

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32682

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670732

研究課題名(和文)メスとオスの液性因子に制御される精子の生存機構

研究課題名(英文)Mechanism of sperm survival regulated by male and female liquid factors.

研究代表者

河野 菜摘子(Kawano, Natsuko)

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：00451691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：当初、子宮内の殺精子因子には性周期依存的なホルモンを予想していたが、解析の結果、免疫に関連する補体はその候補としてあがってきた。特に補体C3は発情期において子宮で高発現しており、子宮内液中に高濃度に存在した。卵巣摘出マウスに高濃度E2投与をすることで人為的にC3の産生を促すことにも成功した。この方法により回収した子宮内液は精子の凝集を起こし死滅させることが分かったが、その際にC3が活性化している様子は観察されなかった。しかし免疫不全マウスのメスとSVS2K0オスマウスを交配させたところ、妊孕性が野生型オスの半分程度まで回復したことから、殺精子作用にはメスの免疫とくに補体が関与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：At the beginning of this research, steroid hormones were expected to define the sperm survival in female uterus; however, any sperm-killing inducible steroid hormone was not detected in the uterine fluid. The shotgun analysis of the uterine fluid by using LC/MS revealed that complement C3 existed with extremely high concentration if the fluid showed spermicide. C3 was highly expressed in the uterus if the mouse was in estrus period; but C3 was neither in diestrus period nor after injection of hCG. From ovariectomized mice, the secretion of C3 in the uterus was under controlled by estradiol. Both immuno-depletion of C3 and heat inactivation (56 °C for 30 min) of the uterine secretion decreased the sperm killing effect. A mass of complement C3 in the uterus was easy to detect by western blotting; but the incubation with sperm could not activate uterine C3. The sperm killing mechanism in uterus continues to be investigated.

研究分野：動物生殖学

キーワード：生殖免疫 子宮内殺精子因子 補体 精漿タンパク質

1. 研究開始当初の背景

本申請で用いる SVS2KO マウスは当初期待していた不妊のフェノタイプは出たが、その原因は意外なものであり、体内受精における新たな事実が浮き彫りとなった。すなわち、SVS2 非存在下では精子は子宮内で死滅してしまい、結果、卵子に到達できず不妊になってしまうというものであった。この結果から体内受精に関して、子宮内には精子を殺す障害性因子が存在すること、またその因子から精子を保護するのが SVS2 である、という新たな知見を得ることができた。本研究では、オスとメスの液性成分が子宮内における精子の生存性をどのように調整しているのかを明らかにする目的で、子宮内の殺精子因子の同定を行い、その因子から精子を保護する作用機序を明らかにする。

2. 研究の目的

これまでの結果から、子宮内には精子を殺す障害性因子が存在すること、SVS2 はこの因子から精子を保護する働きがあることを明らかにした。この結果を受け、子宮内で精子を殺す因子を同定することを目的とし、その因子と精嚢腺 SVS2 の相互作用について解析を行う。

予備実験において、SVS2 は胎児期のオスの脳やガン細胞にも発現していることが判明したことから、精子と神経細胞・ガン細胞に共通する SVS2 の細胞保護作用があると仮定して解析を行う。また、細胞死を引き起こす因子についても精子・神経細胞の間に共通したものが存在するとして解析を行い、siRNA を用いたノックダウンによって臓器特異的に攪乱したマウスを作製し、そのフェノタイプを解析する。

3. 研究の方法

【課題 1】精子および神経細胞の生存性を下げる障害性因子の同定

精子の生存性の低下を引き起こす障害性因子を同定する

子宮内の障害性因子をノックダウン/欠損したメスマウスを作製する

【課題 2】免疫不全マウスにおけるフェノタイプの発見

NOD/NOG マウスを用いて個体レベルでの障害性因子の影響を調べる

野生型マウスにおける C3 の発現・分泌機構の解明

【課題 3】精子における障害性因子と SVS2 の作用機序

障害性因子の作用機序の検討

4. 研究成果

課題 1 の「子宮内における精子の生存性を低下させる障害性因子の同定」において、当初の予定ではプロゲステロンなどのホルモンを想定していたが、解析の結果、精子を殺しうるホルモンは子宮内液に検出されな

かった。そこで発情期のメスマウスから子宮内液を回収し、含まれるタンパク質をショットガン解析により網羅的に調べたところ、最も多く存在しているタンパク質は補体の C3 であることが判明した。補体 C3 の mRNA を調べたところ、休止期や過排卵処理 (PMSG・hCG) のマウスの子宮では発現しておらず、発情期の子宮で高発現していることが分かった。またウエスタンブロットでタンパク質の分泌を調べたところ、mRNA の発現に比例してタンパク質を分泌していること、さらには卵巣摘出マウス (OVX マウス) に高濃度エストロジェンを投与した場合にも C3 タンパク質の分泌が非常に増えることも明らかとなった。この結果から、子宮内の C3 合成・分泌はエストロジェンによって制御されていることが推測された。

OVX マウスに高濃度のエストロジェン投与をすることで人為的に子宮 C3 を回収することに成功したため、C3 の作用機序について解析を行った。人為的に回収した C3 を含む子宮内液も自然発情によって回収した子宮内液と同様に、精子の凝集を引き起こし、精子を死滅させることが分かった。また、一般的

