

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19259

研究課題名（和文）新しいウシ凍結精液技術の開発に向けた子宮内の精子認識と炎症反応メカニズムの解明

研究課題名（英文）A mechanism of uterus for sensing sperm and inflammatory response toward development of new diluent of frozen bull semen

研究代表者

宮本 明夫（Miyamoto, Akio）

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：10192767

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は2年間の計画で、凍結精液の子宮内免疫応答を模倣した新規バイオアッセイを活用し、受胎率向上に向けて炎症を緩和する低刺激性の人工授精溶液の開発基盤を示すことを目的として、1）子宮上皮細胞の精子認識機構の解明とその抑制、2）精液希釈液の再評価とX/Y分離精子への応用、の実証を目指した。1）ウシ子宮小片の器官培養系を確立してビデオ観察を含む視覚的証拠を収集し、精子は子宮腺に侵入して腺内TLR2を介して組織全体の炎症性の遺伝子群を誘導することを発見した。これは生体モデルで人工授精直後に観察した子宮内で起こる炎症反応の最初のスイッチであることが示唆された。2）は方法の安定性が得られずに断念した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウシ子宮内免疫環境は、授精された精子によって強いTh1型（炎症性）に誘導され、そのセンシングには病原体認識と同様のTLR2/4が活用されている事実を世界で初めて実験的に示した。特にウシ子宮小片のビデオ観察を含むex-vivo新規器官培養系を確立して、視覚的に精子と子宮の相互作用のダイナミクスを初めて示したことは、ウシ人工授精の分野に重要な科学情報を示した。さらに、生体モデルで人工授精直後の子宮内免疫応答の動態をリアルタイムで観察する方法を確立できたので、今後の受胎率向上に向けた生体レベルの子宮内TLR2刺激による母体免疫活性化への道筋が初めて示された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish the basic information to develop a new diluent for cryopreserved bovine semen straws, by reducing the first inflammatory response of uterus to sperm using non-inflammatory diluent. A series of results reveals for the first time that sperm immediately enter the uterine glands and trigger uterine TLR2 signaling, thereby induce inflammatory cascade. In particular, a new ex-vivo model of uterine piece co-incubated with sperm enabled us to investigate a dynamics of sperm-uterine interaction using a video observation with protein and gene expression. Further, we established an in vivo model using a cow in which a real-time investigation of sperm and immune cell appearance immediately after artificial insemination. Altogether, we indicated the novel sperm-sensing system in the uterus that uses TLR2, by developing a new ex-vivo and in vivo model to investigate the dynamics of sperm-uterine immune-crosstalk.

研究分野：動物生産科学（家畜繁殖学）

キーワード：ウシ 子宮 人工授精 精子 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳牛の受胎・分娩は乳生産の基本的な生物現象であり、100%子宮内への凍結精液による人工授精(AI)でおこなわれる。凍結精液技術は、融解後の精子正常性のみ着眼されてきたが、融解した精子+凍結液が子宮に及ぼす影響は全く考慮されてこなかった。私たちは研究開始当初、世界で初めて、ウシ子宮上皮細胞と精子の共培養系でAI時の急性炎症機構を模倣することに成功した。これは、AI時の子宮内の炎症が激しいと卵管で受精はするが、その後の子宮での初期胚認識・受胎に障害が起きる可能性を示す。精子凍結に良い環境+融解精液の子宮内炎症の低減の両立が必要である。本研究は2年間の計画で、凍結精液の子宮内免疫応答を模倣した新規バイオアッセイを活用し、受胎率向上に向けて炎症を緩和する低刺激性の人工授精溶液の開発基盤を示すことを目的として、1)子宮上皮細胞の精子認識機構の解明とその抑制、2)精液希釈液の再評価とX/Y分離精子への応用、の段階的な実証に挑戦することとして開始した。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが独自に構築した2種のバイオアッセイ系とウシ生体の子宮を用いた実証系を組み合わせ、子宮の精子認識と炎症反応メカニズムのコア部分を解明し、人工授精のための新しい低刺激性の凍結精液溶液開発の基盤を得ることを目的とした。本研究は以下の4つのステップで進行することを計画した。

【ステップ 1 (2つのバイオアッセイ系の確立)】 (平成30年度)

【ステップ 2 (精子が誘導する子宮炎症の抑制)】 (平成30年度)

【ステップ 3 (ウシ生体子宮内での炎症抑制の実証)】 (令和元年度)

