

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08103

研究課題名(和文) コレステロールによるブタ夏季不妊症精子の治療効果メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms that cholesterol exerts its therapeutic effects on boar spermatozoa affected with summer infertility

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロールを添加して10日まで冷蔵保存した豚精子において精子内 cAMP 量は不変であった。保存後において先体反応進行中の精子内 cAMP 量は若干低下した後上昇する傾向が見られた。マグネシウムが豚精子の膜を安定化することが示されたが、ポリミキシンBは逆に先体反応を増強した。比較の目的で牛精子を用い、先体損傷度、ハイパーアクチベーション及び先体反応誘起能力はそれぞれ独立した指標であることが示された。卵子の体外成熟培養中に脂肪幹細胞と機械的振動を与えることにより成熟後の精子の侵入率が上昇した。豚精子の運動性及び受精能力を高めることが知られている脂肪幹細胞を極めて効率の高い採取方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、豚精子は冷蔵保存中10日間までは少なくとも機能が安定的に保たれていたことは人工授精に用いる時に役立つ有力な情報となったこと、cAMP含有量が精子の機能状態の指標になりることが考えられたこと、及びマグネシウムと脂肪幹細胞はコレステロールと共に夏季不妊症精子の緩和に役立つと思われることが挙げられる。社会的意義としては、本研究の結果は豚の夏季不妊症解明の一助となり、夏季不妊症による繁殖効率の低下を緩和できれば、1年を通じた安定的な豚の繁殖につながり、豚肉の安定的供給に貢献貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：cAMP content of boar spermatozoa stored up to 10 days with added cholesterol was not different among storage days. cAMP content in spermatozoa stored and incubated for stimulation of the acrosome reaction with the calcium ionophore A23187 slightly decreased and then rose during stimulation. Magnesium decreased the acrosome reaction triggered by A23187 while polymyxin B enhanced it. When frozen-thawed bull spermatozoa were used as a model, damaged acrosome, hyperactivation and the acrosome reaction were independent parameters from one another, suggesting that this should be taken into account when boar sperm function is investigated. Exposure of immature oocytes to adipose-derived stem cells (ADSC) and/or mechanical vibration during maturation in culture led to the increase in the sperm penetration and male pronuclear formation. A very effective method to collect, isolate and culture ADSC has been established in order to use them for increasing fertilizing ability of boar spermatozoa.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：豚 精子 夏季不妊症 人工授精 先体反応 ハイパーアクチベーション cAMP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ブタにおいては夏季の高温により繁殖性が低下するので妊娠期間約4ヶ月と肥育期間約6ヶ月後の時期に相当する春先に出荷頭数が減少し、価格が高騰する。一方、地球温暖化は長期的持続の様相を呈し、気温の上昇は留まらない(全国地球温暖化防止活動推進センターホームページ)。ブタの繁殖において毎年夏季不妊症により受胎成績が低下することは国内外を問わず古くから知られており、<sup>32</sup>以上の気温が3日間以上持続すると精子形成へ影響が出ることが知られている。このため、地球温暖化の影響でブタの夏季不妊症が悪化し、豚肉生産性の低下が将来的に大きく影響を受けることが脅威となっており、早急な繁殖性の回復が急務である。

### 2. 研究の目的

夏季に夏季不妊症を発症したブタ精液の受胎性を回復させることを目的として、夏季のブタ精子に起きる膜の不安定化をコレステロールが緩和することを明らかにしたが、その機序が不明のままであった。本研究では、冷蔵保存精子へのコレステロール添加が保存後の精子へ及ぼす作用機序を知る目的で、保存中精子へのコレステロール添加が保存後、精子の機能へ及ぼす影響を調べた。また、コレステロール以外で豚精子の受精能力を上昇させる因子の模索を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 豚精液の冷蔵保存

富士農場サービスより種雄豚の精液を提供頂き、BTS希釈液にて希釈した。17の恒温槽内で実験室まで持ち帰り、精子の解析を行った。

#### (2) 精子の先体反応誘起

冷蔵保存精子(一部牛凍結融解精子を使用)を洗浄し、培養液に再浮遊した後、カルシウムイオノホア A23187 を添加することにより先体反応を誘起した。一定間隔後精子を取り、先体反応誘起された精子の割合を測定した。また、精子を0.1 M HCl/1% Triton X-100 と混合することにより cAMP を抽出し、cAMP の測定まで -80°C にて保存した。ジアシルグリセロールの測定のためには、Bligh and Dyer (1959) の方法により脂質を抽出した。精子内 cAMP 量は、市販の測定キット(Direct cAMP WLIISA kit, Enzo Life Sciences Inc. NY)を用いて測定し、ジアシルグリセロール(DAG)量は薄層クロマトグラフィーにより測定した。

