

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658083

研究課題名（和文） 鳥類雄生殖器と精子に発現する新規な宿主防衛機構の解明への挑戦

研究課題名（英文） Challenge to determine the novel host defense system in male reproductive organs and sperm in chickens

研究代表者

吉村 幸則 (Yoshimura, Yukinori)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10167017

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ニワトリ雄生殖器と精子において自然免疫系による宿主防衛機能が構築されている可能性を追究した。その結果、精巣と生殖道には多様な TLR と avBD が発現し、TLR4 をリポ多糖で刺激すると炎症性サイトカインの発現が高まることが明らかとなった。このサイトカイン発現の増加は、T 細胞を誘導して細胞性免疫を高めるとともに、avBD 産生も誘導することが推定された。これらの TLR 及び avBD を介する免疫応答は雄生殖器と精子の宿主防衛能を構築するものと思われた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to determine the innate immune system in the male reproductive organs and sperm of chickens. It was examined whether Toll-like receptors (TLRs) and avian β -defensins (avBDs) were expressed in male reproductive organs, whether stimulation of TLR induced proinflammatory cytokines, followed by influx of T cells, and whether sperm expressed avBDs in response to microbial components. The results showed that male reproductive organs expressed various TLRs and avBDs, and stimulation of TLR4 by lipopolysaccharide induced proinflammatory cytokines. The synthesized proinflammatory cytokines may enhance cellular immunity mediated by T cells and synthesis of avBDs. Sperm also expressed avBDs that may play roles in host immunity for themselves. The immune functions mediated by TLRs and avBDs may form the host defense system in male reproductive organs and sperm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：畜産学、繁殖、宿主防衛、ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

オスの生殖器には病原性ウイルスと細菌が侵入することがあり、組織と精子が感染するリスクは高い。精子は卵管の精子貯蔵細管に入り、数週間にわたって生存できるという特異的な動態を示す。オス生殖器で抗精子免疫応答が発現すると精子は生存できないので一般に B 細胞の分布と適応免疫は劣る。私達は、精子が適応免疫応答を抑制するサイトカインであるトランスフォーミング成長因子 (TGF- β) を産生することを見出している。オス生殖器や卵管で TGF- β 等により精子を取り巻く適応免疫系が劣ると感染リスクは高くなる。

トリ β -ディフェンシン(avBD)は自然免疫系で働く抗菌ペプチドで、ニワトリでは 14 分子種が同定されている。私達はニワトリの精巣組織と精子で avBD の 1 つである avBD3 が発現することを報告した。Toll 様受容体 (TLR) は微生物のパターンを認識する分子である。インターロイキン 1 β (IL1 β) と IL6 は炎症性サイトカイン、CXCLi2 はケモカインである。微生物の侵入に伴う avBD 産生の促進には TLR や炎症性サイトカインの刺激が関わる可能性が推定される。オス生殖器で精子に対する免疫応答を避けるために適応免疫系が劣るならば、自然免疫が発達していると考え、生殖器と精子の TLR と avBD を介する感染防御機構を追究するという発想に至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、オス生殖器に TLR と avBD が発現して、自然免疫系による宿主防衛機能が構築されていることを明らかにすることを目的とした。

(2) このために、①オス生殖器による TLR と avBD が発現することを検証した。②この TLR は炎症性サイトカイン産生を調節し、その下流では T 細胞サブセットの動態も影響される可能性を検証し、さらに③精子の avBD 発現が微生物成分 (CpG オリゴ DNA; TLR21 のリガンド) の影響を受けること、また精子の avBD は受精能に関わる可能性を検証した。

3. 研究の方法

精巣と生殖道で avBD が産生されることを実験 1 により、また TLR が発現することを実験 2 により検証した。この TLR を刺激すると炎症性サイトカインが産生され、その下流で T 細胞の組織内への流入も起こることを実験 3 と 4 で検証した。また、実験 5 では精子に発現する avBD について、微生物成分に応答

