

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15715

研究課題名(和文)精子品質管理の分子基盤：男性不妊治療戦略への挑戦的研究

研究課題名(英文)Molecular basis of sperm quality control: challenging approach toward a new therapeutic strategy for male infertility

研究代表者

常木 雅之(Tsuneki, Masayuki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40714944

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)：Mieapはミトコンドリア品質管理機構に重要な役割を果たす。Mieap欠損マウスは、精子の運動能異常や形態異常を示す。そこで本研究においては、Mieapの精子形成及び成熟における役割を、網羅的プロテオーム解析と電子顕微鏡解析を行うことによって調べた。結果として、精子の形態異常はMieap欠損マウスの精巣上体頭部から尾部にかけて認められた。一方で、ある種のキナーゼや解糖系関連タンパク質の発現異常が、Mieap欠損マウスの精巣・精巣上体(頭部から尾部)において認められた。このことからMieapは精巣での精子形成過程において精子ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たす可能性があること示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mieap plays a critical role in mitochondrial quality control. Mieap-deficient mice exhibited impaired mobility and morphology of the sperms. In this study, we examined the role of Mieap in sperm development and maturation in the testis, caput epididymis, corpus epididymis, and cauda epididymis by proteomics and electron microscopic analyses. As the result, abnormal morphology was detected in the caput epididymis to the cauda epididymis, but not in the testis, of the Mieap-deficient mice. On the other hand, some kinases and glycolysis-related proteins are significantly altered in the testis and epididymis of the Mieap-deficient mice. These results suggest that Mieap plays a role in the mitochondrial quality control of the sperm development.

研究分野：病理学

キーワード：男性不妊 酸化ストレス 精子 ミトコンドリア Mieap

1. 研究開始当初の背景

精子無力症は高速で直進する精子の運動性が著しく低下した症状であり男性不妊に直結するが効果的治療法はなく、精子運動機能障害に対する病理学的理解も乏しい。われわれは、がん抑制遺伝子 p53 によって発現制御される新規遺伝子 Mieap が酸化ストレスに曝露された不良ミトコンドリアを修復・排除し、ミトコンドリア品質管理を司ることで腸管腫瘍などの悪性化を防御していることを報告してきた (*PLoS ONE*, 6, e16054, 2011; *PLoS ONE*, 6, e16060, 2011; *PLoS ONE*, 7, e30767, 2012; *Sci Rep*, 2, 379, 2012; *Sci Rep*, 5, 12472, 2015)。同時に、Mieap はミトコンドリアが豊富な正常組織 (肝・腎・精巣など) においても恒常的に発現し、酸化ストレスからの恒常性維持に機能していることが判明した。一連の研究過程において、偶然にも、『Mieap 欠損マウスでは、精子が折れ曲がる異常形態を呈することで高速直進する運動機能が著減し、体外授精率が低下する』ことを発見した。精子における Mieap の機能は、がん抑制機能と同様に酸化ストレスの排除である可能性が示唆されたが、驚くべきことに、Mieap はミトコンドリア内部ではなく outer dense fiber 内に存在した。従って、『Mieap は単独あるいは複数のタンパク質と結合し、活性酸素種 (ROS) による酸化タンパク質を直接捕捉して精子を酸化ストレスから防御している』と仮説し、本研究に着想した。

2. 研究の目的

本研究目的は、『Mieap によって巧みに制御される酸化ストレスからの精子運動機能障害防御機構を理解する』ことにあり、最終目標は、『酸化ストレスに曝露された精子の運動機能を改善させ、男性不妊に対する革新的な治療戦略を確立し、臨床現場および出生率の低下という大きな社会問題

に研究成果を還元させること』にある。本研究は、がん研究で同定された Mieap が偶然にも精子運動能を明瞭に制御することを端緒とした萌芽的研究であり、不妊治療への革新的突破口となる可能性が極めて高い。

3. 研究の方法

- (1)精子における Mieap 結合蛋白質の同定
- (2)精子形成及び成熟過程における Mieap の役割の解明

の2点を明らかにするために、以下の実験を遂行する。

抗 Mieap 抗体を用いた免疫沈降実験

野生型 (WT) 及び Mieap 欠損 (KO) マウスの精子及び精巣からタンパク質を抽出して、抗 Mieap 抗体による免疫沈降を行い、網羅的プロテオミクス解析を行う。

Mieap ノックアウトマウスにおける網羅的プロテオミクス解析

野生型 (WT) 及び Mieap 欠損 (KO) マウスの精巣・精巣上体頭部・精巣上体体部・精巣上体尾部よりタンパク質を抽出し、網羅的プロテオミクス解析を行う。

