

学 位 論 文 要 旨

氏名 綾 高宏

題 目 : Effects of lactoferrin on fetal development
(胎仔発生に対するラクトフェリンの影響)

論文要旨 :

Modern human society faces the serious problem of infertility. The average age of marriage has increased, which has resulted in some challenges such as infertility. There are many reports about causes of infertility [Abrao et al., 2013, de Kretser, 1997, Ochsendorf, 2008], which can be roughly classified as female-dependent factors (e.g., egg aging, age-related chromosome segregation errors in oocytes, female genital tumors, ovulation disorder, antibody production against sperm) and male-dependent factors (e.g., oligospermia, asthenospermia, teratospermia, sexual dysfunction, genitourinary tract infection). These studies revealed that almost half of the causes of infertility result from male-dependent factors. In addition, there are other reports that bacteria frequently exist in seminal fluid, and many infertile male patients have semen that is contaminated with bacteria such as *Escherichia coli* [Moretti et al., 2009, Philippov et al., 1998, Shukla et al., 2012]. Therefore, seminal bacterial infection remains an important problem.

On the other hand, sperm cells express Toll-like receptor (TLR) on cell surfaces, such as TLR2 and TLR4 which are generally acknowledged to play a key role in immune responses in adaptive and innate immunity [Fujita et al., 2011, Fujita et al., 2011, Shimada et al., 2008]. TLRs are key upstream mediators of inflammation at many tissue sites, and TLR activation results in an inflammatory immune response [Akira and Takeda, 2004]. Approximately 10-15 mammalian TLRs have been identified, with TLR1-10 present in human and TLR1-13 present in mouse [Jiménez-Dalmaroni et al., 2016]. Each TLR recognizes a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) as specific components of pathogenic microorganisms, namely, bacteria, fungi, viruses, and parasites [Guan et al., 2010, Yuan and Wilhelmus, 2010]. For example, TLR2 recognizes peptidoglycan (PG), which is derived from Gram-positive bacteria, and TLR4 recognizes lipopolysaccharide (LPS), which is an endotoxin of Gram-negative bacteria [Fu et al., 2013, Poltorak et al., 1998, Qureshi et al., 1999]. In sperm, PAMP recognition by TLRs reduces cell motility and induces apoptosis, in addition to immune response initiation [Fujita et al., 2011, Fujita et al., 2011]. To prevent bacterial contamination of semen, oral administration of antibiotics or addition of antibiotics in semen has been performed [Magri et al., 2009, Okazaki et al., 2010, Vaillancourt et al., 1993]. However, frequent antibiotic use raises other problems such as negative influence on intestinal bacterial flora or

antimicrobial-resistant bacteria [Yoon and Yoon, 2018]. Moreover, bacterial components can remain in semen and continue to stimulate sperm TLRs.

On the other hand, I have studied the antibacterial property of lactoferrin (LF). LF is an iron-binding glycoprotein with a molecular weight of 78 kDa, which is contained in mammalian exocrine fluids including milk, tears, and vaginal fluids [García-Montoya et al., 2012]. Moreover, LF is known to have antimicrobial, anti-inflammatory, and antitumor effects [Tung et al., 2013]. Concerning its antimicrobial effect, LF competitively blocks the binding of LPS to TLR4, which inhibits TLR4-mediated signaling by LPS, and consequently suppresses inflammatory cytokine production [Drago-Serrano et al., 2012]. From these facts, I assumed that LF may also prevent the sperm apoptosis induced by pathogen LPS via sperm TLR4 and may facilitate the pregnancy.

Firstly, I examined the LF effect on sperm apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS). From the result of TUNEL assay, TUNEL-positive sperm cells were scarce in the group treated with LF and LPS compared to the group treated with LPS only. In addition, real-time RT-PCR detected lower mRNA expression levels of apoptosis-associated genes in the LF/LPS group compared to the LPS group.

Next, I further investigated the LF effect on embryo development by using LPS-treated mouse sperm. For the development rate of the 2-cell stage embryo, the embryo derived from LPS- and LF-treated sperm showed similar survival rate to the control embryo. On day 12 after the embryo transfer into the recipient, the frequent abnormality was observed in the embryo derived from LPS-treated sperm, and the abnormality was tended to be inhibited in the embryo derived from LPS- and LF-treated sperm.

