

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10666

研究課題名(和文) 精子運動の活性化と受精率の改善を目指したトランスレーショナル・リサーチ

研究課題名(英文) Translational research aiming at activating sperm motility and improving fertilization rate

研究代表者

柴田 俊章 (Toshiaki, Shibata)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50529568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は糖分解酵素のひとつであるエンド-β-ガラクトシダーゼ(EBGase)をヒト精子に添加すると精子運動能が亢進することを報告している。本研究では臨床応用を見据え、安定供給の計れるリコンビナントEBGase製剤の作成から同製剤による実臨床想定実験での効果確認までを目的として研究した。EBGaseリコンビナント製剤の同定(候補製剤は6種類)と同製剤投与(大量合成可能であった4種類の製剤を使用)による精子運動能活性化の確認をヒト精子において行い、いずれも既存製剤と同等の結果が得られた。続いて、これらの中から最適リコンビナント製剤の選定と至適投与量や至適反応時間の探索を行い、その絞り込みが行い得た。

研究成果の概要(英文)：We reported that human sperm motility was enhanced by treating endo-β-galactosidase (EBGase), one of glycolytic enzymes. In this research, we aimed at preparing recombinant EBGase for clinical application. We identified six different recombinant EBGases. In all four formulations that could be synthesized in large amounts, motility activation in human sperm was observed as well as existing EBGase. Furthermore, we were able to select the optimal recombinant EBGase from among these and determine the optimal dose and reaction time.

研究分野：産婦人科学

キーワード：精子活性化剤 糖分解酵素 生殖医学 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

精子運動不全に依る不妊治療の一貫として行なわれる人工受精では、様々な精子運動促進剤が用いられているが、その作用機序や臨床効果が不明であることから、受精向上率は数%にも満たず、未だに受精率向上に有効な方法が存在しないのが現状である。そのため精子運動を向上させるメカニズムの解明と有効な方法が求められている。

2. 研究の目的

我々はヒト精子が多量の糖鎖で覆われていることに着目し、糖分解酵素のひとつであるエンド-β-ガラクトシダーゼ (EBGase) をヒト精子に添加すると精子表面の糖鎖が分解され、精子運動能が亢進するという機能変化が起こることを既に報告している。さらにこの機構は、ヒト精子に存在するポリラクトサミン糖鎖が EBGase 投与により分解されることで、ポリラクトサミン糖鎖と結合していた FGF 分子が遊離し、その受容体である FGFR2 を介して精子細胞内で cAMP の増加とカルシウム流入が惹起される情報伝達経路が関与していることを証明している。本研究では、臨床応用を見据え、安定供給の計れるリコンビナント EBGase 製剤の作成から、臨床検体での効果確認までを目的として研究した。

3. 研究の方法

(1) 新規リコンビナント EBGase の同定：EBGase 産生バクテリア株の培養液から EBGase を精製して N 末端アミノ酸配列を決定し、その情報から Genbank データベースを検索し *B. fragilis* EBGase cDNA を同定した。

(2) 新規リコンビナント EBGase の活性確認：PCR にて EBGase cDNA を増幅し、大腸菌の発現ベクターに組み込んで組換え体 EBGase を精製した。また、*B. fragilis* ゲノム DNA から PCR にて EBGase の cDNA を増幅し、ベクターに組み込み大腸菌に導入した。これをもって、発現ベクターを導入した大腸菌の lysate から組換え体 EBGase を精製した。さらに、精製 EBGase と市販されている *B. fragilis* EBGase (SIGMA) とを SDS-PAGE にて比較した。EBGase 活性の確認として、血清中のタンパク質には抗ケラタン硫酸抗体である 5D4 に反応性のケラタン硫酸糖鎖が付加されている。ウシ血清を 50 mM Na-OAc (pH 7.5) バッファー中で組換え EBGase あるいは市販されている EBGase と 37 °C で overnight 反応させ、血清タンパク質上のケラタン硫酸鎖の有無を 5D4 によるウェスタンブロットにて調べた。

(3) 新規 EBGase 投与によるヒト精子活性化の確認：新規リコンビナント EBGase 候補のうち、大量合成可能であった 4 つの酵素に関して、実験を行った。実験は、ヒト凍結精子を用い、CASA で測定 (SMAS, DITECT 社) した。

(4) 新規 EBGase の選別：ヒト精子への投

与による精子細胞内 Ca 流入を測定し、その選別と反応の最適性を検証した。

4. 研究成果

(1) 新規リコンビナント EBGase の同定及び作成：既存の EBGase 産生株から精製した EBGase のアミノ酸分析を元に得られた配列を、新規バクテリア (*B. fragilis*) ゲノムを検索したところ、一致する ORF が確認できた。さらに、同バクテリアに対して Blast サーチを行ったところ、さらに 5 つの ORF が発見された。(図 1)

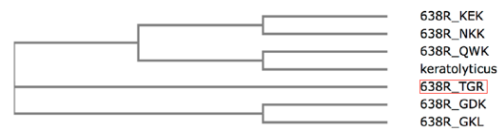


図1: keratolyticus EBGase との系統樹を示す。赤棒が最初にクローニングされた配列、その他5つが新しく発見された配列

(2) 未処理あるいは市販の EBGase で処理した血清タンパク質には 5D4 反応性のケラタン硫酸が検出されたが、組換え体 EBGase で処理した血清タンパク質には 5D4 に反応するケラタン硫酸鎖は検出されなかった。(図 2 A、B、C)

