

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09204

研究課題名(和文) 神経伝達物質セロトニンとGABAによる哺乳類精子受精能獲得の調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of mammalian sperm capacitation by serotonin and GABA

研究代表者

藤ノ木 政勝 (Fujinoki, Masakatsu)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30316583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達物質であるセロトニン(5-HT)とGABAは、精子受精能獲得の惹起に関与するが、その調節機構は明らかではない。そのため、本研究では受精能獲得を惹起する調節機構について検討した。ハムスターでは、5-HTは5-HT2受容体を介したCaシグナルもしくは5-HT4受容体を介したcAMPシグナルによって受精能獲得は惹起された。マウスでは5-HTは5-HT2、5-HT3、5-HT4、5-HT7受容体を介して受精能獲得を惹起し、さらに体外受精の受精率も上げた。ラットでは5-HT4受容体を介して5-HTは受精能獲得を惹起した。GABAはマウス精子の受精能獲得を惹起したが、受精率には影響しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討でセロトニンとGABAは精子受精能獲得の惹起を引き起こす作用があることが分かった。さらに、セロトニンは精子受精能獲得の惹起を介して体外受精の受精率を上げる作用もあることが確認された。また、セロトニンによる精子受精能獲得の惹起はCaシグナルとcAMPシグナルを介して起こっており、このシグナルは神経細胞で知られるシグナルと同じ経路であった。これら本研究成果はセロトニンを利用することによって人為的に精子受精能獲得を起こさせることで、体外受精の成績を向上させられることを意味する。ヒト精子においてセロトニン受容体が存在するという報告もあり、今後生殖医療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine) and gamma-aminobutyric acid (GABA) induce sperm capacitation. In the present study, I examined regulatory mechanisms of sperm capacitation induced by 5-HT and GABA. In hamster sperm, 5-HT induced capacitation through Ca signals associated with a 5-HT2 receptor and cAMP signals associated with a 5-HT4 receptor. In mouse sperm, 5-HT induced capacitation through a 5-HT2 receptor, a 5-HT3 receptor, a 5-HT4 receptor and a 5-HT7 receptor. In addition, a success of mouse in vitro fertilization (IVF) increased in the presence of 5-HT. In rat sperm, 5-HT induced capacitation through a 5-HT4 receptor. GABA induced capacitation of mouse sperm, although it did not affect a success of IVF.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：精子 受精能獲得 セロトニン GABA 体外受精

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類精子は、受精能獲得と呼ばれる質的な変化を経て卵と受精できるようになる(Yanagimachi 1994)。受精能獲得をした精子は、頭部で先体反応を、尾部で運動の超活性化を示す。このうち、運動の超活性化をする能力は体外受精の成績と正の相関を持つことが最近示された(Alasmari *et al.* 2013)。また、運動の超活性化を増加・促進させるホルモンや神経伝達物質が幾つか見いだされ(Fujinoki *et al.* 2016)、人為的に運動の超活性化を起こさせることで体外受精の成績を上げられる可能性が示唆されている。

研究代表者は、齧歯類動物を用いて運動の超活性化の調節機構について研究を行ってきた。その中で、ステロイドやアミンといったホルモンや神経伝達物質により運動の超活性化を増加・促進させることができる事を報告してきた(Fujinoki *et al.* 2016)。本研究においては幾つか見出しているホルモンや神経伝達物質のうち、セロトニンと GABA に着目し、これら神経伝達物質がどのような仕組みで運動の超活性化を増加・促進させるのかについて検討した。また、受精能獲得の仕組みは種差がある事が分かっているので、本研究ではハムスター、マウス、ラットの3種類の齧歯類を用い、比較しながら検討を行った。

2. 研究の目的

ハムスター精子の運動の超活性化を増加・促進させる神経伝達物質としてセロトニンに、セロトニンの作用を抑制する神経伝達物質として GABA に着目し、どのような仕組みで調節をしているのかを明らかにする。また、ハムスター精子に観察された現象について、種特異的な現象なのかそれとも普遍的な現象なのかを調べるために、マウス精子とラット精子に対してどのような作用があるのかを検討する。