These results indicate that the LF treatment on bacteria-contaminated sperm might decrease LPS-induced sperm apoptosis and the LF treatment of sperm may also facilitate the embryo development. Therefore LF may contribute to the improvement of infertility.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	綾 高宏
審査委員	主査：鳥取大学 教授 竹内 崇師
	副査：鹿児島大学 教授 浅野 淳
	副査：鳥取大学 教授 山野 好章
	副査：鳥取大学 教授 竹内 崇
	副査：鳥取大学 准教授 富岡 幸子
題目	Effects of lactoferrin on fetal development (胎仔発生に対するラクトフェリンの影響)

審査結果の要旨：

現代日本では晩婚化と出産年齢の高齢化が進んでいるが、これらに伴う少子化や不妊症が大きな社会問題となっている。ヒトの不妊症の原因としては、卵子の異常など女性に起因する問題が広く知られているが、男性に起因する問題も多数存在し、実に不妊原因の約半数に上る。また男性不妊症患者の約3分の1において、精液中に細菌が認められたという報告から、精液の細菌汚染は不妊の重要な要因の1つであると考えられている。

一方、精子の細胞表面上には Toll 様受容体 (Toll-like receptors: TLRs) が発現しており、特に TLR2 および 4 が強く発現している。TLRs は自然免疫において免疫応答に重要な役割を果たしており、各 TLR はそれぞれ異なる微生物由来の成分をリガンドとして認識する。例えば、TLR2 はグラム陽性菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカン、TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) を主に認識するが、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞はその細胞表面上に発現する TLR を介して微生物由来成分を認識し、各微生物に対する特異的な免疫応答を誘導する。しかしながら精子においては、精子 TLRs はこれらの菌体成分をリガンドとして認識した後、精子にアポトーシスが誘導される。このことから精液中の細菌の除去は男性不妊を改善する上で有効であると考えられ、ヒトの精液の細菌汚染の治療として抗生物質の投与などが行われている。しかしながら抗生物質の使用により様々な副作用や耐性菌の出現などの問題が生じることから、別の治療法が望まれる。

他方申請者は現在までラクトフェリン (Lactoferrin: LF) の抗菌作用に関する研究を行ってきた。LF は乳汁、涙液など哺乳類の外分泌液中に含まれる分子量約 80 kDa の鉄結合性糖蛋白質であり、抗微生物作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用等、生体に対して様々な生理活性を持つ。特に抗微生物作用についてはグラム陰性菌の LPS に競合的に結合し、TLR4 を介した炎症反応を抑制す

ることが報告されている。このことから申請者は、LF は精子においても細菌により誘導される TLR を介した精子アポトーシスを抑制し得る可能性について着想を得、精子細菌汚染を原因とする男性不妊治療へ応用できる可能性を探るため、実験を企図した。

第 1 章では、細菌により誘導される精子アポトーシスに対する LF の効果について検討した。方法としては、マウスに LF を 10 日間経口投与し、続いてグラム陰性菌由来 LPS を 5 日間腹腔内投与した。投与期間終了後に精巣および精巣上体を採取し、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法を用いて両部位におけるアポトーシス精子を検出し、アポトーシス細胞数の相違について LPS のみを投与した群と比較した。またリアルタイム RT-PCR 法を用いて、代表的なアポトーシス関連遺伝子である *Caspase3* の発現についても検討した。その結果、LPS のみを投与した群と比較して、LF および LPS を投与した群では TUNEL 陽性精子が優位に減少した。また精巣上体における *Caspase3* の mRNA 発現レベルについては、LPS のみを投与した群と比較して LF および LPS を投与した群で低い傾向を示した。

第 2 章では、精子の LF 処理が受精および胚発生に与える影響について検討した。方法としては、LF および LPS を添加した培養液にてマウス精子を前培養した後、運動性を有する精子のみを用いて体外受精を行った。続いて 2 細胞期胚にまで分化した胚の数を計測し、LF または LPS のみで処理した群との 2 細胞期胚数の相違を比較した。さらにこれらの胚を仮親マウスの卵管に移植し、移植 12 日後に胎仔と胎盤を摘出し、胎仔発生の程度を各群間で比較した。その結果、2 細胞期胚の発生率については、LPS のみで処理した精子に由来する 2 細胞期胚と比較して、LF および LPS で処理した精子に由来する胚の発生率は高い値を示したのに加え、LF のみで処理した精子に由来する 2 細胞期胚の発生率は未処置群の胚と同程度の発生率を示した。また胚移植後 12 日の胎仔または胎盤の発生については、LPS のみで処理した精子に由来する胚または胎盤では、発生異常が多く見られたのに対し、LF のみまたは LF および LPS で処理した精子に由来する胚および胎盤は、未処置群と同様の形態を示した。

これらの結果から、精液中の細菌により誘導される精子のアポトーシスは LF の投与により抑制される可能性が示唆されると共に、精子の LF 処理は受精および胚発生に影響を及ぼさないことが示唆された。すなわち LF の投与は精子細菌汚染を原因とする男性不妊治療へと応用できる可能性が示唆された。

以上により本論文は、博士（獣医学）の学位論文として十分な基準に達していると判断された。