【ステップ 4 (XY分離精液の検証)】

1年目は、ほぼ予定通りに子宮小片の器官培養系(ex-vivo)を構築して、精子が子宮表面で引き起こす免疫応答ダイナミクスを、デジタルビデオ撮影を含む新しい知見を得ることができ、仮説;「精子は主にTLR2を介して子宮上皮の炎症性反応を誘導する」についても実験的な証明を達成した。しかしながら、2年目の生体モデルを構築する際に、予想より遥かに難しい技術的な問題に突き当たり、結果として、人工授精で子宮内の精子と免疫細胞がいつ、どこに、どのように移動するか、または現れるかについて、初めての生体レベルのデータマップを作成できた。結果的には、このことが本研究を次のステップに向けた検証モデルを揃えたことに繋がった。

3. 研究の方法

【ステップ 1 (2つのバイオアッセイ系の確立)】 (平成30年度)

A: 子宮上皮細胞単層培養系(分子レベル)

B: 子宮小片の器官培養系(生理的な相互作用)

【ステップ 2 (精子が誘導する子宮炎症の抑制)】 (平成30年度)

仮説;「精子は主にTLR2を介して子宮上皮の炎症性反応を誘導する」についてアンタゴニストで抑制効果を検証。

【ステップ 3 (ウシ生体子宮内での炎症抑制の実証)】 (令和元年度)

ウシへの人工授精時にTLR2アンタゴニスト同時投与し、その後の子宮内炎症反応を、カテーテ

ル灌流とバイオプシーで得た試料を解析し、抑制を実証する。北海道新得畜産試験場の受精卵移植用の牛群使用（研究協力）。

【ステップ 4（XY分離精液の検証）】

上述の3つのステップで確立したプロトコルを、XY分離精液に応用して、精子性状、炎症反応、生存性の改善を検証する（研究連携）（令和元年度）

4. 研究成果

【ステップ 1（2つのバイオアッセイ系の確立）】（平成30年度）

1. ウシ子宮小片の器官培養系を確立して、ビデオ観察を含む視覚的証拠を収集した。その結果、精子は子宮上皮の平面には付着せず、子宮内に均質に0.2-0.3 mm間隔で存在する子宮腺に侵入して、腺内の上皮のTNFAタンパク発現と同時に組織全体の炎症性の遺伝子群の発現を誘導することを発見した。これは実際にウシの人工授精直後に子宮内で起こる炎症反応の最初のスイッチであることが示唆された。

Akthar I, Suarez SS, Morillo VA, Sasaki M, Ezz MA, Takahashi KI, Shimada M, Marey MA, Miyamoto A. Sperm enter glands of preovulatory bovine endometrial explants and initiate inflammation. *Reproduction* **159**: 181-192. (2020)

【ステップ 2（精子が誘導する子宮炎症の抑制）】（平成30年度）

2. ウシ子宮上皮細胞（BOEC）培養系において、人工授精用の凍結精液から得た精子の誘導する急性の炎症反応の分子メカニズムを探った。特に、BOECの精子センシングには、グラム陰性および陽性菌の内毒素を認識して炎症を誘導するTLR2/4が大きく関わっていることを実験的に初めて示した。

Ezz MA, Marey MA, Elweza AE, Kawai T, Heppelmann M, Pfarrer C, Balboula AZ, Montaser A, Imakawa K, Zaabel SM, Shimada M, Miyamoto A. TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro. *PLoS ONE* **14**(4): e0214516. (2019)

3. 乳牛の繁殖で大きな問題である何の兆候も伴わない正常に見える潜在性子宮内膜炎の不受胎の主要因の1つである病原体内毒素LPSとペプチドグリカン（PGN）について、それらの受容体が精子を認識するセンサーであるToll-like receptor 2/4（TLR2/4）であることから、その相互作用を調べた。その結果、これら内毒素が母ウシ子宮内では検知できないほどの超低濃度ですでに、TLR2/4経路を脱感作して精子認識を遮断することがわかった。（投稿準備中）

【ステップ 3（ウシ生体子宮内での炎症抑制の実証）】（令和元年度）

4. 生体モデルを用いて、ウシ凍結精液の子宮内への人工授精の直後の精子と好中球の出現状況を含む子宮内免疫環境を観察するための方法論をほぼ確立することができた。これを活用して、今後のTLR2アンタゴニスト投与による子宮内の人工授精後の炎症反応への抑制作用の検証に進みたい。

【ステップ 4（XY分離精液の検証）】（令和元年度）

上述の3つのステップで確立したプロトコルを、XY分離精液に応用して、精子性状、炎症反応、生存性の改善を検証する予定であったが、X/Y精子分離法の安定性が得られなかった

め、検証には進まなかった。(令和元年度)