#### (3) 精子のハイパーアクチベーション誘起

同様に牛凍結融解精子を洗浄後培養液に再浮遊し、cAMP アナログである cBiMPS により精子を刺激しハイパーアクチベーションを誘起した。先体反応の誘起実験の一部と共にサンプル数の多く集められる牛の凍結精液をモデルとして使用した。

#### (4) 先体の染色(先体の損傷度)

牛凍結融解精子をモデルとして先体を FITC-結合 Peanut Agglutinin (FITC-PNA) を用いて染色した。精子を洗浄後、パラホルムアルデヒドで固定した後、洗浄し、1% Triton X-100 により透過処理を行った。洗浄後、精子を FITC-PNA 染色液に再浮遊し、30 分間染色した。洗浄後精子を退色防止剤と混合し、蛍光顕微鏡下で先体を観察した。

#### (5) 脂肪幹細胞の培養

屠場より豚及び牛の皮下脂肪を採取し、ペニシリン G カリウムおよび硫酸ストレプトマイシンを添加した Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) に入れ実験室まで持ち帰った。また、細胞培養にコンタミネーションを引き起こさない脂肪幹細胞の採取方法の検討の目的では、ペニシリンとストレプトマイシンの入った HBSS にさらにアンホテリシン B と培養細胞の生存率が影響を受けないが細菌の増殖を抑制できる極低い濃度の塩化ベンザルコニウムを添加し、この中へ皮下脂肪を入れ屠場より持ち帰った。

脂肪組織よりコラゲナーゼ処理により幹細胞を単離し、洗浄ののち培養により増殖させた。増殖した細胞を凍結保存し、使用前に播種することにより再度増殖させた。

#### (6) 体外受精

と畜場より未成熟豚の卵巣を採取し、実験室へ持ち帰った後、卵子を吸引採取した。脂肪幹細胞を 24-ウェルプレートに播種しモノレヤーになるよう培養した。採取した卵子を 4 グループに分け、1) NCSU37 培地で培養、2) NCSU37 培地の中で脂肪幹細胞モノレヤーの上で培養、3) 機械的振動(「時々ブルブル」、ストレックス社; 強度 2, 周波数 27.1 Hz, 60 分間隔で 5 秒間振動)を与えて培養、4) 脂肪幹細胞のモノレヤー上で同時に機械液振動を与えて培養した。卵子の成熟培養では、最初の 20 時間にジブチル cAMP、馬絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)及びヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を添加し、その後これらを除いた培地でさらに 24 時間培養した。

富士農場サービスより提供頂いた豚精子を洗浄し、1.5 時間前培養の後上記の通り 4 種類の条件下で成熟培養した卵子へ授精した。8 時間後卵子を固定し、染色後精子の侵入状況を観察した。

