

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：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450456

研究課題名(和文) ラクトフェリンによるTLR様受容体を介した精子形成異常制御機構の解析

研究課題名(英文) Suppression mechanism of sperm cell death with lactoferrin mediated by TLR

研究代表者

竹内 崇師 (Takeuchi, Takashi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：10325061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラクトフェリンによるTLRを介した精子形成異常の制御機構を解明するために実験を企図した。

材料としてマウス精子を用い、菌体成分とラクトフェリンと共培養した後、アポトーシスを誘導された細胞を免疫組織学的手法を用いて検討すると共に、アポトーシスに関連する遺伝子の発現を生化学的手法を用いて検討した。その結果、ラクトフェリンが細菌による精子アポトーシスを抑制すると共に、受精能や胚の発生にも影響しないことが明らかとなった。以上のことから、ラクトフェリンラクトフェリシンによる細菌に起因する精子形成異常と細胞死が抑制されることが明らかになるとともに、受精率や着床率の向上が認められることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Experiments were designed to elucidate the mechanism of TLR mediated spermatogenesis by lactoferrin. We used mouse sperm as a material, co-cultured with bacterial cell component and lactoferrin, then examined cells induced to undergo apoptosis using immunohistological method, and analyzed the expression of genes related to apoptosis by biochemical method and examined. As a result, it was revealed that lactoferrin suppresses sperm apoptosis by bacteria and does not affect fertility and embryogenesis. From the above, it became clear that spermatogenesis and cell death caused by bacteria by lactoferrin lactoferricin were suppressed, and it was revealed that fertilization rate and implantation rate were improved.

研究分野：実験動物学

キーワード：ラクトフェリン ラクトフェリシン TLR アポトーシス 常在細菌 胚移植 胚着床 精子

1. 研究開始当初の背景

生物にとって生殖は、種の保存において根幹を成す最も重要な生命現象の一つである。哺乳類は精子と卵子による有性生殖を行うが、これら配偶子の発生や産生には減数分裂・形態形成・成熟といった数多くの複雑な過程が順序立てて行われていることから、配偶子の形成異常は受精卵の発生や着床に深刻な影響を与える。中でも生殖器への病原体の感染は、不妊の重要な要因の一つとして挙げられる。特に精巣への細菌感染は、病変部へ集積した免疫細胞が発現するTLRにより細菌の存在が認識され、精子細胞へ細胞死を誘導することが知られている。TLRは動物の細胞表面に存在する膜貫通型受容体ファミリーで、自然免疫において病原体の認識に必須であり、獲得免疫の誘導にも関与する。哺乳類では十数種類のTLRが認められ、各々のTLRを活性化するリガンドとして種々の細菌由来の内毒素が同定されている。生殖器粘膜でもTLRの発現は見られるが、近年精子細胞でTLR2及び4が認められ、TLRを介した精子の形成異常や細胞死が、細菌由来リガンドにより誘導されることが報告された(Fujita, Y. et al., Hum. Reprod. 2011)。従来精子の培養液には抗生物質が添加され、細菌の繁殖を抑制する工夫がなされているが、ヒトではおよそ3割もの精子提供者の精液中に細菌が存在することから(Fujita, Y. et al., Hum. Reprod. 2011)、抗生物質の添加はむしろ菌体の崩壊と内毒素の放出を誘導し、精子の形成異常を促進させる。このことから精巣からの細菌除去が望まれるが、精液中に認められる細菌には種差があり、ヒトやマウスではグラム陽性菌が大部分を占めているが、グラム陽性菌の内毒素でありTLR2の主要なリガンドであるペプチドグリカン中和する薬剤は未だ報告されていないことから、採取後の精液から速やかに精子を分離することが、現在のところ有効な手段である。一方、多くの細菌は生育に鉄を必要とするが、鉄結合性

の糖蛋白質であるLfは、鉄を奪い去ることでグラム陽性・陰性菌に関わらず静菌作用を示すことが知られている(Ward, P. P. et al., Cell. Mol. Life Sci. 2005)。Lfは母乳を始めとする汗や唾液等の外分泌液中に含まれ、哺乳類の自然免疫において重要な役割を果たす。Lfの免疫機能は抗菌作用、抗ウイルス作用、抗真菌作用など多岐に渡るが、特にLfの抗菌活性に関しては、グラム陰性菌の内毒素でありTLR4の主要なリガンドであるリポポリサッカライドと結合することにより、TLR4の下流シグナルを抑制する殺菌作用が報告されている(Latorre, D. et al., Biochem. Cell Biol. 2012)。我々のグループはLfの体内動態に関する研究を行ってきたことから、Lfが精子の性状に何らかの変化を及ぼすかどうかを確認するために、マウス精子をLf添加培養液中で数時間培養した。その結果、Lfを添加した培養液では、未添加のものと比較して精子細胞の異常及び細胞死数が減少することに加え、TLRの主要な下流シグナルである転写因子NF- κ Bの遺伝子発現が低下することを確認した。以上のことより我々は、LfによるTLRを介した精子形成異常の制御機構を解明する研究を企図した。

