

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02327

研究課題名(和文)リラキシンとその関連因子の受精を取り巻くネットワークシステムの存在とその機能解明

研究課題名(英文)Existence and function of the network system surrounding fertilization of relaxin and related peptides

研究代表者

高坂 哲也 (Kohsaka, Tetsuya)

静岡大学・農学部・特任教授

研究者番号：10186611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブタ卵巢で発現するリラキシン(RLN)とその関連因子(INSL3)の役割について、受精を取り巻く生殖プロセスとの関連で捉え、これらのネットワークシステムの存在とクロストーク機構を究明した。その結果、RLNは交尾時には子宮内の生理的炎症を制御する新規因子として機能し、排卵時にはタンパク質分解カスケード分子を活性化することで排卵に寄与し、受精時には精子の受精能を刺激し得ること、一方、INSL3はE-カドヘリンをアップレギュレートすることで卵子との接着・融合を促進できることを見出し、RLNとINSL3が受精を取り巻く生殖プロセスに密接に関与することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はリラキシン(RLN)とその関連因子(INSL3)の受精を取り巻くネットワークシステムの存在とその役割を解明したものである。交尾時の子宮の生理的炎症反応では、RLNがその制御を担う新たな因子として期待できる。排卵過程では、RLNが卵胞破裂を刺激する誘導因子としての、さらに、受精の場においては、RLNまたはINSL3が精子の受精能獲得を誘起し、精子・卵子の接着・融合を調節する鍵分子としての位置付けを明白にした。これらは、家畜生産の高度化を図り、新しい繁殖技術の創生を導くと共に、ヒトの生殖医療にも大きく貢献できる重要な基盤的研究でもあり、他に追従を許さない独創的研究である。

研究成果の概要(英文)：This study was to grasp the role of relaxin (RLN) and its related peptide (insulin-like factor 3, INSL3) expressed in porcine ovaries in relation to reproductive processes surrounding fertilization, and to investigate the existence of these network systems and their crosstalk mechanisms, and to demonstrate the existence of these network systems and the mechanism of crosstalk. We found that RLN can function as a novel factor that regulates physiological inflammation in the uterus during mating, contribute to ovulation by activating proteolytic cascade molecules during ovulation, and stimulate sperm capacitation during fertilization, while INSL3 can stimulate adhesion and fusion with the oocyte by upregulating E-cadherin, suggesting that RLN and INSL3 are closely involved in reproductive processes surrounding fertilization.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：リラキシン INSL3 RXFP1 RXFP2 Ovary Sperm Fertilization

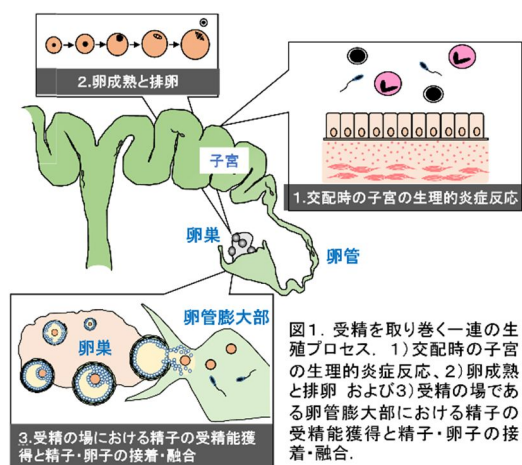
1. 研究開始当初の背景

リラキシン (RLN) は、分娩に備えた子宮頸部の軟化を始め、多岐に渡る組織で多彩な作用を発揮する多機能性ホルモンである。研究代表者は RLN をブタ精液で、その関連因子 (インスリン様因子 3 : INSL3) を精巣でそれぞれ見出し、これまでに RLN と INSL3 の構造と機能の解明に取組み、造精機能や精子機能の鍵分子であることを明らかにしてきた。しかし最近、両ホルモンが受精を取り巻く生殖プロセスに関与している可能性を示唆した。

本研究の着想は受精を取り巻く生殖プロセスの中で、これらホルモンのネットワークシステムの存在やクロストーク機構を究明したいと考えたことに端を発した。すなわち、図 1 に示した受精を取り巻く重要な生殖プロセスにおいて、(1) ブタ精漿由来の RLN は射精によって交尾時に子宮内に運ばれ、子宮で起こる生理学的炎症反応にコミットし、炎症カスケードの新たな制御因子になり得るのではないかと、一方、(2) 卵巣で産生される RLN または INSL3 はパラクリン様式で卵成熟の場である卵胞液中に運ばれ、卵の成熟や排卵の制御因子として作用するのではないかと、加えて、(3) 受精の場においては、精子の受精能や精子・卵子の接着・融合を調節する鍵分子として作用するのではないかと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、受精を取り巻く生殖プロセスの中で、とくに重要な位置を占める 3 つの過程 (図 1)、すなわち、(1) 交配時に大量の精液が子宮内に放出されることで誘起される子宮の生理学的炎症反応、(2) 卵母細胞 (卵子) の成熟と排卵、および (3) 受精の場 (卵管膨大部) における精子受精能と卵子との接着・融合に着目した (図 1)。これらの過程には、共通して RLN または INSL3 が存在していることから、ネットワークシステムの存在とクロストーク機構の解明を目指し、RLN または INSL3 が受精を取り巻く生殖プロセスの統制を司る鍵分子となり得る証拠を明らかにする。



