

ラクトフェリンによる精子細胞死の 抑制と胎児発生の向上

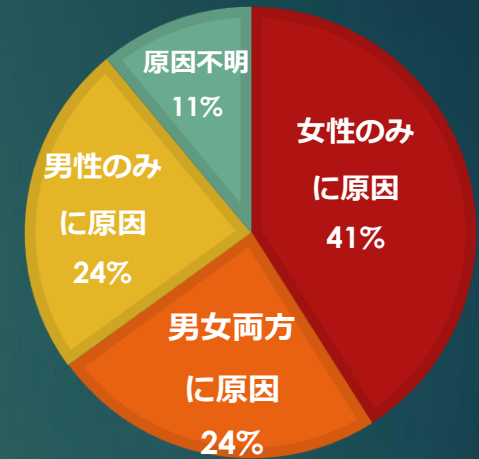
鳥取大学 農学部 共同獣医学科
教授 竹内 崇師

令和3年3月2日

背景

▶ ヒトの不妊

- ▶ 女性側（卵子の老化等）のみならず、約半数が男性側（精子の機能異常等）に原因あり（Philippovら. 1998）



▶ ヒトの精液

...不妊症患者の1/3弱で細菌（大腸菌等）が認められる

（Ricciら. 2018）

⇒精子上のToll様受容体（TLR）を介して精子にアポトーシスを誘導

⇒不妊の原因の一端

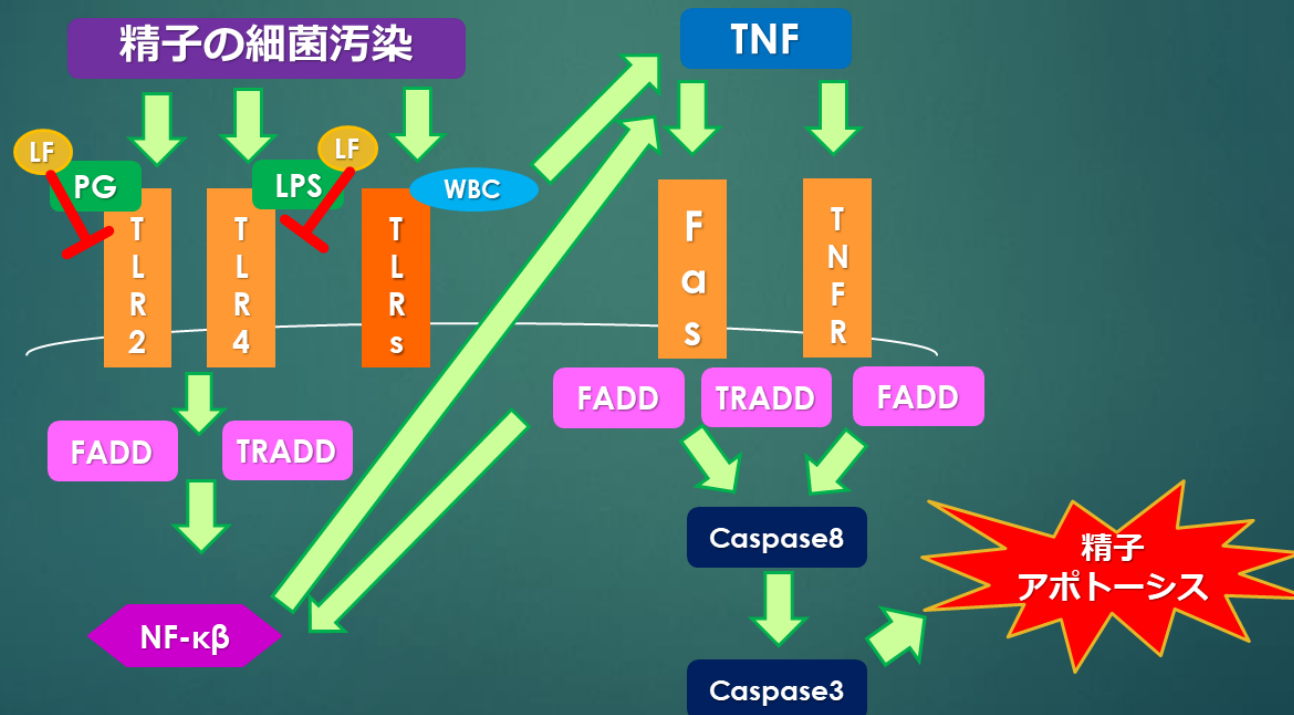
- ▶ 精子の細菌汚染に対する治療としては抗生物質の内服が一般的

...抗生物質による副作用、耐性菌の出現といった問題点も

背景

▶ ラクトフェリン (LF)