2. 研究の目的

前述の様にLfはグラム陰性菌に対してはTLR4を介した殺菌効果を示すが、グラム陽性菌に対しては静菌的な作用のみが知られている。しかしながら近年、抗原提示細胞である樹状細胞を用いた免疫寛容の誘導実験から、LfがTLR2の下流シグナル伝達を抑制する結果が報告された(Latorre, D. et al., Biochem. Cell Biol. 2012)。その一方で、多くの外分泌液中にはペプチドグリカンを破壊するリゾチームが含まれているが、精液中にもリゾチームが分泌されることが報告され(Huang, P. et al., Mol. Immunol. 2011)。精巣におけるグラム陽性菌に対する自然免疫応答の一端が

明らかとなった。さらにLfが胃消化酵素で分解されることにより生成される活性化ペプチドは、グラム陽性菌に対しても強力な殺菌作用を発揮することが以前より知られている。以上の知見はLfによるTLR2を介したグラム陽性菌の殺菌作用を強く示唆することから、本研究では次の項目について検討を行った。

(1) Lf経口投与後の精子におけるTLR2、4の機能解析

(2) Lf経口投与後の精子の受精能及び胚着床能の検討

3. 研究の方法

TLR2または4を介した精子の形成異常や細胞死の発現に対するLfの抑制機構を解明するためには、(1) どのような遺伝子が、精子細胞の形成異常等に関与しているのか？(2) 逆に言えば、何の遺伝子が精子の形成に関与しているのか？(3) Lfの作用により形成異常を免れた精子は、正常な授精能を有するのか？(4) 更に受精卵は、胚又は胎仔として発生することが出来るのか？について明らかにする必要がある。そこで本研究では、以下の解析を行った。

(1) Lf経口投与後の精子におけるTLR2、4の機能解析

精子運動能や形態異常の観察

RT-PCR法およびリアルタイムPCR法を用いて、マウスの精子のTLR2または4のmRNAレベルを測定

免疫組織化学および*in situ*ハイブリダイゼーション法

Lf経口投与後の精子の受精能及び胚着床能の検討

Lf経口投与後の胎仔の発生の検討

4. 研究成果

本研究では以下の事柄を明らかにした。

・ラクトフェリンおよびラクトフェリンの分解産物であるラクトフェリシンについて、C57BL/6およびICRマウスに連続経口投与し

た後に精巣上体を採取し、精液中への体内移行をウエスタンブロットング法により確認した。続いて精液中の精子細胞が発現するアポトーシス関連遺伝子をリアルタイムPCR法により検出した。また尿管に認められる細菌群の相違をラクトフェリンおよびラクトフェリシン投与群と未投与群において比較検討した。さらにTLR2および4のリガンドであるLPSおよびPam3cysと共にラクトフェリンおよびラクトフェリシンを精子培養液に添加することで、形態異常等の変化の有無を蛍光抗体法を用いて検出した。

・ラクトフェリンおよびラクトフェリシンと共に培養した精子を用いて体外受精を行い、発生した胚の分化に関連する機能的な遺伝子の発現について、リアルタイムPCR法により検出した。続いて発生した胚を仮親のマウス卵管に移植し、着床や胚の発生状況を確認した。また免疫染色及び*in situ* hybridization法を用いてタンパクおよび遺伝子の発現について検討すると共に、リアルタイムPCR法により関連遺伝子を検出した。

以上の結果から、ラクトフェリンラクトフェリシンによる細菌に起因する精子形成異常と細胞死が抑制されることが明らかになるとともに、受精率や着床率の向上が認められることが明らかとなり、生殖医療に貢献し得ることが示された。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

〔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

竹内 崇師 (Takeuchi Takashi)
鳥取大学・農学部共同獣医学科・教授
研究者番号：10325061

(2) 研究分担者

山野 好章 (Yamano Yoshiaki)
鳥取大学・農学部共同獣医学科・教授
研究者番号：00182593

(3) 研究分担者

竹内 崇 (Takeuchi Takashi)
鳥取大学・農学部共同獣医学科・教授
研究者番号：20216849

(4) 研究分担者

浅野 淳 (Asano Atsushi)
鹿児島大学・農学部獣医学科・教授
研究者番号：90312404