3. 研究の方法

ハムスター、マウス、ラットを用いた実験は獨協医科大学実験動物委員会の承認を得た後、指針に従って実施した(承認番号 0107)。成熟した雄ハムスター(10~20週齢)の精巣上体尾部から精子を採取した。約 5 μ l の drop として得た精子を 35mm の培養皿に添加し、3 ml の mTALP 溶液を加え、精子を懸濁した。5分静置し swim up させたのち、CO₂ インキュベーター (37℃、5% CO₂) 内に 4 時間静置して受精能獲得を起こさせた。精子の運動状態は、この 4 時間の間にビデオ位相差顕微鏡と精子運動解析装置を使用し記録し、解析した。細胞内シグナルを調べるために、種々の試薬を用いる場合は、swim up の時に添加した。複数の試薬を添加する場合は、目的に応じた順に 5 分間隔で添加した。得られた結果は、Student's t-test または repeated measures ANOVA post-hoc test で統計処理され、P 値が 5% 未満を有意とした。

4. 研究成果

(1) ハムスターについて

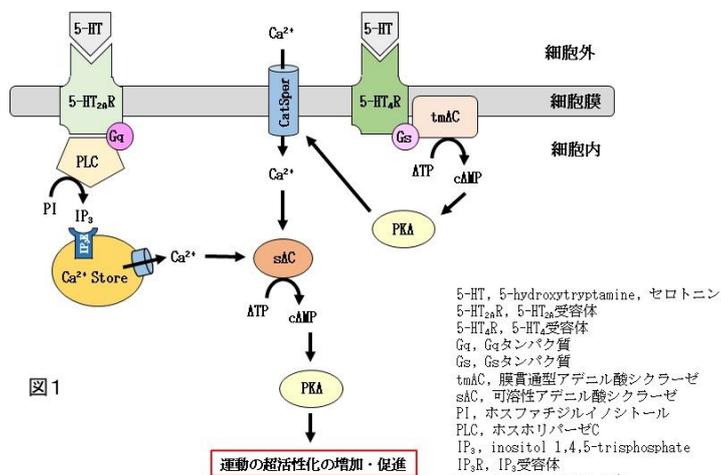
ハムスター精子では、セロトニンは運動の超活性化を増加・促進させ(Fujinoki 2011)、この増加・促進は GABA によって抑制されること(Fujinoki & Takei 2017)が分かっている。また、セロトニンによる運動の超活性化の増加・促進は 5-HT₂ 受容体と 5-HT₄ 受容体を介しており、低濃度では 5-HT₂ 受容体を、高濃度では 5-HT₄ 受容体が刺激される。そして、GABA は 5-HT₂ 受容体を介した運動の超活性化の増加・促進を抑制する。

まず初めに、5-HT 受容体は 7 種類のファミリーがあるが、ハムスター精子の運動の超活性化の増加・促進に 5-HT₂ 受容体と 5-HT₄ 受容体以外の受容体が関与するのかを各受容体のアゴニストを用いて検討した。その結果、5-HT₂ 受容体と 5-HT₄ 受容体のアゴニストのみが運動の超活性化の増加・促進を引き起こした。さらに 5-HT₂ 受容体は 3 種類のサブファミリーから成るので各サブファミリーのアゴニストを用いてどのサブファミリーが関与するのかを検討した。5-HT_{2A} 受容体、5-HT_{2B} 受容体、5-HT_{2C} 受容体のうち、5-HT_{2A} 受容体が関与しているのが分かった。加えて、精子運動解析装置を用いて motility kinetics を検討したところ、5-HT₂ 受容体と 5-HT_{2A} 受容体が刺激されて運動の超活性化が増加・促進された時に直線速度(VSL)の値が減少していた。

次に 5-HT₂ 受容体と 5-HT₄ 受容体の下流でどのような細胞内シグナルが作動しているのか、神経細胞における 5-HT₂ 受容体と 5-HT₄ 受容体の下流のシグナルを参考にしながら、検討した。神経細胞では 5-HT₂ 受容体の下流では Gq タンパク質を介してホスホリパーゼ C(PLC)の活性化が起こり IP₃ の産生を行う。産生された IP₃ は IP₃ 受容体に結合し細胞内 Ca ストアからの Ca の放出を促し細胞内 Ca 濃度を上げるとされる。そこで精子でも 5-HT₂ 受容体の下流で PLC と IP₃ 受容体の関与について阻害剤を用いて検討したところ関与が確認された。加えて、運動の超活性化の調節において可溶性アデニル酸シクラーゼ(sAC)とプロテインキナーゼ A(PKA)は key molecules であるとされ、sAC は Ca によって活性化され cAMP を産生し、cAMP は PKA を活性化させるが、5-HT₂ 受容体の下流で sAC と PKA が作用している事も確認された。

