

令和 2年 10月 20日

学 長 殿

主 査 宮本 明夫

学位論文審査の要旨及び結果並びに最終試験の  
結果について（報告）

令和2年 10月 9日付けで依頼されました下記の者の学位論文審査  
の要旨及び結果並びに最終試験の結果を別紙のとおり報告いたします。

記

専 攻 畜産衛生学専攻（博士後期課程）

氏 名 MORILLO Vernadyn Almeda

(別紙1)

学位論文審査の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻(博士後期課程)
氏名	MORILLO Vernadyn Almeda
審査委員署名	主査 宮本 明夫 副査 西田 武弘 副査 川島 千帆 副査 南保 泰雄 副査 福田 健二
題目	Dynamics of sperm-oviduct interaction that regulates maternal immune response in cattle (ウシ母体の免疫応答を制御する精子と卵管の相互作用ダイナミクス)
審査結果の要旨(1,000字程度)	
<p>卵管は、精子の貯蔵、精子受精能獲得、受精、初期胚発生など、生殖に不可欠な機能をサポートする活動的で動的な器官である。少数の精子が卵管に到達すると、排卵の時期には卵管膨大部まで移動し、そこで受精し、続く数日間の胚発生が進む。卵管膨大部が受精の場であるにも関わらず、精子と膨大部との相互作用、さらには卵管の免疫応答についてはほとんど知られていない。本研究では、これら一連の精子と卵管膨大部の免疫応答に関わる相互作用を、新鮮な卵管の器官培養系を開発して、ビデオ撮影を導入することでダイナミクスを多面的に観察して、最初の科学的基盤を得ることを目的とした。</p> <p>第1章では、精子と卵管上皮の相互作用を観察するために、排卵前の時期に採取したウシ卵管膨大部を使用した卵管組織片の器官培養モデルを開発した。卵管組織片は卵管膨大部の主要なヒダに由来し、サイズは約3mm x 3mmであった。卵管組織片は5%CO2を含む38.5°Cの炭酸培養器中に保持した培養液中で培養され、位相差および蛍光顕微鏡下で形態の顕微鏡観察を行なった。卵管組織片培養系に活発な精子の中片部をJC1で染色して加え相互作用を観察した結果、精子は頭部から繊毛にすぐに付着した。生存性評価により、精子と卵管組織片の培養に最適な状態が6時間まで維持されることが解った。</p>	

以上の結果から、卵管組織片モデルが精子と自然状態に近い卵管膨大部組織の相互作用の詳細な観察に適したモデルであることが示された。

第2章では、この新しいモデルを活用して、精子と卵管の相互作用、特に免疫応答への影響を詳細に観察した。精子をヘパリンで処理して受精能獲得を誘導した。ヘパリン処理した精子と処理していない精子の両方が同数で卵管組織片に付着したが、ヘパリン処理された精子のみが *TLR2*、*TGFB1*、*PGES*、および *IL8* の mRNA 発現を刺激した。この結果は、卵管組織片の上皮が受精能獲得した精子に対して免疫学的により敏感であることを示している。

第3章では、精子-卵管膨大部の相互作用における *TLR2* の関与を検証した。*TLR2* は、特異的なアンタゴニストによってブロックした。その後、卵管組織片への精子の付着、遺伝子発現、および *TLR2* タンパク質の発現と局在を評価した。精子の共培養システムに *TLR2* アンタゴニストを添加すると、15分で既に付着が減少した。同時に *TLR2*、*TGFB1*、および *IL8* の精子誘発性 mRNA 発現もブロックされた。重要なことに、卵管組織片への精子の付着は、上皮での *TLR2* タンパク質発現を強く誘導した。しかし、精子に対するこれら一連の組織の反応は、*TLR2* アンタゴニストによってブロックされた。

以上の結果から、本研究で開発したウシの卵管膨大部器官培養モデルによって、ウシ卵管上皮の *TLR2* を介した免疫応答を伴う精子認識が初めて示され、受精の阻害要因の新しい概念を提供した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が帯広畜産大学大学院 畜産学研究科 博士後期課程の学位論文として十分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

題目 : Toll-like receptor 2 mediates the immune response of the bovine oviductal ampulla to sperm binding

著者 : Vernadyn A. Morillo, Ihshan Akthar, Mariani F. Fiorenza, Ken-ichi Takahashi, Motoki Sasaki, Mohamed A. Marey, Susan S. Suarez, Akio Miyamoto.

学術雑誌名 : Molecular Reproduction and Development

(巻・号・頁) (2020年8月28日受理済)

発行年月 オンライン公表 2020年9月10日 <https://doi.org/10.1002/mrd.23422>

(別紙2)

最終試験の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻（博士後期課程）
氏名	MORILLO Vernadyn Almeda
審査委員署名	主査 宮本 明夫 副査 西田 武弘 副査 川島 千帆 副査 南保 泰雄 副査 福田 健一
実施年月日	令和2年10月19日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 口頭 <input type="radio"/> 筆記
要 旨	
<p>主査および副査の5名は、学位申請者に対し、講義棟25番教室において、学位申請者本人に口頭発表による学位論文内容の説明を行わせ、その内容について質疑応答を行った。また、関連する専門知識について口頭により試問を行った。</p> <p>その結果、学位申請者が帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻博士後期課程の修了者としてふさわしい学力および見識を有すると判断し、博士（畜産衛生学）の学位を授与するに値すると判断した。</p>	