- ▶ 乳汁、涙液などの外分泌液中に含まれる鉄結合性糖蛋白質
 - ▶ 抗菌作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用など様々な活性をもつ
 - ▶ グラム陰性菌の菌体成分であるリポ多糖 (LPS) に結合し、シグナル伝達を阻害することでアポトーシスを抑制
- ⇒精子の細菌汚染による男性不妊治療に使用できる可能性



<目的> LF処理された精子の受精能・胎仔発生に対する影響を検討

材料および方法

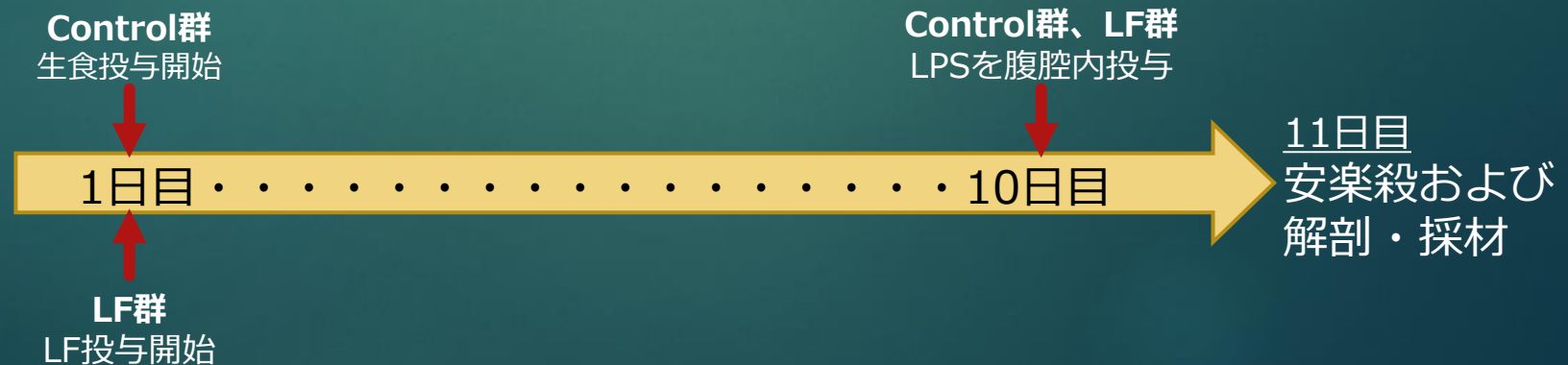
＜実験1＞ LF経口投与による精子への影響

▶ 供試動物

- ▶ C57BL/6マウス（雄：8~16週齢）

▶ 方法

- ▶ LF（180 μ g/体重10 g）を雄のC57BL/6マウスに10日間経口投与し、経口投与10日目にLPS（1 μ g/体重10 g）を腹腔内投与
- ▶ LPS腹腔内投与の翌日に精巣・精巣上体を採取
- ▶ 精巣・精巣上体についてTUNEL法でアポトーシス細胞を、リアルタイムPCRでアポトーシス関連遺伝子（Caspase3）を検出