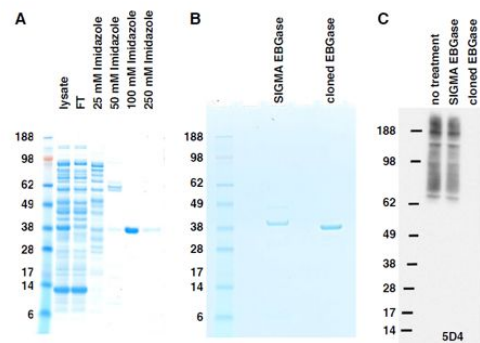


図2: A, 発現ベクターを導入した大腸菌の lysate から組換え体 EBGase を精製した。B, 精製 EBGase と市販されている *B. fragilis* EBGase (SIGMA) とを SDS-PAGE にて比較した。C, EBGase 活性の確認

(3) 新規 EBGase 投与によるヒト精子活性化の確認：4 つの新規組み換え EBGase のいずれにも、これまでの実験同様にヒト精子の運動能を向上させる活性が確認できた。(図 3)

(4) 新規 EBGase の選別

新しく精製した 4 つの EBGase のうち最も活性の高い酵素は QWKs であった。また、投与濃度を高くしても、反応速度の短縮を認めるが有意な活性変化量の上昇は起こらなかった。(図 4、図 5)

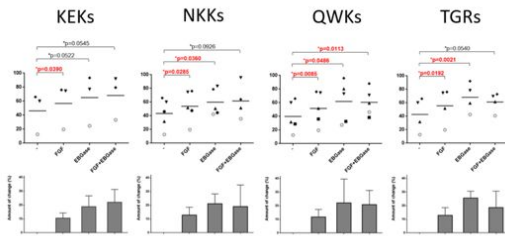


図3: 上段は、各酵素投与後のヒト精子運動率を示す。下段は、各酵素投与前後の精子運動率の上昇幅を示す。

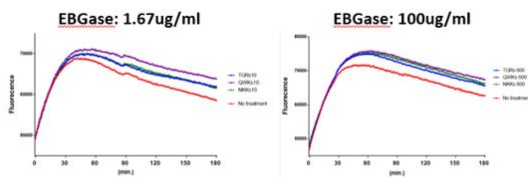


図4: 赤線は無治療、青線(TGRs)・紫線(QWKs)・緑線(NKKs)の各投与を示す。

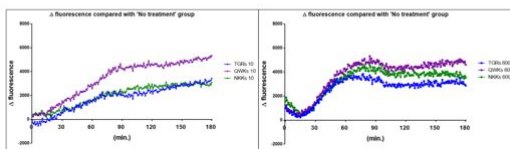


図5: 各酵素投与後のCa_i流入値から無治療のCa_i流入値の差をグラフ化。青がTGRs、紫がQWKs、緑がNKKs。また、左図は低用量投与、右図は高用量投与を示す。

(5) 将来への展望

我々がクローニングした6種類の新規リコンビナント EBGase を合成し、ヒト精子の運動能・受精能を高めて不妊治療に貢献する“新規不妊症治療”の薬剤として臨床使用することを目指し、至適投与条件を決定すること、さらに、合成法の確立が目標である。拳児希望の夫婦にとって、不妊治療に有効な薬剤の登場は強く望まれている。本研究課題である、糖鎖分解酵素 EBGase 処理による精子運動能活性化は、生体内で自然に起っている調節機構を促進するため、自然の摂理に即した方法といえる。また、基礎研究からスタートし臨床へ応用しているため、その効果が既に裏付けられている。さらに受精能の亢進効果は、少子化対策など社会問題へも貢献する薬剤となる可能性が高い。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Toshiaki Shibata, Screening and optimal dose determination of novel recombinant endo-β-galactosidases for clinical applications, SRI, 2018

柴田俊章、糖鎖と精子活性化に関して、糖鎖科学中部拠点「第14回若手のカフォーラム」, 2017

柴田俊章、ヒト精子運動能を向上させる新規組み換え endo-β-galactosidase の開発、日本生殖医学会、2017

柴田俊章、ヒト精子運動能を向上させる新規組み換え endo-β-galactosidase の開発、日本産科婦人科学会、2017

Toshiaki Shibata, Enhancement of human sperm motility by novel recombinant endo-β-galactosidases, SRI, 2017

〔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: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: 精子活性化剤およびそれを用いた活性化方法

発明者: 杉原一廣、福田道子

権利者: 浜松医科大学

種類: 特許

番号: 特許第 6008336 号

取得年月日: 平成 28 年 9 月 23 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 俊章 (SHIBATA, Toshiaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50529568

(2) 研究分担者

杉原 一廣 (SUGIHARA, Kazuhiro)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00265878

村上 浩雄 (MURAKAMI, Hirotake)

浜松医科大学・医学部付属病院・助教

研究者番号: 10432212

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

赤間 智也 (AKAMA, Tomoya)