### 4. 研究成果

1) コレステロールを添加して 10 日まで冷蔵保存した豚精子においては精子内 cAMP

- 量は不変であった ( 図 1 ). このことから, 先の研究で精子内 cAMP 量がコレステロールの添加によっても保存後に変化しなかった原因がこのことであると思われた.
- 保存後の豚精子を洗浄し, A23187 により先体反応を誘起し, 経時的に精子内 cAMP 量を測定した結果, 先体反応進行中には若干低下した後再び上昇する傾向が見られたが ( 図 2 ), 例数不足のため正確ではなかった. なお, 同様にシグナル分子としてジアシルグリセロールの測定を行ったが, バンドの分離に困難があり完全に解決できなかったため期間内での測定を断念した.
  - 硫酸マグネシウム ( 図 3 ) あるいは塩化マグネシウム ( 図 4 ) が豚精子の先体反応を抑制したことから, マグネシウムが豚精子の膜の安定化を起こすことが示唆された. しかし, ポリミキシン B は逆に先体反応を増強した ( 図 5 ).
  - 比較の目的で牛精子を用い, 先体損傷度測定, ハイパーアクチベーション誘起及び先体反応誘起を行った. 先体反応の誘起率の上昇の速さを Hillslope の計算により比較したところ, 3 パターン ( S 字状に上昇, 緩やかに上昇及び急速に上昇 ) に分類できた ( 図 6a, 6b 及び 6c ). ハイパーアクチベーション誘起により精子が示す円運動の割合をハイパーアクチベーションの指標とした (%C). これらの異なる先体反応パターンを示す個体は, それぞれ異なる %C の値を示し ( 表 1 ), 先体損傷度とも独立していたことから, これらの 3 者は互いに独立した指標であることが示された. このことから, コレステロールの作用機序の解明に, 豚精子の機能解析を行う際にこのことを考慮に入れるべきであることが予測された.
  - 卵子の体外成熟培養中に脂肪幹細胞と機械的振動を卵子に与えることにより精子の侵入率, 前核形成率及び多精子侵入率が上昇した ( 図 7a-c ).
  - 精子の運動性と受精能力を高めることが知られている脂肪幹細胞をコンタミネーションなく効率的に採取及び培養する方法を検討した結果, 屠場由来の脂肪組織を抗生物質に加え細胞の生存性を損なわない濃度の塩化ベンザルコニウムを添加することにより, コンタミネーションを防ぐことができ, 極めて高い高率で細胞を得られることが明らかとなった.

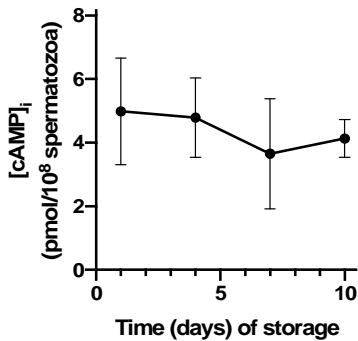


図 1. 冷蔵保存後における豚精子内 cAMP 量 ( 平均値 ± 標準誤差 )

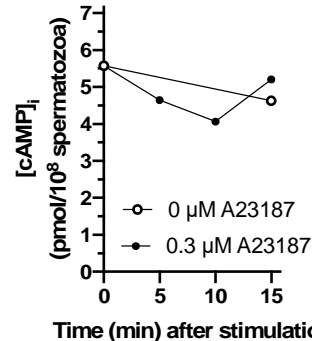


図 2. 先体反応誘起中における精子内 cAMP 量の変化

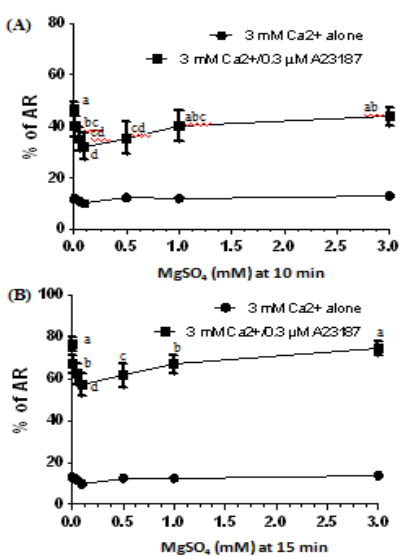


図 3. 硫酸マグネシウムによる先体反応の抑制 ( 平均値 ± 標準誤差 )

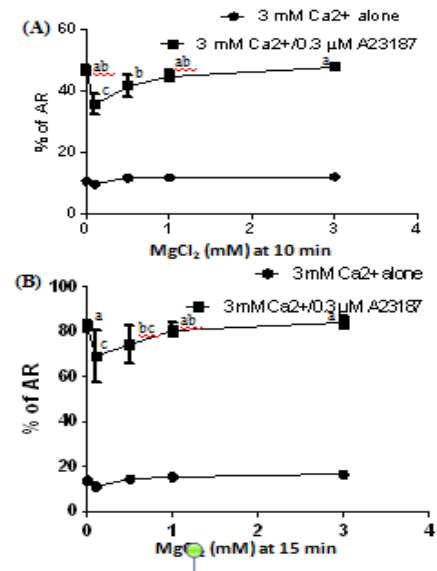


図 4. 塩化マグネシウムによる先体反応の抑制 ( 平均値 ± 標準誤差 )