一方、5-HT₄ 受容体の下流のシグナルについて、神経細胞では Gs プロテインを介して膜貫通型アデニル酸シクラーゼ(tmAC)を活性化し cAMP の産生を促す。精子においても同様のシグナル

が作動しているか阻害剤を用いて検討したところ、精子でも 5-HT₄ 受容体の下流で tmAC が関与しており、さらに PKA も関与していた。さらに検討を進めたところ 5-HT₄ 受容体の下流でも sAC が関与していることが分かった。sAC は Ca により活性化されるため 5-HT₄ 受容体の下流で Ca シグナルが働く必要がある。運動の超活性化の調節において近年注目されている CatSper Ca channel というカルシウムチャネルがある。このチャネルは PKA によって活性化すると最近報告されたので(Orta *et al.* 2018)、5-HT₄ 受容体の下流で作動していないか検討したところ作動している結果が得られた。したがって、5-HT₄ 受容体の下流では tmAC の活性化と cAMP の産生が起こり、PKA の活性化を介して CatSper Ca channel が活性化し細胞外 Ca の流入が起こる。その結果、sAC の活性化と PKA の活性化が起こると考えられた。以上の事をまとめると図 1 の様なシグナル経路が考えられる。



(2) マウスについて

マウス精子に対してセロトニンと GABA がどのような影響を及ぼすのかは十分に分かっている訳ではない。そこでまずセロトニンと GABA によってハムスター精子と同様にマウス精子に対しても運動の超活性化の増加・促進を引き起こすか検討した。セロトニンは 5-HT₂ 受容体、5-HT₃ 受容体、5-HT₄ 受容体、5-HT₇ 受容体を介して運動の超活性化を増加・促進させていた。また、5-HT₂ 受容体および 5-HT₄ 受容体の下流ではハムスターと同様のシグナル経路(図 1)が作動していると考えられた。さらに、セロトニン存在下で IVF を行うと受精率が上昇し、受精率の上昇は 5-HT₂ 受容体、5-HT₄ 受容体、5-HT₇ 受容体の受容体を刺激した時に起こっていた。

一方 GABA はマウス精子の運動性の超活性化を増加・促進させる効果があった。この作用はハムスター精子の場合と異なっていた。GABA による増加・促進は GABA_A 受容体と GABA_B 受容体を介して起こっていた。さらに GABA 存在下で IVF を行ったところ、受精率を上昇させることはなかった。従って、GABA は運動の超活性化を増加・促進させる作用はあるが、セロトニンとは異なり IVF の受精率を上げるほどの作用はないと考えられた。

(3) ラットについて

ラット精子に対してもセロトニンと GABA がどのような影響を及ぼすのかは十分に分かっている訳ではない。そこでセロトニンと GABA によってハムスターおよびマウス精子と同様にラット精子に対しても運動の超活性化の増加・促進を引き起こすか検討した。セロトニンは運動の超活性化を増加・促進させたが、GABA は影響がなかった。そしてセロトニンは 5-HT₄ 受容体のみを介して運動の超活性化を増加・促進させていた。5-HT₄ 受容体の下流ではハムスターと同様のシグナル経路(図 1)が作動していると考えられた。

<引用文献>

Alasmari W, Barratt CLR, Publicover SJ, Whalley KM, Foster E, Kay V, Martins da Silva S, Oxenham SK. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum Reprod* 2013; 28: 866-876.

Fujinoki M. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* 2011; 142: 255-266.

Fujinoki M, Takei GL, Kon H. Non-genomic regulation and disruption of spermatozoal *in vitro* hyperactivation by oviductal hormones. *J Physiol Sci* 2016; 66: 207-212.

Fujinoki M, Takei GL. -aminobutyric acid suppresses enhancement of hamster sperm hyperactivation by 5-hydroxytryptamine. *J Reprod Dev* 2017; 63: 67-74.