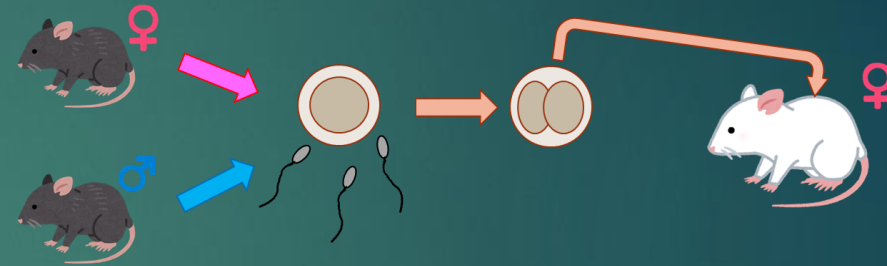


材料および方法

<実験2> LPSおよびLF存在下で体外受精した受精卵の胎仔発生

▶ 供試動物

- ▶ BDF1マウス（雄：8~16週齢、雌：4週齢）
- ▶ ICRマウス（雌：8~20週齢）



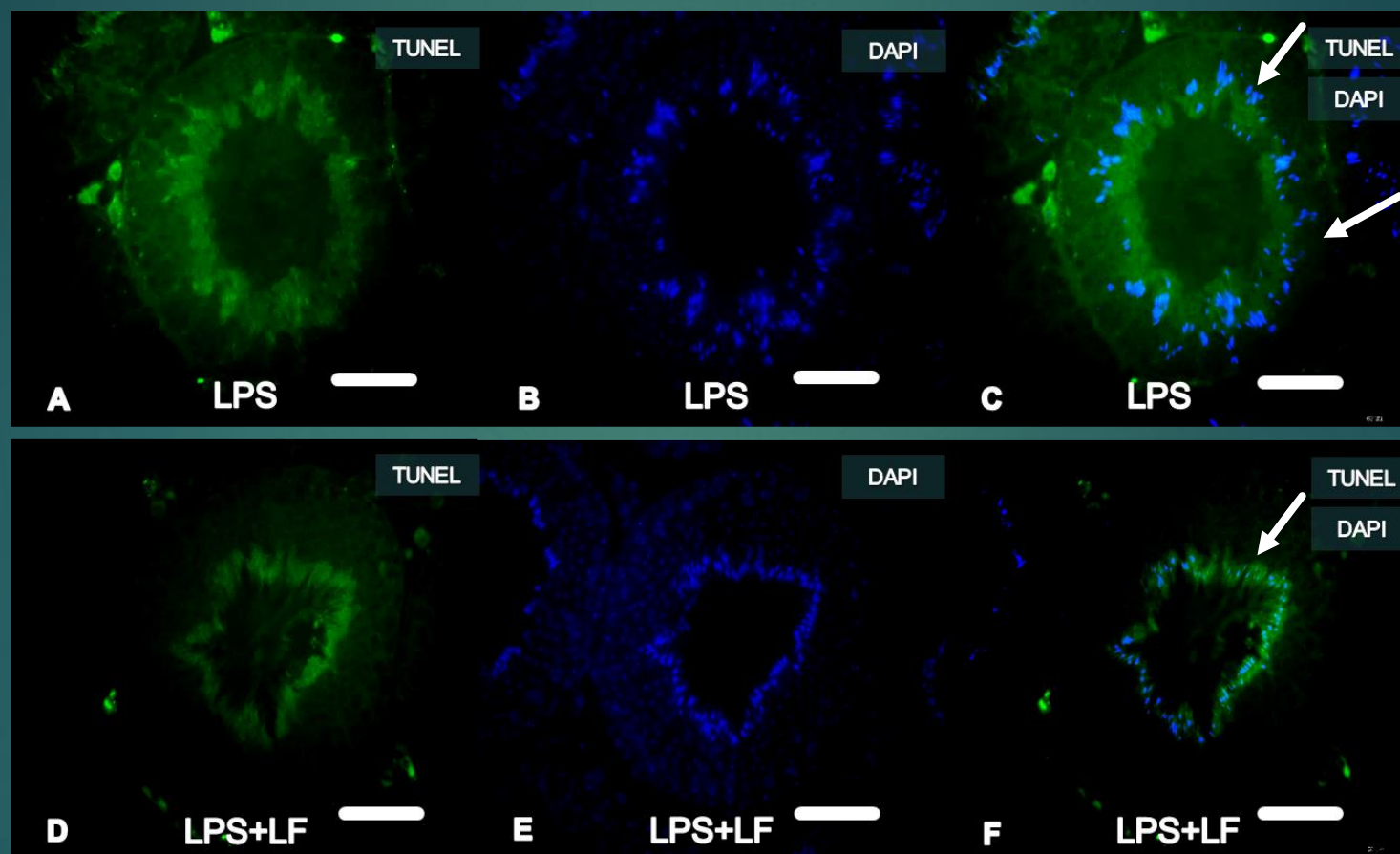
▶ 方法

- ▶ 雌のBDF1マウスに過剰排卵処置を実施し、卵管膨大部から卵を回収
- ▶ 雄の精巣上体から精子を回収し、LPSおよびLFを加えたTYH培地で前培養
 - ▶ Control群：TYH培地のみで精子を前培養
 - ▶ LF群：1 mg/mL LF添加TYH培地で精子を前培養
 - ▶ LPS群： 1×10^{-3} mg/mL LPS添加TYH培地で精子を前培養
 - ▶ LPS+LF群： 1×10^{-3} mg/mL LPS+ 1 mg/mL LF添加TYH培地で精子を前培養
- ▶ 回収した卵と精子を用いて体外受精を行い、培養後の2細胞期胚発生率を調べ、2細胞期胚へ発育したものをICRマウスの卵管膨大部へ移植
- ▶ 移植後12日齢でICRマウスを解剖し、胎仔の形態観察、胎盤に特異的な遺伝子発現の検出