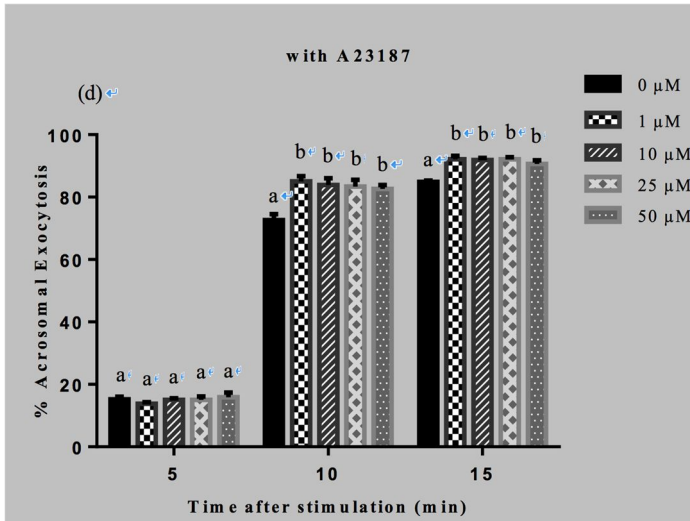


図 5. ポリミキシン B が豚先体反応へ及ぼす影響 .

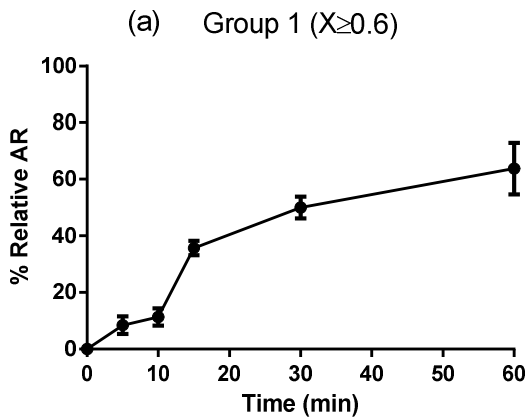


図 6a. 先体反応グループ 1 の先体反応 .

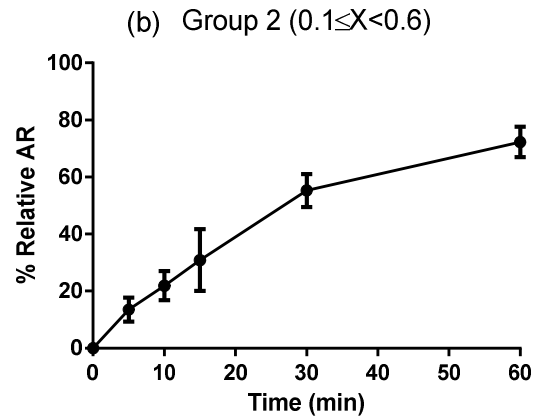


図 6b. 先体反応グループ 2 の先体反応 .

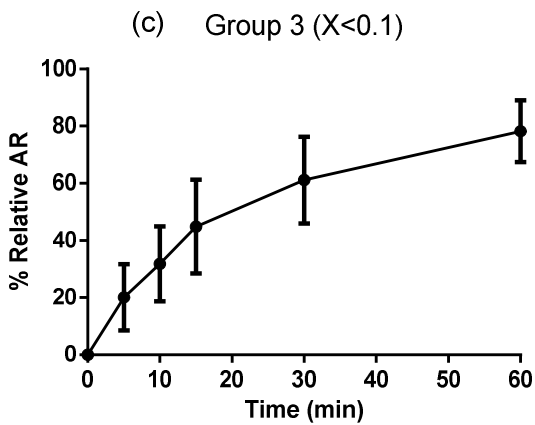


図 6c. 先体反応グループ 3 の先体反応 .

表 1. 先体反応グループとハイパーアクチベーション誘起能力 (%C) との関連

Bull	% Total	% Progressive	% Viability	% Normal	% C	Hillslope	AR group
	motility	motility		morphology	at 60 min		
A	50	15	29.5	90	16.7	0.06	3
B	50	20	19	87	0	0.11	2
C	60	30	35	89	0	0.04	3
D	70	40	53.5	88	41.7	0.13	2
E	60	40	59	93	33.3	0.19	2