3. 研究の方法

まず、(1) ブタ交尾後の子宮の生理学的炎症反応における RLN の作用機構を解明するために、発情期に雄豚と交配させた後、経時的に子宮内腔液と子宮を採取した。前者は白血球の動態を、後者は炎症性サイトカイン IL-1、IL-6、TNF- α 、GM-CSF、CXCL1 の免疫免疫と RNA 次世代シーケンシング (RNA-Seq) による網羅的解析に供した。次に、(2) 卵成熟と排卵における RLN または INSL3 の作用機構を調べるために、屠場より採取した未成熟卵巣から卵子を採取し、体外成熟培養を行うと共に、排卵に至る発情期の最大卵胞を採取して卵胞壁の短時間培養を行い、RLN および INSL3 の影響を解析した。さらに、(3) 受精の場で起こる精子の受精能と精子-卵子の接着・融合における RLN または INSL3 の作用機構を解明するため、発情期の卵巣、卵胞液、卵管液および血液を採取し、TR-FIA により RLN と INSL3 濃度を解析した。また、ブタ精巣上体から空気圧法で採取した精子を用いて、体外培養を行い、受容体 RXFP1 と RXFP2 への親和性を解析すると共に、精子細胞内コレステロール含量、Ca イオン濃度、cAMP、タンパク質チロシンリン酸化、E-カドヘリンについて解析した。

4. 研究成果

(1) 交尾時の子宮の炎症反応における RLN の作用機構

1 - 1) 交尾後のブタ子宮の生理学的炎症反応とサイトカインの動態: 発情期に正常な雄豚と交配させ、経時的に子宮を採取した。子宮内腔の塗抹標本を作製し、炎症反応の指標となる白血球の動態を調べた結果、交尾後 5 時間で白血球の浸潤がピークとなり、27 時間には減少していた。次に、代表的な炎症および抗炎症性サイトカインを調べたところ、炎症性サイトカインの GM-CSF、IL-6、TNF- α の発現が主に子宮上皮で検出され、その消長は炎症反応の進行と一致し、一方、抗炎症性サイトカイン TGF- β は相反する動態を示した。他方、リラキシン (RLN)

の受容体 RXFP1 は炎症性サイトカインと同様の発現動態を示した。

1 - 2)RLN によって制御される遺伝子群の網羅的解析と検証：RLN 産生源である精嚢腺を摘出して RLN 欠失雄豚を作出し、雌豚と交配させ、交尾後 5 時間に子宮を採取、RNA 次世代シーケンシング (RNA-Seq) による網羅的解析を行った。対象区と比べ、RLN 欠失動物との交尾後子宮では、アンジオテンシン受容体 AGTR2、抗アポトーシス BCL2、炎症性サイトカイン IL、プロスタグランジン合成酵素 PTGS2、T 細胞マーカー PTPRC、TGF- β の情報伝達分子 SMAD2 などの遺伝子が発現上昇し、一方、白血球コロニー刺激因子 CSF3、マクロファージ炎症タンパク質 CCL3、ケモカイン CXCL12 などの遺伝子発現が著しく低下することを突き止めた。これらの結果より、白血球コロニー刺激因子 CSF3 遺伝子の発現が RLN 欠失で著しく低下することが示唆された。この遺伝子が産生する GM-CSF は白血球の走化性や浸潤を引き起こすサイトカインである。この発現が RLN 添加で誘導されるかをブタ子宮の単層培養系を用いて検証した結果、GM-CSF は RLN に暴露させた培養上清でのみ検出されることを見出した。

(2) 卵成熟と排卵における RLN または INSL3 の作用機構

2 - 1) 卵子における RLN または INSL3 の作用機構：屠場より採取した卵巣より、卵子を採取し、RLN 受容体 RXFP1 および INSL3 受容体 RXFP2 の発現をタンパク質レベル (免疫染色と Western blot) で調べた。その結果、卵細胞膜にこれらの受容体が発現していることを見出した。次に、卵子の体外成熟培養を行い、RLN または INSL3 の存在下 (各 0-100 nM) で卵成熟が誘導されるか調べたが、有意な変動を見出すことはできなかった。以上、卵子には RLN または INSL3 の受容体 RXFP1 または RXFP2 が発現しているものの、受容体を介したホルモンの作用についてはさらなる検討の必要性が示唆された。