結果

<実験1> LF経口投与による精子への影響（精巣）

▶ TUNEL法によるアポトーシス細胞の検出



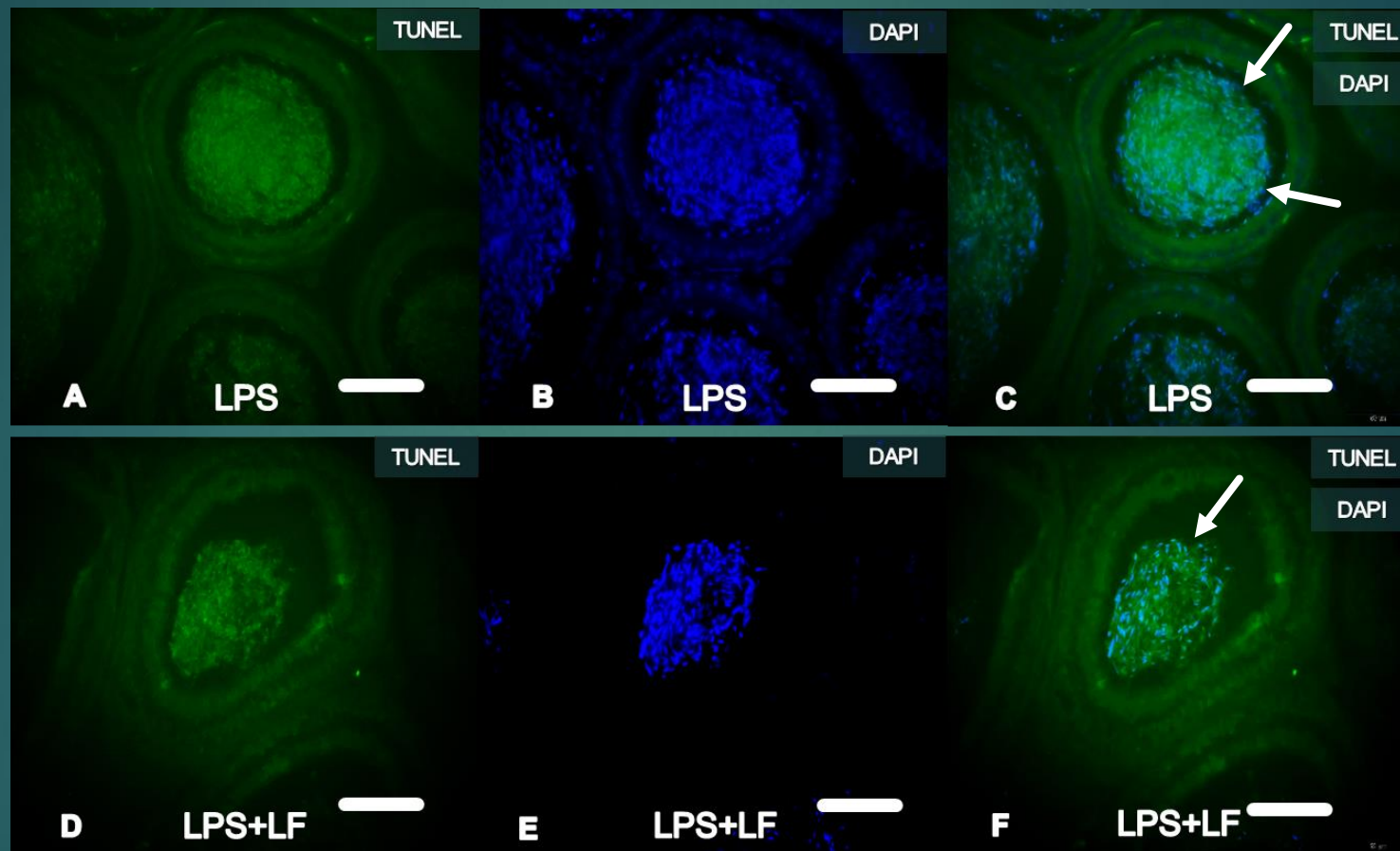
(Bars : 50 μ m)

▶ Control群（LPS）ではLF群（LPS+LF）に比べてアポトーシスを起こした精子が多数見られた（矢印）

結果

<実験1> LF経口投与による精子への影響（精巣上体）

▶ TUNEL法によるアポトーシス細胞の検出



(Bars : 50 μ m)

