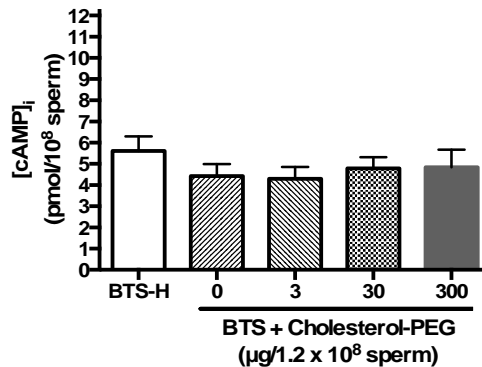


Fig. 4. 12 月における  $[cAMP]_i$ 。

#### March 2017

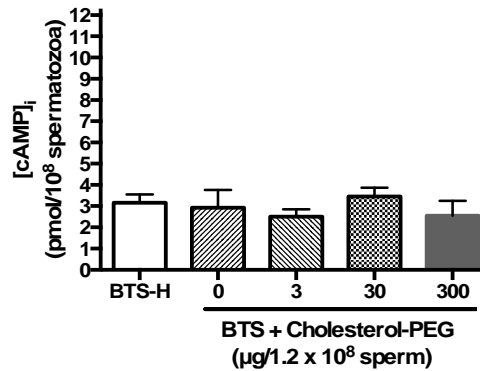


Fig. 5. 3 月における  $[cAMP]_i$ 。

結果、塗抹標本よりはバイアル内で染色する方法の有効性、良好な退色防止剤の決定、Triton-100 による透過処理濃度を減少できること、およびパラホルムアルデヒドによる有効な固定時間を確認できた。今後、改良型の方法を用いてブタ精子へ応用を行う予定である。

(5) マグネシウムがブタ先体反応の誘起へ及ぼす影響：マグネシウムはカルシウムと拮抗する作用を示すことが知られている。先行研究で、夏季に採取されるブタ精子の先体反応が過剰誘起することを突き止めたが、その原因の可能性として精子内のカルシウム濃度が高くなっている可能性が考えられた。そこで、ここではマグネシウムが先体反応の

過敏誘起を抑制できるか検討する目的で、 $MgSO_4$  あるいは  $MgCl_2$  (0.01~ 3 mM) を添加した培地 (Ca はいずれも 3 mM 添加) で先体反応を誘起した。その結果、刺激後 10 分および 15 分において、いずれのマグネシウム塩においても 0.1 mM 添加で先体反応誘起率が最低となった。0.1~3 mM  $MgSO_4$  の存在下で先体反応を誘起した場合、先体反応誘起は遅延し、その作用は 0.1 mM 添加で最も強く現れた (Fig. 6)。

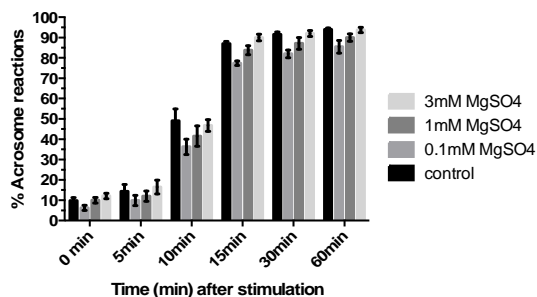


Fig. 6. 硫酸マグネシウムの添加が先体反応へ及ぼす影響。

(6)  $[Ca]_i$  の測定方法について：抽出を試みたが、抽出法を含む測定法を研究期間内に確立できなかった。恐らく精子内の Ca 含有量が Ca 測定キットの測定限界以下であることが原因と思われた。

(7) チロシンリン酸化タンパク質の局在解析：非特異反応が多く明らかな傾向は見出せなかったが、コレステロールの添加による影響は見られなかった。鞭毛におけるチロシンリン酸化は見られなかった。今後、測定方法の改善を行う予定である。

(8) 夏季不妊症発症精子は運動性が低下することから、精子の運動性の低下を防ぐことが報告されている脂肪幹細胞を用いてブタ精子を前培養し、体外受精に供した。その結果、侵入率 (Fig. 7)、多精子受精率 (Fig. 8)、1 侵入卵子当たりの平均侵入精子数 (Fig. 9) 及び雄性前核形成率 (Fig. 10) は、脂肪幹細胞添加により有意に上昇した。このことから、脂肪幹細胞が精子の受精能力を高めている可能性が考えられた。