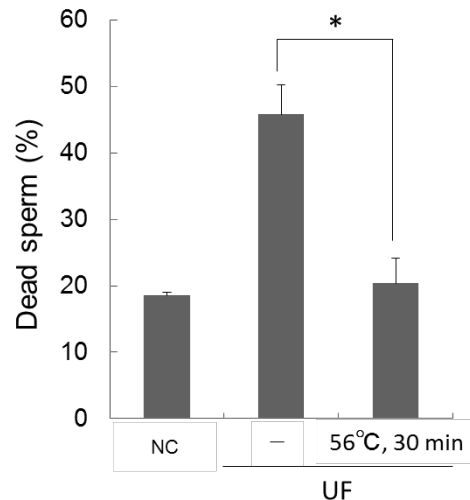


図1 56°C, 30分の処理で子宮内液は殺精子作用を失う

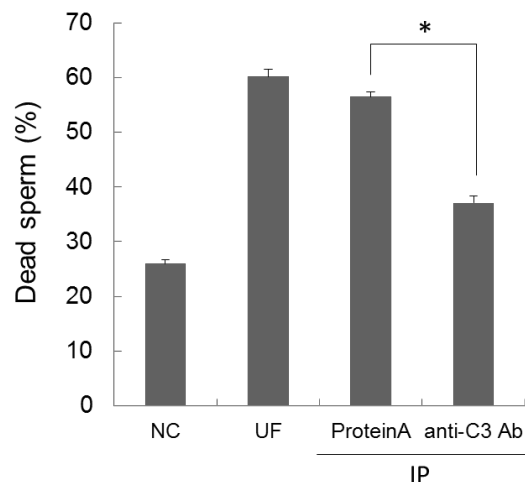


図2 抗c3抗体で免疫除去した子宮内液は殺精子作用が減弱する

に補体が失活するとされている 56 で 30 分処理すると子宮内液の殺精子効果は消失し(図 1) また抗 C3 抗体による免疫除去をおこなった子宮内液には殺精子効果が減弱する結果となった(図 2)。これらの実験から、子宮内液中の C3 が殺精子因子であると考えられた。

しかし、精子を凝集・死滅させた子宮内液を用いて C3 の状態をウエスタンブロットにより調べたところ、C3 は断片化して活性化している様子は観察されなかった。一般的に、C3 は C3a と C3b に断片化することで活性化され補体経路が動くと考えられている。現段階では C3 が精子を殺すしくみは不明なままであるが、新規な経路が存在する可能性も考えられる結果となった。

さらに、C5 の欠損体であり、補体経路を失活している免疫不全マウスである NOD・NOG マウスのメスと SVS2KO オスマウスを交配させたところ、オスの妊孕性が半分程度まで回復することが明らかとなった。この結果より、補体経路がメスの殺精子作用に関与することが明らかとなった。

今後、子宮内 C3 がどのように精子を殺すのか、その機構についてより詳細な解析が必要となるが、一般的な活性化とは異なる機構で精子を攻撃している可能性も検討していきたい。

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 6 件)

MI Nonaka, E Zsigmond, A Kudo, H Kawakami, K Yoshida, M Yoshida, N Kawano, K Miyado, M Nonaka, RA Wetzel. Epididymal C4b-binding protein is processed and degraded during transit through the duct and is not essential for fertility. Immunobiology, 査読有, 220 (4), 2015, 467-475.

C Ono, M Yoshida, N Kawano, K Miyado, A Umezawa. Staphylococcus epidermidis is involved in a mechanism for female reproduction in mice. Regenerative Therapy 1, 2015, 11-17.

A Nakamura, K Miyado, K Yamatoya, N Kawano, A Umezawa. Breast milk stimulates growth hormone secretion in infant mice, and phosphorus insufficiency disables this ability and causes dwarfism-like symptoms. Regenerative Therapy 2, 2015, 49-56.

N Araki, N Kawano, W Kang, K Miyado, K Yoshida, M Yoshida. Seminal vesicle proteins SVS3 and SVS4 facilitate SVS2

effect on sperm capacitation. Reproduction 152 (4), 2016, 313-321.

K Yamatoya, K Saito, T Saito, W Kang, A Nakamura, M Miyado, N Kawano, Y Miyamoto, A Umezawa, K Miyado, H Saito. Birthweights and Down syndrome in neonates that were delivered after frozen thawed embryo transfer: The 2007-2012 Japan Society of Obstetrics and Gynecology National Registry data in Japan. Reproductive Medicine and Biology, 2017, in press.

K Miyado, W Kang, K Yamatoya, M Hanai, A Nakamura, T Mori, M Miyado, N Kawano. Exosomes versus microexosomes: shared components but distinct functions. Journal of Plant Research, 2017, 1-5.

[学会発表](計 5 件)

河野 菜摘子、康 宇鎮、吉田 薫、吉田 学、宮戸 健二 雌性生殖器における精子サバイバル術 日本受精着床学会 2015 年 11 月 27 日、東京

河野 菜摘子、康 宇鎮、吉田 薫、吉田 学、宮戸 健二 メス生殖器における精子サバイバル術 日本生殖工学会 2015 年 12 月 13 日、東京

河野 菜摘子、康 宇鎮、吉田 薫、吉田 学、宮戸 健二 精漿タンパク質 SVS2 欠損マウスから見てきた、精子を殺すメスの免疫機構 分子生物学会 2015 年 12 月 3 日、神戸

N Kawano, W Kang, K Yoshida, M Yoshida, K Miyado. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. 日本生理学会 2017 年 3 月 29 日、浜松

[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

河野 菜摘子 (KAWANO, Natsuko)

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：00451691

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

宮戸 健二 (MIYADO, Kenji)

(国) 国立成育医療研究センター・細胞医療

研究部・室長

研究者番号：60324844

(4) 研究協力者

()