Mieap ノックアウトマウスの精巣及び精巣上体に関する形態学的解析

野生型 (WT) 及び Mieap 欠損 (KO) マウスの精巣・精巣上体頭部・精巣上体体部・精巣上体尾部組織に対して電子顕微鏡解析を行い、形態学的異常の有無を調べる。

4. 研究成果

- (1)精子における Mieap 結合蛋白質の同定

抗 Mieap 抗体を用いた免疫沈降実験

精子及び精巣からタンパク質を抽出し、抗マウス Mieap 抗体を用いた免疫沈降実験

を行った。予備実験として行ったヒト大腸がん由来細胞株やヒト肺がん由来細胞株における抗ヒト Mieap 抗体による免疫沈降実験は、極めて特異的にヒト Mieap タンパク質およびその複合体の免疫沈降が可能であった。一方で、マウス精子及び精巣からの抽出液に対する抗マウス Mieap 抗体による免疫沈降では、マウス Mieap タンパク質の免疫沈降がきわめて困難であった。この理由としては、次の点を推測している。精子の中片部に存在する Mieap タンパク質は、免疫電子顕微鏡解析によって外側緻密繊維束に局在していることが明らかとなっている。このマウス精子 Mieap の大部分が不溶性画分に存在するため、タンパク質の可溶化が極めて困難となり、マウス精子 Mieap タンパク質の免疫沈降実験の大きな障壁となった可能性が高いと考えられた。また抗マウス Mieap 抗体の特性に関して行った予備実験において、マウス線維芽細胞を用いたマウス Mieap タンパク質の免疫沈降の効率が、抗ヒト Mieap 抗体に比べ、極めて低かったことも原因の一つと考えられる。今後は、新規エピトープに対する抗体の作成や、精子マウス Mieap タンパク質の生化学的解析による特性の理解と可溶化の手法の検討が必要と考えられる。

(2)精子形成及び成熟過程における Mieap の役割の解明

Mieap ノックアウトマウスにおける網羅的プロテオミクス解析

野生型 (WT) 及び Mieap 欠損 (KO) マウスの精巣・精巣上体頭部・精巣上体体部・精巣上体尾部よりタンパク質を抽出し、2DICAL 法による網羅的プロテオミクス解析を行った。2DICAL (2-dimensional image-converted analysis of liquid

chromatography and mass spectrometry) 法 (Mol Cell Proteomics, 5, 1338-1347, 2015) は、非ラベル共免疫沈降タンパク質を直接トリプシン消化し、質量分析解析を行うため、従来の銀染色ゲル内消化法に比べて簡便・迅速であり、サンプルのロスが少なく、正確に特異的な結合タンパク質同定が可能である。本手法を用いて、2群間の比較を行ったところ次の結果が得られた。興味深いことにある種のセリンスレオニンキナーゼや解糖系関連代謝酵素が Mieap 欠損マウスの精巣上体頭部・体部・尾部において発現レベルの有意な上昇を認めた。また複数の抗酸化物質が Mieap 欠損マウスの精巣・精巣上体頭部・精巣上体尾部での上昇傾向を示した。これらの結果は、Mieap 欠損マウスにおける精子ミトコンドリア由来酸化ストレスの増加とそれによる精子運動能低下の原因に関連する変化と推察された。今後はこれら分子の関与についてさらに詳細な解析を進める予定である。

Mieap ノックアウトマウスの精巣及び精巣上体に関する形態学的解析

野生型 (WT) 及び Mieap 欠損 (KO) マウスの精巣・精巣上体頭部・精巣上体体部・精巣上体尾部組織に対して、電子顕微鏡解析を行った。精子の中片部と主部の境界領域で屈曲した精子の形態異常を検出した。この異常は、精巣には認められず、精巣上体頭部から検出され、体部及び尾部にかけて形態異常の頻度が上昇していた。先行研究においては、Mieap ノックアウトマウスの精子に関して、体外受精における精子運動能低下や精子形態異常を認めていた。今回の解析から、精子の形態異常は精巣上体頭部より発生する可能性が示唆された。このことは、Mieap 欠損マウスは、精巣における精子の形成には大きな異常が認められ

ないが、いったん出来上がった精子が精巣上体へ放出され、成熟する過程で形態異常が発生する可能性を示唆している。今後は、精巣上体における精子成熟過程における精子形態異常の発生機序について解析を進める予定である。

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 2 件)

Tsuneki M, Kinjo T, Mori T, Yoshida A, Kuyama K, Ohira A, Miyagi T, Takahashi K, Kawai A, Chuman H, Yamazaki N, Masuzawa M, Arakawa H. Survivin: A novel marker and potential therapeutic target for human angiosarcoma.