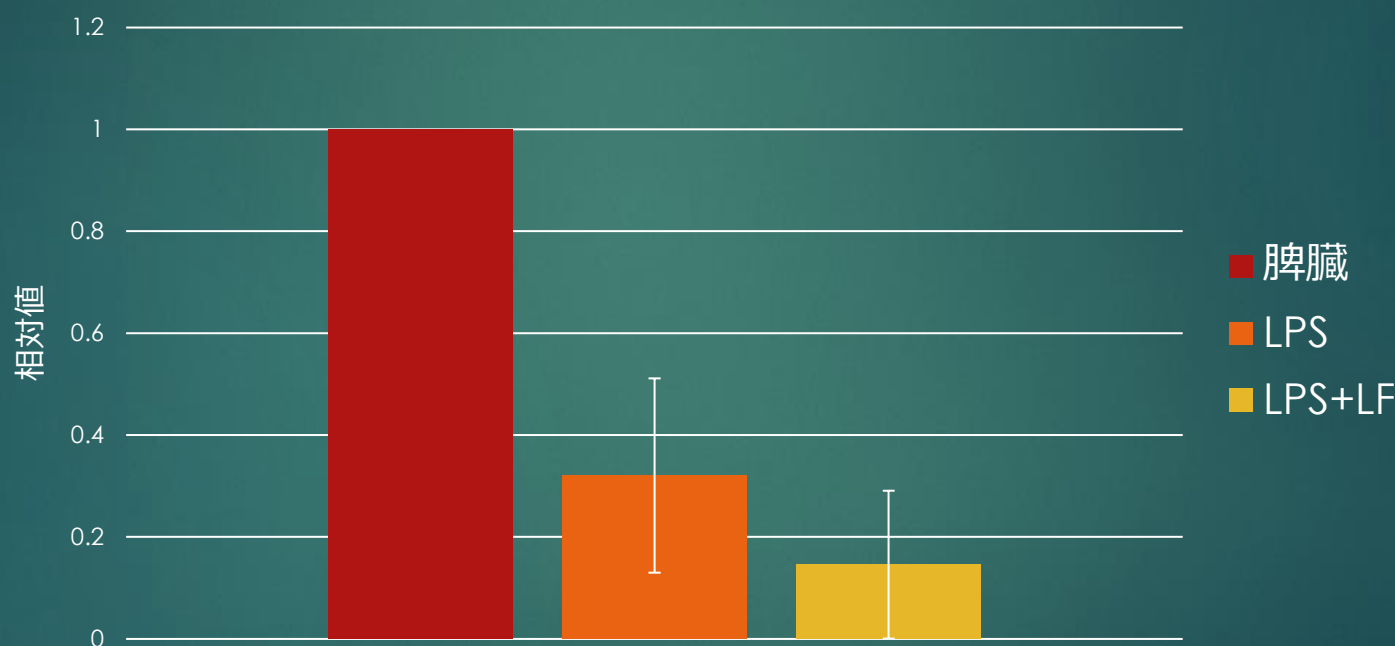
▶ Control群（LPS）ではLF群（LF+LPS）に比べてアポトーシスを起こした精子が管腔内に多数見られた（矢印）