して発現量に変化するか、そして avBD3 が受精能に関わるかを解析した。

供試動物には黄斑プリマスロックまたはボリスブラウン成熟雄鶏を用いた。

【実験 1. 精巣と精巣上体における avBD 発現の検証】

無処理の正常雄鶏から採取した精巣、精巣上体、精管において、14 種の avBD 発現の有無を RT-PCR 解析した。発現が認められた avBD のうち、avBD11 と 12 については、免疫染色により各組織での局在を解析した。抗 avBD11 と 12 抗体は私達が先に作製したのを用いた。

【実験 2. 精巣と精巣上体における Toll 様受容体発現の検証】

PBS (対照区) または LPS (0.5 mg/Kg BW) を静脈内投与したニワトリの精巣と精巣上体の全 RNA を抽出した。これらの組織に発現する TLR の種類を RT-PCR 法で同定するとともに、LPS が TLR4 の発現に及ぼす影響を定量 RT-PCR 法で解析した。

【実験 3. リポ多糖刺激に伴う精巣と精巣上体の炎症性サイトカイン発現の変化】

実験 2 と同様に PBS または LPS を成熟鶏に投与した。投与前、3 または 6 時間後に、精巣、精巣上体、精管を採取した。精巣と精巣上体における炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6) 及びケモカイン (CXCLi2) の発現を定量 RT-PCR 法で解析した。

【実験 4. リポ多糖刺激に伴う精巣上体と精管における T 細胞局在の変化】

LPS 刺激に伴う精巣上体と精管の CD4+ 及び CD8+ T 細胞の動態を免疫組織化学的に解析した。

【実験 5. 精子の avBD 発現に影響する因子と avBD の受精への関与の検証】

精子自身が産生する avBD が微生物特異成分の CpG オリゴ DNA による刺激の影響を受ける可能性を検証するために、培養した精子を CpG-ODN 2007 で刺激し、avBD10 発現の変化を定量 RT-PCR 法で解析した。

また、精子が産生する avBD3 が受精能に影響する可能性を検証するために、培養した精子を抗 avBD3 抗体と反応させて中和し、これを雌鶏に人工受精した。産卵された卵をインキュベートして受精率及び受精期間を評価した。

4. 研究成果

【実験 1. 精巣と精巣上体における avBD 発現の検証】

成熟鶏の精巣と精巣上体に発現する *avBD* を RT-PCR で解析したところ、精巣では *avBD*-1、3-7、9-14 精巣上体では *avBD*2-5、7、9-13 の発現が認められた (図 1)。

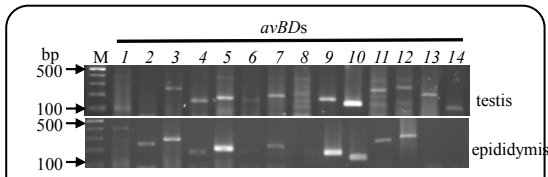


図 1. 精巣と精巣上体の *avBD* 発現 (J Poult Sci 48: 275. 2011.)

このうち、*avBD*11 と 12 蛋白を産生する細胞を同定するために免疫染色を行った結果を図 2 に示す。*avBD*11 は精細管のセルトリ細胞、精巣網と精巣輸出管の上皮細胞に検出された。*avBD*12 は精巣輸出管の上皮細胞に認められた。

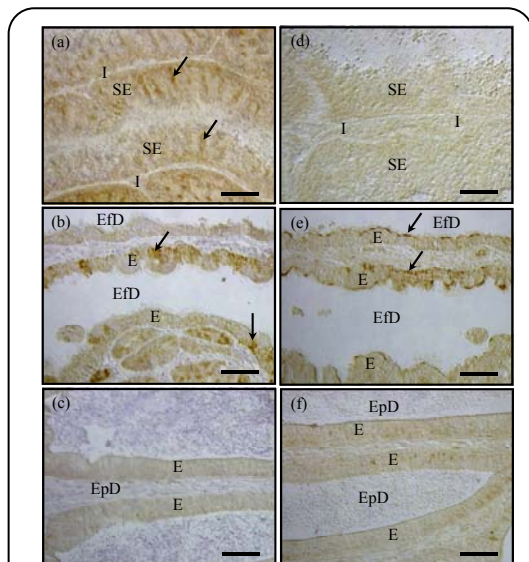


図 2. 精巣と精巣上体の *avBD*11 と 12 (J Poult Sci 48: 275. 2011.)