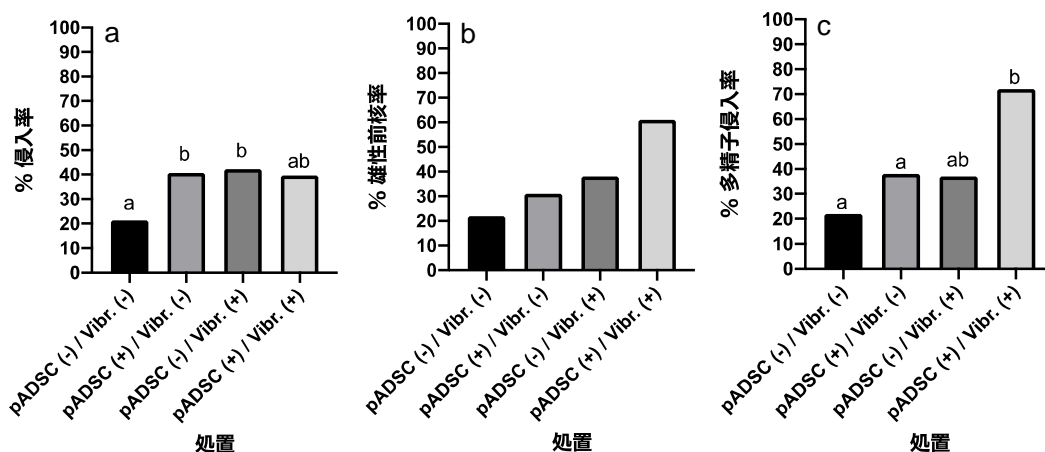


図 7a-c. 脂肪幹細胞 (pADSC) と機械的振動 (Vibr.) のいずれか一方あるいは両者の存在下で体外成熟した豚卵子の体外受精。a, 侵入率; b, 雄性前核形成率; c, 多精子侵入率

(残った課題)

- (1) 豚コレラの発生により材料採取が不可能となり, コレステロール添加しない未処理の精液を提供頂いただけとなり実験が困難であった。そのため, 例数不足が多くあり今後, 例数を重ねて本研究で得られた結果を確認する。
- (2) 先体反応進行中における精子内 cAMP 含有量の変化および保存期間中に添加したコレステロールがこのことに及ぼす影響を確認する必要がある。
- (3) 精子のジアシルグリセロール量の測定方法の改善と確立が必要である。
- (4) 冷蔵所存中におけるコレステロールの添加が保存後の精子の先体反応におけるジアシルグリセロール生成及び体外受精へ及ぼす影響を確認する必要がある。
- (5) cBiMPS によるブタ精子のハイパーアクチベーション誘起中におけるチロシン残基のリン酸化が未解明のままとなった。
- (6) 夏季における精子の膜を安定化させるために, コレステロールの添加が有効であるが, この物質以外にもマグネシウムと脂肪由来幹細胞が候補として本研究から上がったので今後これらの有効性の確認が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Rajabi-Toustani R, Akter QS, Almadaly EA, Hoshino Y, Adachi H, Mukoujima K, Murase T	4. 巻 81
2. 論文標題 Methodological improvement of fluorescein isothiocyanate peanut agglutinin (FITC-PNA) acrosomal integrity staining for frozen-thawed Japanese Black bull spermatozoa.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 694-702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Akter QS, Rajabi-Toustani R, Shimizu K, Kuwahara Y, Murase T	4. 巻 0
2. 論文標題 Polymyxin B enhances acrosomal exocytosis triggered by calcium and the calcium ionophore A23187 in ejaculated boar spermatozoa	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anim Sci J	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13155	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akter QS, Rajabi-Toustani R, Shimizu K, Kuwahara Y, Murade T.
2. 発表標題 Effect of polymyxin B on motility, viability and acrosomal exocytosis induced by calcium and calcium ionophore A23187 in ejaculated boar spermatozoa
3. 学会等名 第 111 回日本繁殖生物学会大会（上田）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reza Rajabi-Toustani, Sharmin Akter, Yoichiro Hoshino, Koushi Mukoujima, Shin-ich Sakaguchi and Tetsuma Murase
2. 発表標題 Comparison among standard semen analysis, acrosomal integrity by FITC-PNA and the ability to undergo the acrosome reaction in response to calcium and the calcium ionophore A23187 in frozen-thawed Japanese Black bull spermatozoa
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology, 27-29 September, 2017, Okinawa（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔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	原山 洋  (Harayama Hiroshi)  (30281140)	神戸大学・農学研究科・教授    (14501)	