Orta G, de la Vega-Beltran JL, Martín-Hidalgo D, Santi CM, Visconti PE, Darszon A. CatSper channels are regulated by protein kinase A. *J Biol Chem* 2018; 293: 16830-16841.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (ed.), *The Physiology of Reproduction* Vol. 2, 2nd ed. New York: Raven Press; 1994: 189-317.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chiyori SAKAMOTO, Masakatsu FUJINOKI, Masafumi KITAZAWA, Satoshi OBAYASHI	4. 巻 -
2. 論文標題 Serotonergic signals enhanced hamster sperm hyperactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yukiko SUGIYAMA, Masakatsu FUJINOKI, Hiroaki SHIBAHARA	4. 巻 65
2. 論文標題 Effects of 5-hydroxytryptamine on spermatozoal hyperactivation and in vitro fertilization in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 541-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章	4. 巻 2
2. 論文標題 セロトニンによる新たな男性不妊治療法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 62-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計34件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによる精子超活性化運動の惹起を介した体外受精成績の向上作用
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5-HTのマウス体外受精への影響
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによる精子超活性化の惹起と体外受精での受精率の向上
3. 学会等名 第154回関東生殖医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5HTによるマウス精子超活性化の惹起はIVFの成績を向上させるか？
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第39回学術大会、第30回日本性機能学会中部総会、第30回精子形成・精巣毒性研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 神経伝達物質セロトニンとGABAによる受精能獲得および受精の調節
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによる精子超活性化運動の惹起を介した体外受精成績の向上作用
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5-HTのマウス体外受精への影響
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによる精子超活性化の惹起と体外受精での受精率の向上
3. 学会等名 第154回関東生殖医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5HTによるマウス精子超活性化の惹起はIVFの成績を向上させるか？
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第39回学術大会、第30回日本性機能学会中部総会、第30回精子形成・精巣毒性研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 神経伝達物質セロトニンとGABAによる受精能獲得および受精の調節
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5HTを用いた精子の超活性化運動促進による新たな男性不妊治療法の開発
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによるハムスター精子超活性化の調節機構
3. 学会等名 第60回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5HTによるマウス精子超活性化の調節機構
3. 学会等名 第60回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 マウス精子超活性化への5-HTの影響について
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会および第28回精子形成・精巣毒性研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 マウス精子超活性化および体外受精の成績に対するセロトニンの影響
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第112回大
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤ノ木政勝、上村明、藤倉美佑、宮下真奈美
2. 発表標題 セロトニンによる超活性化促進効果のIVF成績への影響
3. 学会等名 第28回関東アンドロロジーカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 マウス精子機能に対するセロトニンの影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 ハムスター精子運動性へのセロトニンの影響
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 セロトニンによるマウス精子超活性化の調節機構
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによる精子超活性化の惹起と体外受精の成績向上について
3. 学会等名 第47回獨協医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによる精子超活性化運動の惹起と体外受精への影響
3. 学会等名 第29回Testis Workshop 精子形成・精巢毒性研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5HTによるマウス精子超活性化の調節
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによる精子超活性化の調節機構について
3. 学会等名 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018年合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 Regulatory mechanisms of serotonin-enhanced hyperactivation in hamster sperm
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5HTによるマウス精子超活性化の調節
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第37回学術大会および第26回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 セロトニンによるハムスター精子超活性化の調節機構について
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第37回学術大会および第26回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 5HTによるハムスター精子超活性化促進のシグナル機構
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山由希子、藤ノ木政勝、柴原浩章
2. 発表標題 5HTによるマウス精子超活性化の調節機構
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 ハムスター精子超活性化の5HTによる促進機構の解明
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 ハムスター精子超活性化の5HTによる促進機構の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 シプロヘプタジンによる生殖攪乱の可能性について
3. 学会等名 第26回関東アンドロロジーカンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 シプロヘプタジンによる生殖攪乱の可能性
3. 学会等名 環境ホルモン学会第21回研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤ノ木政勝
2. 発表標題 卵管内での精子機能制御～動物実験からの考察～
3. 学会等名 第4回とちぎ生殖医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujinoki M
2. 発表標題 Regulation of hyperactivation by interactions among oviductal hormones in hamster sperm
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原浩章、藤ノ木政勝	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 412
3. 書名 実践 卵管学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関