先に私達が報告した *avBD*3 蛋白の局在を合わせて 3 種の *avBD* の局在を表 1 に示した。いずれの *avBD* も精巣と精巣上体に検出されたので RT-PCR の結果を支持するものである。精細胞とセルトリ細胞は *avBD*3 または -11 に陽性で、発現する *avBD* の種類に細胞特異性があることが示された。精巣輸出管は 3 種の *avBD* に陽性であったが、精巣上体管はどの *avBD* にも陽性を示さなかった。精巣上体では精巣輸出管の *avBD* 産生能が発達していることが示唆された。

表 1. 精巣と精巣上体における *avBD* 陽性細胞の概要

組織	細胞	<i>avBD</i> -3	<i>avBD</i> -11	<i>avBD</i> -12
精巣	精細胞	+*	ND	ND
	セルトリ細胞	ND	+	ND
精巣上体	精巣網	+	+	ND
	輸出管	+	+	+
精巣上体	精巣上体管	ND	ND	ND

+ = 陽性, ND = 検出されず. *精子細胞が陽性を示す。

この結果から、精巣と生殖道では多様な *avBD* が産生されることが明らかとなった。個々の *avBD* の標的微生物と抗菌スペクトルは明らかにされていないが、多様な *avBD* が産生されることは種々の微生物による感染を防ぐために有利であると思われる。

【実験 2. 精巣と精巣上体における Toll 様受容体発現の検証】

成熟雄鶏の精巣と精巣上体において発現する TLR を検索した。その結果、精巣では *TLR*2-I、2-II、3~5、15 及び 21 の 7TLR の発現、精巣上体では *TLR*1-II、2-I、2-II、3~5、7、15 及び 21 の 9TLR の発現が認められた (図 3)。

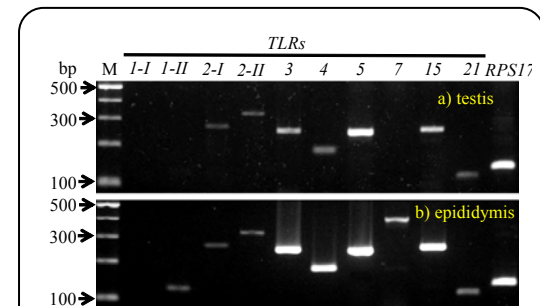


図 3. 精巣と精巣上体の TLR 発現 (Poultry Sci, in press)

LPS を静脈内投与すると (0.5 mg/Kg BW)、*TLR*4 発現が精巣では増加してリポ多糖認識能が高まることが示唆された。精巣上体ではこの発現に及ぼす影響の誤差が大きかったので、個体間で反応性に差があるものと思われる (図 4)。

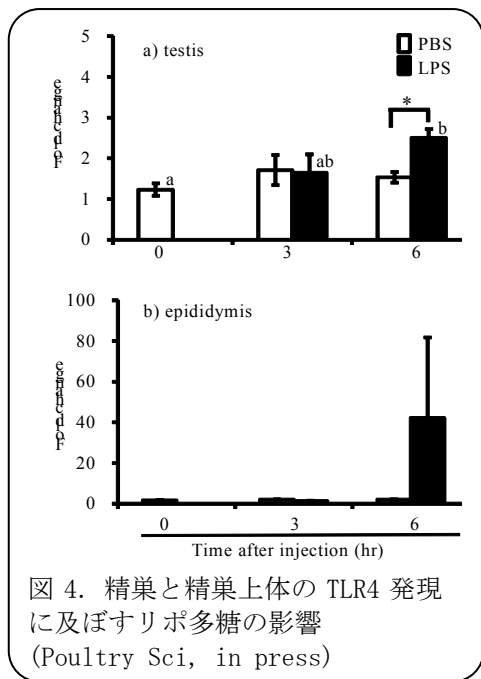


図 4. 精巣と精巣上体の TLR4 発現に及ぼすリポ多糖の影響 (Poultry Sci, in press)