Cancer Science. 査読有 2017 年 108 巻 p.2295-2305. doi: 10.1111/cas.13379

Nakamura Y, Arakawa H. Discovery of Mieap-regulated mitochondrial quality control as a new function of tumor suppressor p53. Cancer Science. 査読有 2017 年 108 巻 p.809-817.

doi: 10.1111/cas.13208

〔学会発表〕(計 17 件)

荒川 博文 「オートファジーとは異なるミトコンドリア分解メカニズムの発見とそのがん抑制作用について」 第 6 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 2018 年

荒川 博文 「オートファジーとは異なるリソソームによるミトコンドリア分解メカニズムの発見とその意義～ミトコンドリアを食べるタンパク質 Mieap のがん抑制作用について～」 第 17 回日本ミトコンドリア学会年会 2017 年

山本 真, 中村 康之, 月俣 直貴, 久万 亜紀子, 吉田 好雄, 荒川 博文 「Mieap induces cell death via non-canonical mitophagy in human cervical cancer.」第 17 回日本ミトコンドリア学会年会 2017 年

荒川 博文 「Mieap によって制御される新しいミトコンドリア品質管理メカニズムの発見とそのがん抑制作用について」日本放射線影響学会第 60 回大会 2017 年

中村 康之, 常木 雅之, 山本 真, 金城 貴夫, 二村 学, 久万 亜紀子, 荒川 博文 「Mieap によって誘導される新規マイトファジーとそのフェロトシス様細胞死を介したがん抑制作用における役割について」第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年

山本 真, 中村 康之, 久万 亜紀子, 山田 しず佳, 吉田 好雄, 荒川 博文 「子

宮頸がんにおいて Mieap は non-canonical mitophagy により細胞死を誘導する」第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年

中村 康之, 常木 雅之, 金城 貴夫, 二村 学, 山本 真, 久万 亜紀子, 荒川 博文 「Non-canonical mitophagy induced by Mieap and its role in tumor suppression via cell death」The 8th International Symposium on Autophagy 2017 年

山本 真, 中村 康之, 常木 雅之, 久万 亜紀子, 吉田 好雄, 荒川 博文 「Mieap induces cell death via non-canonical mitophagy in human cervical cancer」The 8th International Symposium on Autophagy 2017 年

中村 康之, 常木 雅之, 荒川 博文 「Mieap induced vacuole(MIV)によるミトコンドリア分解とそのメカニズム」第 10 回オートファジー研究会 2016 年

常木 雅之, 中村 康之, 荒川 博文 「Mieap は胃腺がんの発生及び悪性形質獲得を抑制する」第 10 回オートファジー研究会 2016 年

中村 康之, 常木 雅之, 荒川 博文 「Mieap, the mitochondria-eating protein, induces cell death by eating unhealthy mitochondria」第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会年会合同学術集会 2016 年

荒川 博文 「Mieap-regulated mitochondrial quality control and cancer: a new function of tumor suppressor」第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会年会合同学術集会 2016 年

常木 雅之, 中村 康之, 荒川 博文 「Mieap deficiency promotes vascular invasion of gastric adenocarcinoma in Gan mice」第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会年会合同学術集会 2016 年

中村 康之, 常木 雅之, 荒川 博文 「Mieap によって誘導されるミトコンドリアの分解除去を介した新しい細胞死の発見」第 75 回日本癌学会学術集会 2016 年

常木 雅之, 中村 康之, 荒川 博文 「Mieap deficiency promotes vascular invasion of gastric adenocarcinoma in Gan mice」第 75 回日本癌学会学術集会 2016 年

中村 康之, 常木 雅之, 相川 知徳, 曾我 朋義, 荒川 博文 「Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の破綻によるがん特異的異常ミトコンドリアの集積とその代謝特性について」第 4 回がん代謝研究会 2016 年

荒川 博文 「Mieap によるミトコンドリア品質管理のメカニズムとがん～新しい抗加齢戦略としてのミトコンドリア酸化ストレス制御について～」第 16 回日本抗加齢医学会総会 2016 年

(4)研究協力者
()

〔図書〕(計 1 件)

中村 康之、常木 雅之、荒川 博文 . メ
ディカルレビュー社、がん分子標的治療 15
巻2号、2017年、p184 - 190、総ページ数6

〔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
腫瘍生物学分野ホームページ
https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/cancer_biology/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

常木 雅之 (TSUNEKI Masayuki)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・外来研究員
研究者番号：40714944

(2)研究分担者

荒川 博文 (ARAKAWA Hirofumi)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・分野長
研究者番号：70313088

中村 康之 (NAKAMURA Yasuyuki)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・主任研究員
研究者番号：90569063

(3)連携研究者

()

研究者番号：