国際誌への招待総説

- 1) Talukder AK, Marey MA, Shirasuna K, Kusama K, Shimada M, Imakawa K, Miyamoto A. Roadmap to pregnancy in the first 7 days post-insemination in the cow: Immune cross-talk in the corpus luteum, oviduct and uterus. *Theriogenology* **150**: 313-320. (2020)
- 2) Marey MA, Ezz MA, Akuthar I, Yousef MS, Imakawa K, Shimada M, Miyamoto A. Sensing sperm via maternal immune system: A potential mechanism for controlling microenvironment for fertility in the cow. *J Anim Sci* **97**: in press. (2020)

5 . 総括

結論として、2年間に渡る本研究は、研究室での培養細胞や組織片(ex-vivo)の検証モデルは予定通り構築でき、新たな発見が得られた。一方で、ウシ生体を用いる検証モデルは、使用するウシの確保が予想以上に難しく、まずは、凍結精液の子宮内への人工授精の直後の精子と好中球の出現状況を含む子宮内免疫環境を観察するための方法論をほぼ確立することができた。幸運なことに、これら一連の発見を評価され、国際誌への招待総説によって新しい概念を丁寧に提唱できたことは幸いであった。今後は、ウシ生産現場での技術開発を視野に入れたチャレンジを進める予定である。最後に、これらの成果は、研究室メンバーと国内外の共同研究者らの総合力の上になし得たものであり、サポート頂いた全ての方々的心より感謝の意を表したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Marey MA, Matsukawa H, Sasaki M, Ezz MA, Yousef MA, Takahashi KI, Miyamoto A.	4. 巻 35
2. 論文標題 Bovine oviduct epithelial cells suppress the phagocytic activity of neutrophils towards sperm but not for bacteria in vitro: Immunofluorescence and electron microscopic observations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	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） 10.14670/HH-18-172	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 Akthar I, Suarez SS, Morillo VA, Sasaki M, Ezz MA, Takahashi KI, Shimada M, Marey MA, Miyamoto A.	4. 巻 159
2. 論文標題 Sperm enter glands of preovulatory bovine endometrial explants and initiate inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 181-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-19-0414	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 Yousef MS, Abd-Elhafeez HH, Talukder AK, Miyamoto A.	4. 巻 86
2. 論文標題 Ovulatory follicular fluid induces sperm phagocytosis by neutrophils, but oviductal fluid around oestrus suppresses its inflammatory effect in the buffalo oviduct in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 835-846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1002/mrd.23164	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 該当する
1. 著者名 Ezz MA, Marey MA, Elweza AE, Kawai T, Heppelmann M, Pfarrer C, Balboula AZ, Montaser A, Imakawa K, Zaabel SM, Shimada M, MiyamotoA.	4. 巻 14(4)
2. 論文標題 TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0214516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214516	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 該当する

1. 著者名 Talukder AK, Marey MA, Shirasuna K, Kusama K, Shimada M, Imakawa K, Miyamoto A.	4. 巻 148
2. 論文標題 Roadmap to pregnancy in the first 7 days post-insemination in the cow: Immune cross-talk in the corpus luteum, oviduct and uterus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	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) https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.071	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 該当する

1. 著者名 Ezz MA, Marey MA, Elweza AE, Kawai T, Heppelmann M, Pfarrer C, Balboula AZ, Montaser A, Imakawa K, Zaabel SM, Shimada M, Miyamoto A.	4. 巻 14
2. 論文標題 TLR2/4 signaling pathway mediates sperminduced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0214516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214516	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 該当する

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Akio Miyamoto
2. 発表標題 Sensing sperm by maternal immune crosstalk: A potential mechanism for interfering with fertility in the cow.
3. 学会等名 17th International Conference on Production Disease (ICPD), Bern, Switzerland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本明夫
2. 発表標題 子宮と卵管の精子認識: 免疫システムによる攻撃と寛容
3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Vernadyn Almeda Morillo
2. 発表標題 Involvement of TLR2 in sperm-oviduct epithelium interaction in bovine oviduct ex vivo: Hyaluronan fragmant as a ligand?
3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ihshan Akthar
2. 発表標題 Sperm penetration into the bovine pre-ovulatory uterine glands induces TNFA in glands and triggers the inflammatory cascade.
3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohamed Ali Marey
2. 発表標題 Real-time investigation in vivo of sperm and neutrophils distribution in the bovine uterus after artificial insemination.
3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akio Miyamoto
2. 発表標題 Sensing sperm by bovine uterine epithelial cells via TLR2 and TLR4 signaling pathway in vitro.
3. 学会等名 51st Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mohamed Marey
2. 発表標題 Sperm induce a pro-inflammatory response in bovine uterine epithelial cells via TLR2/4 signaling pathway in vitro.
3. 学会等名 第111回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ihshan Akthar
2. 発表標題 Sperm enter bovine uterine glands ex-vivo and initiate a pro-inflammatory response.
3. 学会等名 第111回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2018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