この結果から、精巣と精巣上体では多様な TLR が発現し、グラム陰性菌及び陽性菌、ウイルスを含めて多くの種の病原微生物の成分を認識し、その下流で免疫応答が誘導されるものと考えられる。後述の実験で用いるグラム陰性菌の LPS を認識する TLR4 は両組織で発現していることも明らかにされた。

【実験 3. リポ多糖刺激に伴う精巣と精巣上体の炎症性サイトカイン発現の変化】

雄鶏の静脈内に LPS (0.5 mg/Kg BW) を投与して、炎症性サイトカインとケモカインの発現の変化を解析した。その結果、両組織とも投与 3-6 時間までに炎症性サイトカインの *IL-1β* と *IL-6* 及びケモカインの *CXCLi2* の発現が有意に増加した (図 5, 6)。これらの発現は精巣では投与 6 時間まで高かったが、精巣上体では投与 6 時間で低下する傾向を示した。精巣と精巣上体との間でこれらの発現の動態に差が生じたことは、両組織に分布するサイトカインとケモカインを産生する細胞の機能の違い、または LPS を運搬する血流量が精巣より精巣上体で発達していることによって生じた可能性が考えられた。また、*IL-6* の発現の変化は LPS 投与前に比べて精巣では 6 倍であったが、精巣上体では 60 倍であった。*IL-6* 発現の LPS 応答性は組織によって異なり、精巣上体での応答は精巣より高いこと考えられた。

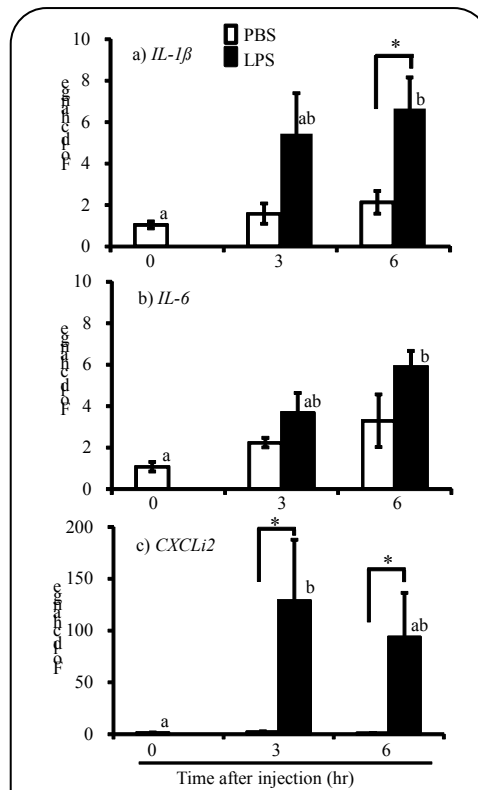


図 5. 精巣炎症性サイトカイン発現に及ぼすリポ多糖の影響 (Poultry Sci, in press)