結果

<実験1> LF経口投与による精子への影響

- ▶ リアルタイムPCRを用いたCaspase3の検出（精巣）

精巣におけるCaspase3発現量



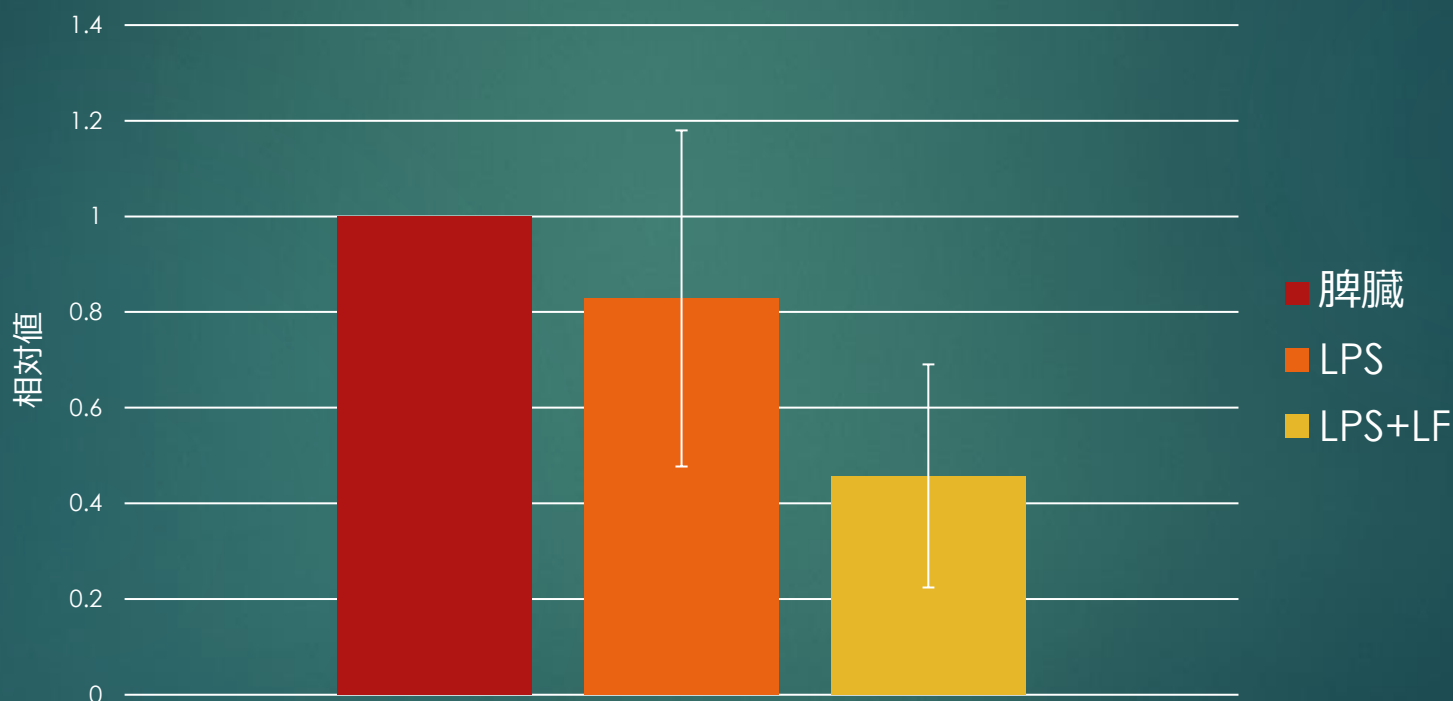
- ▶ Control群（LPS）、LF群（LPS+LF）間で遺伝子発現量に有意差なし ($p>0.05$)
- ▶ LF群の方がCaspase3発現量が低くなる傾向