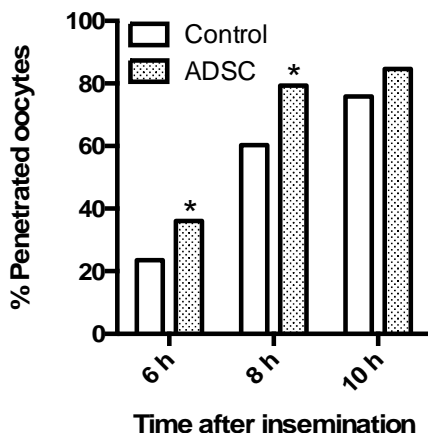


Fig. 7. 侵入率。

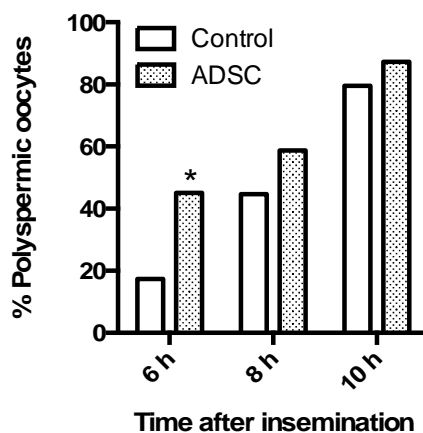


Fig. 8. 多精子侵入率。

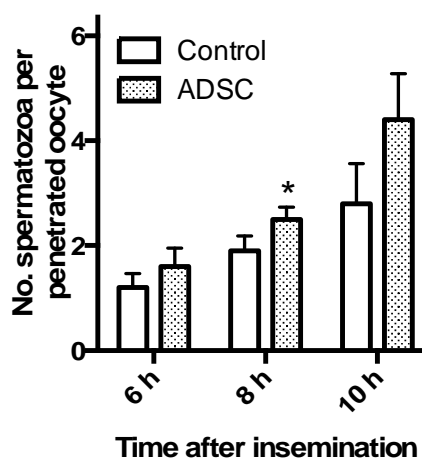


Fig. 9. 1 侵入卵子当たりの平均侵入精子数。

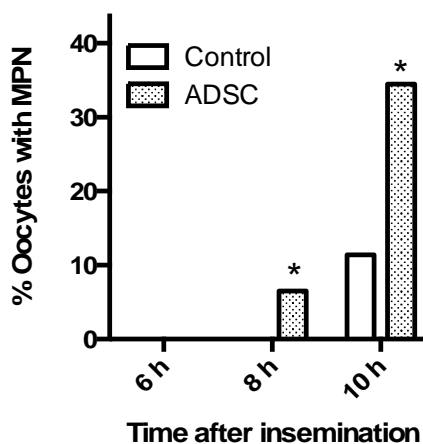


Fig. 10. 雄性前核形成率。

(9) Chol 含有量の測定は、キットの測定可能な濃度範囲が限定されているため困難であった。

まとめ

夏季に採取されるブタ精子の先体反応が過敏誘起される原因のひとつは  $[cAMP]_i$  が夏季に上昇することであると思われた。しかし、 $[Ca]_i$  の測定法が確立できなかったため、この濃度の夏季における上昇がもうひとつの原因であったか否かは不明であった。

Chol-PEG を添加した希釈液で希釈後冷蔵保存した精子においては、無添加と比較して精子内 cAMP 濃度は影響されないことが示された。このことから、Chol-PEG を添加した冷蔵保存により、保存後の先体反応が遅延する機序は、保存中の [cAMP]<sub>i</sub> の上昇ではなくむしろ保存後受精能力発現進行中である可能性が考えられた。また、希釈液中の重炭酸の存在は保存中の [cAMP]<sub>i</sub> に影響を及ぼさなかった。

FITC-PNA 染色の方法に改良を加えたので、今後この方法を用いてブタ精子の性状解析が可能であると思われた。

本研究の結果から今後コレステロールの添加あるいはマグネシウムの添加が夏季不妊症精子の先体反応過剰誘起を緩和する方法として用いられることが期待された。また、脂肪幹細胞がブタ精子の体外受精能力を高めることが示され、今後この細胞を用いた夏季不妊症治療へ結びつく可能性が切り開かれた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Rajabi-Toustani, R., Akter, S., 星野洋一郎, 向島幸司, 坂口慎一, 村瀬哲磨.  
Modifications of methodology for the staining of frozen-thawed Japanese Black bull sperm acrosomes with fluorescein isothiocyanate peanut agglutinin (FITC-PNA). 第 159 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 430, 2016 (藤沢).
2. Yamamoto, T., Murase, T., Shimizu, K., Koide, A., Kuwahara, Y., Suzuki, S., Matsukawa, Y., Gotoh, M. Funahashi, Y. Summer Infertility of Boar Spermatozoa and Its Therapy by Adipose-Derived Stem Cells and Cholesterol. 18th International Congress on Animal Reproduction, Abstracts p. 231, Tours, France, 2016.
- 3.

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
村瀬 哲磨 (MURASE, Tetsuma)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30303514

(2) 研究分担者  
原山 洋 (HARAYAMA, Hiroshi)  
神戸大学大学院農学研究科・教授

研究者番号：30281140

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
清水 健司 (SHIMIZU, Kenji)