2 - 2) 排卵過程における RLN または INSL3 の作用機構：排卵に至る発情期の最大卵胞を採取し、卵胞液中の RLN と INSL3 濃度を TR-FIA で測定した結果、RLN 濃度は平均 3 ng/ml、INSL3 は平均 23 ng/ml であることがわかった。次に、卵胞壁を構成する細胞群において受容体 RXFP1 と RXFP2 の両者が発現していることが判明した。さらに、卵胞壁の短時間培養を行い、タンパク分解カスケード分子に及ぼす RLN と INSL3 の影響を調べた。その結果、RLN はプラスミノゲン活性化因子を有意に増加させたが、INSL3 にはそのような効果がないことを明示した。同様に、組織コラゲナーゼ MMP1 とゲラチナーゼ MMP2 も RLN で活性化することが判明した。以上、RLN は受容体 RXFP1 を介してタンパク分解カスケード分子を活性化し卵胞を破裂させ排卵に関与するが、INSL3 にはそのような作用のないことが示唆された。

(3) 受精の場における RLN または INSL3 の作用機構、とくに精子受精能と卵子の接着・融合

3 - 1) 卵巣で産生される RLN と INSL3 の分泌の行方と精子におけるこれら受容体の同定：RLN と INSL3 は、卵巣の卵胞膜細胞で産生された後、卵胞液に貯留され、排卵時に卵管膨大部に放出されることが分かった。次に、精子において RLN 受容体である RXFP1 は 90 kDa、INSL3 の受容体 RXFP2 は 85 kDa のバンドとして検出され、RXFP1 は精子の先体と中片部で、RXFP2 は赤道部で同定された。さらに、精子細胞膜に対して RLN は INSL3 と比べて高い親和性で結合することが判明した。

3 - 2) 精子の受精能および運動能に及ぼす RLN または INSL3 の影響：In vitro で RLN または INSL3 の精子に対する暴露処理を行った。その結果、RLN のみ精子細胞内コレステロール放出と Ca イオンの細胞内流入を誘起して、cAMP の著しい上昇を導くことがわかった。さらに、RLN は精子受精能獲得や運動能を刺激したが、INSL3 にはこのような効果の無いことが判明した。

3 - 3) 精子と卵子の接着・融合に及ぼす RLN または INSL3 の影響：接着分子である E-カドヘリンに注目してその発現を調べると共に、体外受精による評価も行った。その結果、E-カドヘリンの変動は INSL3 で顕著で、INSL3 は E-カドヘリン発現量を増加させることが判明した。一方、RLN は p40 (40 kDa のタンパク質) のチロシンリン酸化を刺激したが、E-カドヘリンの発現には全く影響を及ぼさなかった。これらのことより、RLN は精子の受精能獲得を積極的に誘起して受精に、一方、INSL3 は接着分子の発現を刺激して卵との接着・融合に関与する役割分担が究明できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tetsuya Kohsaka, Itaru Minagawa, Masashi Morimoto, Takuya Yoshida, Tomohiro Sasanami, Yoshitaka Yoneda, Naoki Ikegaya and Hiroshi Sasada	4. 巻 30:3
2. 論文標題 Efficacy of relaxin for cisplatin-induced testicular dysfunction and epididymal spermatotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Basic and Clinical Andrology	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/s12610-020-0101-y	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 -

1. 著者名 Ivell R, Alhujaili W, Kohsaka T, Anand-Ivell R.	4. 巻 299
2. 論文標題 Physiology and evolution of the INSL3/RXFP2 hormone/receptor system in higher vertebrates.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2020.113583	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 -

1. 著者名 Pitia AM, Minagawa I, Abe Y, Kizaki K, Hamano KI, Sasada H, Hashizume K, Kohsaka T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Evidence for existence of insulin-like factor 3 (INSL3) hormone-receptor system in the ovarian corpus luteum and extra-ovarian reproductive organs during pregnancy in goats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	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） 10.1007/s00441-021-03410-1	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 皆川至・Hoang Xuan Khoi・小林仁・佐々田比呂志・高坂哲也
2. 発表標題 精子受精能におけるリラキシンの役割
3. 学会等名 日本畜産学会 第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎美悠・飯塚真大・高橋綾乃・村田陽子・皆川至・佐々田比呂志・高坂哲也
2. 発表標題 受精におけるブタ卵胞液由来のリラキシンファミリーペプチドの精子側での作用
3. 学会等名 第23回日本生殖内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋綾乃・皆川至・寺田圭・柴田昌利・佐々田比呂志・高坂哲也
2. 発表標題 ブタ精子形成におけるリラキシン関連ペプチドINSL3の役割解明
3. 学会等名 第23回日本生殖内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 皆川至・山崎美悠・高橋綾乃・阿部由衣夏・鄭周榮・中山香菜子・佐々田比呂氏・高坂哲也
2. 発表標題 精子受精能におけるINSL3の役割
3. 学会等名 日本畜産学会 125回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/read0101453 Google Scholar Citations https://scholar.google.co.jp/citations?user=3oht-dUAAAAJ&hl=ja 静岡大学教員データベース https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=10880&l=0 researchmap https://researchmap.jp/read0101453/ Google Scholar Citations https://scholar.google.com/citations?hl=en&user=3oht-dUAAAAJ&view_op=list_works&sortBy=pubdate

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------