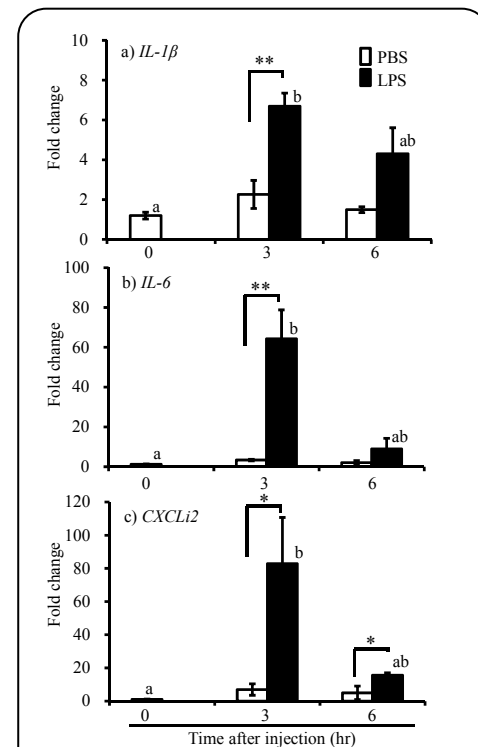
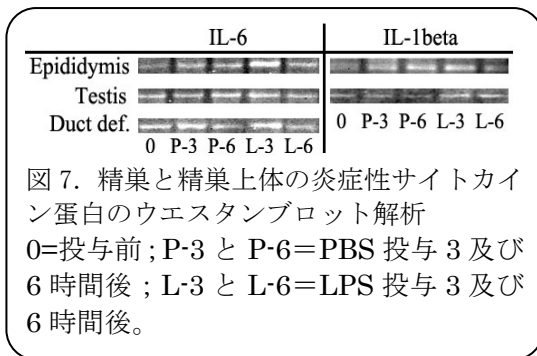


図 6. 精巣上体炎症性サイトカイン発現に及ぼすリポ多糖の影響 (Poultry Sci, in press)

精巣と精巣上体における IL-1 β と IL-6 蛋白の存在はウエスタンブロット解析でも検証した。図 7 に示したように、LPS 投与鶏と対照区の PBS 投与鶏のいずれでも精巣と精巣上体に IL-1 β と IL-6 の存在を示すバンドが検出され、遺伝子発現解析の結果とともに、これらの分子が両組織で産生されることが示唆された。



これらの結果から、精巣と精巣上体に発現する TLR4 は機能的で、グラム陰性菌の感染に対して菌成分の LPS を認識して、炎症性サイトカインとケモカインを発現させ、その下流の免疫応答を誘導することが示唆された。

【実験 4. リポ多糖刺激に伴う精巣上体と精管における T 細胞局在の変化】

雄鶏静脈内に LPS (.5 mg/Kg BW) を投与し、精巣上体と精管の CD4+ 及び CD8+T 細胞の分布の変化を免疫組織学的に解析した。両 T 細胞サブセットとも精巣上体の管系及び精管の粘膜上皮下を中心とした結合組織に多く、粘膜上皮内にもわずかに検出された (図 8)。

単位面積 ($1 \times 10^4 \text{ mm}^2$) あたりの細胞数を解析すると、CD4+T 細胞は、精巣輸出管では LPS 投与区と PBS 区 (対照区) で投与 6 時間後にそれぞれ約 11 と 8 細胞、精管で約 7 と 4 細胞で、LPS 刺激によって有意に増加した。CD8+T 細胞は投与 6 時間後に、精巣輸出管では LPS 投与区で約 13 細胞、PBS 区で約 11 細胞で、LPS 区が有意に多かった。精管の CD8+T 細胞も、LPS 区で約 13 細胞、PBS 区で約 8 細胞と LPS 区が有意に多かった。また、CD8+T 細胞は LPS 投与 6 時間後の精巣網でも多かった。