結果

<実験1> LF経口投与による精子への影響

- ▶ リアルタイムPCRを用いたCaspase3の検出（精巣上体）

精巣上体におけるCaspase3発現量

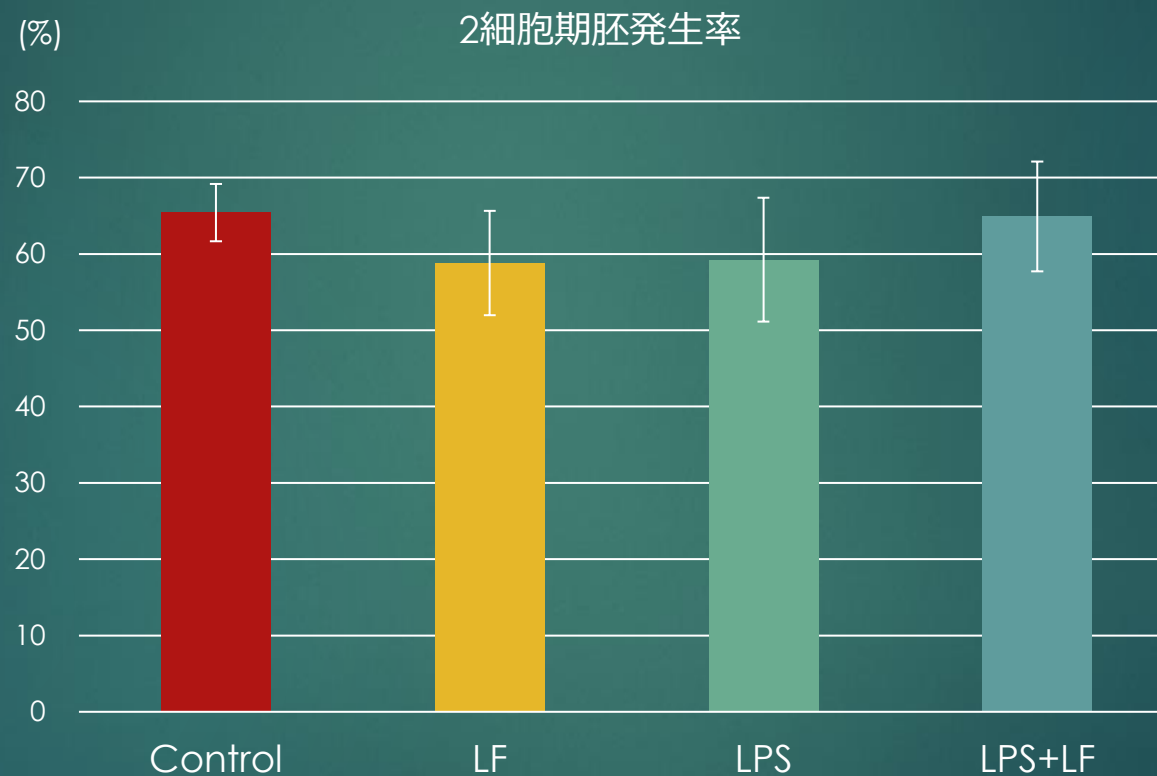


- ▶ Control群（LPS）、LF群（LPS+LF）間で遺伝子発現量に有意差なし ($p>0.05$)
- ▶ LF群の方がCaspase3発現量が低くなる傾向

結果

<実験2> LPSおよびLF存在下で体外受精した受精卵の胎仔発生

▶ 2細胞期胚発生率

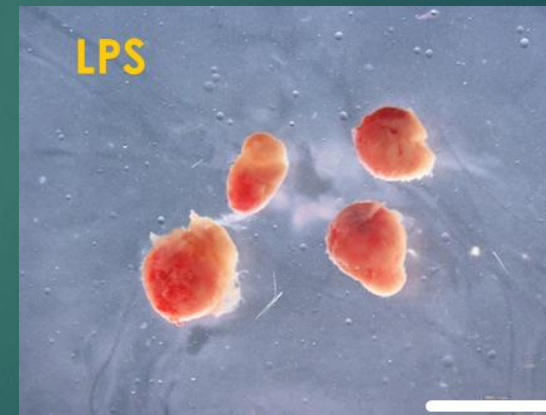
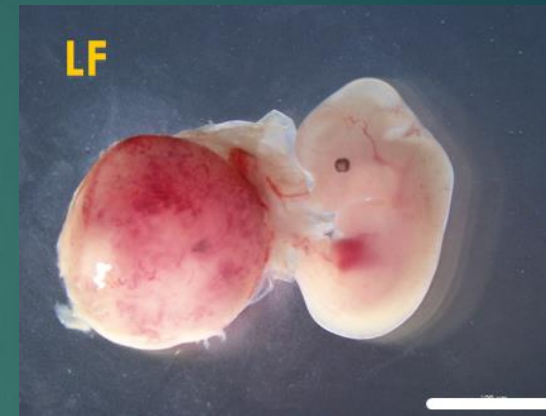


- ▶ 各条件間で2細胞期胚発生率に大きな差は見られなかった (p>0.05)