これらのことから、精巣上体や精管がグラム陰性菌に感染すると、CD4+ヘルパー T 細胞及び CD8+キラー T 細胞による細胞性免疫応答が高まると考えられた。

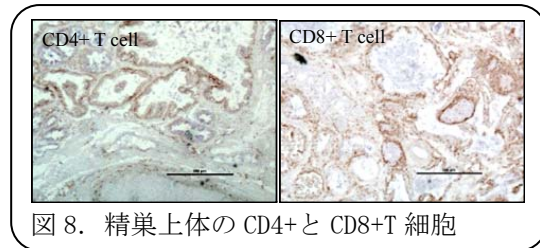


図 8. 精巣上体の CD4+ と CD8+T 細胞

【実験 5. 精子の avBD 発現に影響する因子と avBD の受精への関与の検証】

(1) 精子の avBD10 発現に及ぼす CpG オリゴ DNA の影響解析

私達はニワトリ精子が *TLR2* - 5, 7, 15 として微生物特異的な核酸の CpG オリゴ DNA を認識する *TLR21* を発現すること、また *TLR4* のリガンドである LPS で刺激すると *avBD5*, 9, 10, 12 の発現が高まり、*TLR2* のリガンドである Pam3CSK4 では *avBD5* の発現が高まることを先に報告した。ここでは *TLR21* のリガンドである CpG オリゴ DNA (CpG-ODN 2007) を培養精子に作用させて *avBD10* の発現が高まるかを検討した。その結果、0.5 $\mu\text{g/ml}$ CpG-ODN2007 で 3 時間インキュベートすると精子 *avBD10* の発現は高まる傾向を示した。一方、CpG-ODN2007 の 5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度では精子 *avBD10* の発現の上昇は認められなかった。有意性は示されなかったが、CpG-ODN によっても精子の avBD 発現は高まる可能性が考えられ、このことは精子自身が宿主防衛能を備えている可能性をあらためて示唆するものである。

(2) 精子が発現する avBD3 と受精能との関連性

私達は先にニワトリ精子が avBD3 を発現することを述べた。この avBD3 が精子の宿主防衛の他に受精能にも関与する可能性を検討した。このために、精子を avBD3 抗体とインキュベートして人工授精した。その結果、抗体濃度 25-50 $\mu\text{g/ml}$ 、インキュベート 1 または 2 時間の条件による精子 avBD3 の中和処理では、受精率、受精期間に対照区との差はなく、avBD3 が精子の受精能に関与する可能性は示されなかった。

【まとめ】

今回得られた結果を総合すると、精巣と生殖道には多様な TLR と avBD が発現することが明らかとなった。炎症性サイトカインは avBD 産生を高める可能性も報告されている。本研究では TLR を刺激すると炎症性サイトカインの発現が高まったので、これは T 細胞を誘導して細胞性免疫を高めるとともに、avBD 産生も誘導して感染防御に働くことが推定された。また、精子にも avBD が発現してお

り、これの受精能への関与は示されなかったが、自身の感染防御に関わる可能性はあると思われた。これらの TLR 及び avBD を介する免疫応答は雄生殖器と精子の宿主防衛能を構築するものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- (1) Zhang M, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y: Expression of Toll-like receptors and effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokine in the testis and epididymis of rooster. Poultry Science. 2012. (accepted)
- (2) Watanabe Y, Isobe N, Yoshimura Y: Detection of avian beta-defensins mRNA and proteins in male reproductive organs in chicken. Journal of Poultry Science 48(4): 275-280. 2011.

〔学会発表〕 (計 3 件)

- (1) 張 明・渡辺陽子・磯部直樹・吉村幸則: ニワトリ雄生殖器の宿主防衛機能. 第 36 回鳥類内分泌研究会. 2011. (神奈川県足柄下郡箱根町)
- (2) Zhang M, Isobe N, Yoshimura Y: Effects of lipopolysaccharide on the recruitment of T cells in reproductive organs of roosters. 日本家禽学会 2011 年度秋季大会. 2011. (十和田市)
- (3) Watanabe Y, Isobe N, Yoshimura Y: Studies on the innate immune system in the male reproductive organs in chickens. Proceedings of 14th AAAP, vol. 2, 482-484, 2010. (Pingtung 市, Taiwan)

〔図書〕 (計 1 件)

吉村幸則: 鳥類の生殖, 「新動物生殖学」(佐藤英明 編), pp142-151, 朝倉書店, 東京, 2011.

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 幸則 (Yoshimura, Yukinori)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号: 10167017