結果

＜実験2＞ LPSおよびLF存在下で体外受精した受精卵の胎仔発生

▶ 胎仔の形態学的観察



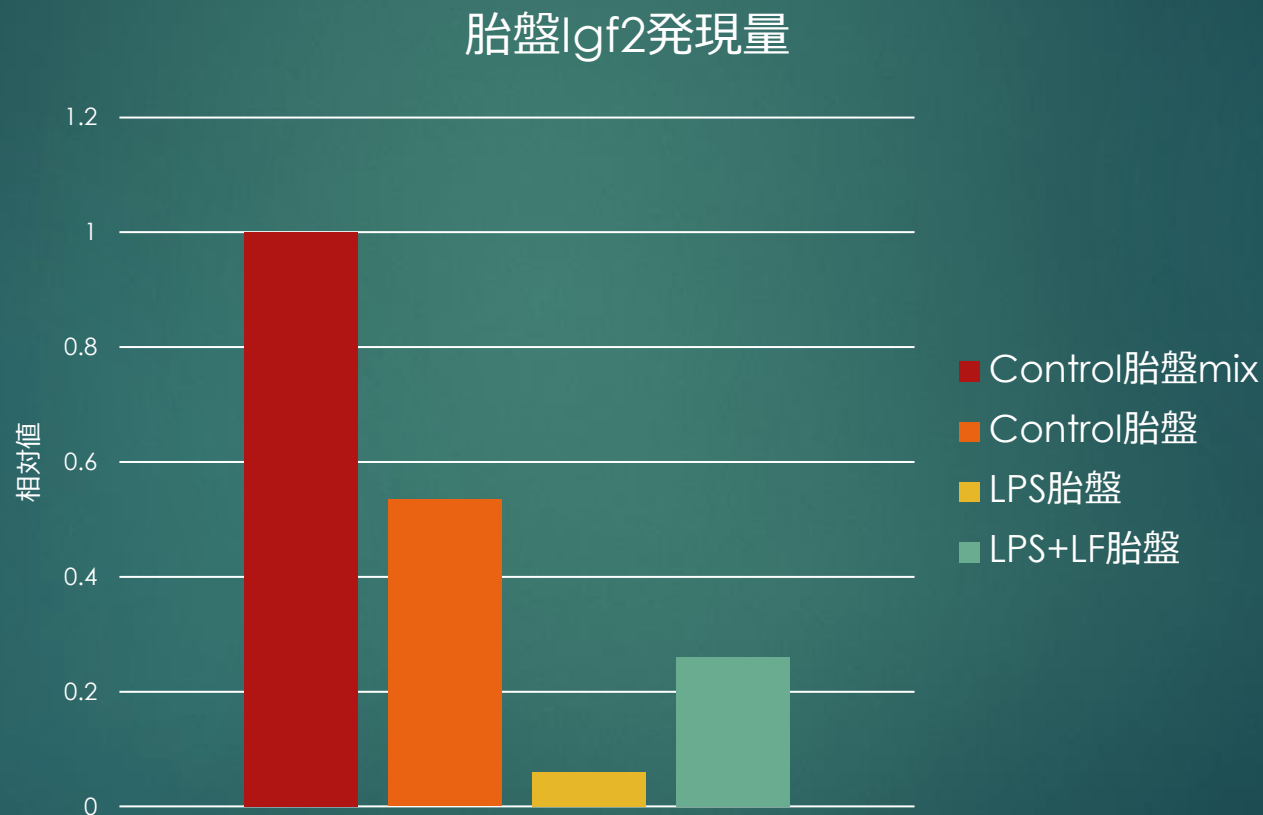
(Bars : 100 μm)

- ▶ Control、LF、LPS+LF胎仔に形態学的な差は認められなかった
- ▶ LPS単独では発生異常が多く見られた

結果

<実験2> LPSおよびLF存在下で体外受精した受精卵の胎仔発生

▶ リアルタイムPCRを用いたIgf2の検出



- ▶ LPS胎盤におけるIgf2発現量が低くなる傾向
- ▶ LPS胎盤に比べてLPS+LF胎盤においてIgf2発現量が多くなる傾向

まとめと考察

- ▶ LF経口投与によって精子のアポトーシスが抑制された
 - ▶ 経口投与されたLFが血中へ移行し、精巣・精巣上体へ作用した可能性
- ▶ LFおよびLPSで処理した精子を用いた体外受精卵の2細胞期胚発生率に著明な差は見られなかった
- ▶ LPS処理精子を用いると胚の発生異常が増加する傾向を示した
- ▶ LPS+LF処理精子を用いると胚の発生異常は減少する傾向にあった
 - ▶ LF精子処理は2細胞期胚の発生に影響しない
 - ▶ LF精子処理はLPSによる胎仔発生異常を抑制する



- LF精子処理は胎仔の発生に影響しない
- LFを用いた男性不妊治療が期待できる

従来技術とその問題点

不妊症のケースの約半数に男性不妊が関わっている(つまり、女性側だけでなく男性側にも原因がある)のが現実であると見られる。

男性不妊の機序は多岐にわたり、例えば性機能異常、造精機能異常、精路機能異常等が挙げられるが、歴史的に女性不妊と比べて認知度が低かったこともあって、男性不妊の理解は不足しており、男性不妊に対処する技術も比較的未開発なままである。

新技術の特徴・従来技術との比較

- ・ 精液の細菌汚染に対する対処としては、抗生物質を添加または内服することが考えられる。
- ・ しかしながら、薬物による副作用および耐性菌出現という可能性もある。
- ・ 本研究は、抗生物質の使用や物理的分離とは異なるアプローチによって、精子の細菌汚染に起因する特定態様の男性不妊に安全に対処することが出来る。

実用化に向けた課題

- 現在までにマウス精子及び胎仔に対する効果が見られたが、その分子メカニズムについては不分明であることから、詳細な解明が望ましい。
- 実用化に向けて、ヒトの精子を用いての確認を行う必要がある。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称： 男性不妊に対処するための組成物
- 出願番号： 特願2020-126521
- 出願人： 国立大学法人鳥取大学
- 発明者： 竹内 崇師

お問い合わせ先

国立大学法人鳥取大学 研究推進機構

TEL: 0857-31-5703

FAX: 0857-31-5571

e-mail: sangakucd@ml.cjrd.tottori-u.ac.jp