

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09258

研究課題名(和文) 精子運動活性化と受精率を向上させる糖転移酵素である新規薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of a new drug, a glycosyltransferase that activates sperm motility and improves fertilization rate

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

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)：我々は以前、ヒト精液中特定糖鎖が精子運動の活性化を調節していることを報告した。この特定糖鎖を分解する酵素であるエンド-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が亢進することなどを明らかにし、精子運動の調節機構を分子レベルで解明した。加えて、この作用は精子運動活性化に関与するのみでなく受精能や受精後の胚発生にも関与が示唆されることを見だし報告している。本研究目的は、この精子活性化剤として注目しているEBGase製剤をヒト精子の運動能・受精能を高めて不妊治療に貢献する新規薬剤として臨床使用することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において不妊治療患者数は46万人以上にものぼりさらに増加している。また、不妊症は少子化対策をはじめ女性の社会進出や晩婚化や高齢化による人口バランスの歪みなど様々な社会的問題に関与しているため、生殖医療技術の進歩と向上は常に求められている。本研究目的は、精子活性化剤として注目している新規製剤をヒト精子の運動能・受精能を高めて不妊治療に貢献する新規薬剤として臨床使用することを目指す。本研究の目標は注目製剤を含む新規培養液の開発であるが、現段階では未だ試作段階である。今後、精子活性化剤指標の検討や培養液組成に関する影響のさらなる追究を行うことを課題としている。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that specific sugar chains in human semen regulate the activation of sperm motility. We have clarified the regulatory mechanism of sperm motility at the molecular level by showing that the addition of endo-β-galactosidase (EBGase), an enzyme that degrades these specific sugar chains, to human spermatozoa enhances sperm motility. In addition, we found that EBGase is not only involved in sperm motility activity but also in fertilization ability and post-fertilization embryogenesis. The purpose of this research is to use this EBGase preparation, which is attracting attention as a sperm activator, as a novel drug for clinical use to enhance human sperm motility and fertilization ability and to contribute to infertility treatment.

研究分野：産婦人科学

キーワード：精子 精子活性化剤 糖分解酵素 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

我々は以前の研究において、ヒト精液中のポリラクタサミン糖鎖が可逆的に精子運動の活性化を調節していることを報告した。ポリラクタサミン糖鎖を加水分解する糖分解酵素であるエンド-β-ガラクトシダーゼ (Endo-β-galactosidase: **EBGase**) をヒト精子に添加すると精子運動が亢進すること、ヒト精子を **EBGase** で処理すると精子運動の情報伝達に關与する **cAMP** の増加と **Ca** 流入が誘導されること、ヒト精子に存在するポリラクタサミン糖鎖と相互作用する受容体が **FGFR2** であることを明らかにし、精子運動の調節機構を分子レベルで解明した。加えて、この作用は精子運動活性に關与するのみでなく、驚くことに、受精能や受精後の胚発生にも關与することを見だし報告している。しかしながら、この機能を有する糖分解酵素は現在市販されておらず、現行の **EBGase** は特定の研究者が所有する貴重な精製物のみとなっている。そこで我々は、最近の研究で既存の **EBGase** 産生バクテリア株の培養液から得られた精製 **EBGase** を元に、クローニングを実施して、新規リコンビナント **EBGase** 製剤を精製することに成功した。また、さらなる検討を加えた結果、同研究において使用したバクテリアゲノム上にはクローニングされた **EBGase** と同様の塩基配列を持つ **Open reading frame** が他に 5 つも存在することを発見した。すなわち、同研究において新規に 6 つのリコンビナント **EBGase** 候補を同定できた。本研究ではこれらの成果を踏まえた研究を行う。

2. 研究の目的

精子運動不全による不妊治療として行う人工授精や体外受精では、精子運動を向上させる有効な方法とメカニズムの解明が求められている。本研究の目的は、我々が報告した精子活性化剤として注目している糖分解酵素 **EBGase** を、新規リコンビナント製剤として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す。

3. 研究の方法

達成目標を見据えた方法の概要を下記に示す

(1) ヒト精子に対する新規精子運動活性化剤の至適投与量の検討：ヒト精子を用いて、数種類の新規薬剤添加での、精子内カルシウム流入の変化、細胞内 **cAMP** および **ATP** 変化など、主に運動性に関わる精子活性化に関する各種指標を測定し、至適リコンビナント製剤の選定と至適投与量の検討を行う。

(2) マウスによる新規薬剤投与による受精率および胚盤胞到達率の検証：主に運動性に関わる精子活性化が不妊治療応用につながり得るか確認するため、マウス精子を用いて、数種類の新規薬剤添加による検討を行う。

(3) 臨床応用に向けた最適化リコンビナント **EBGase** 製剤合成法の確立：実験室レベルの新規リコンビナント製剤合成プロトコルを基盤とし、企業と連携して臨床応用ベースの合成を確立すること

4. 研究成果

(1) 「ヒト精子に対する新規精子運動活性化剤の至適投与量の検討」：新規精子運動活性化剤のリコンビナント候補薬の選定を行うため、ヒト精子を用い、薬剤投与後の精子細胞内 **Ca** 流入を経時的に測定した。その結果、新規薬剤いずれにおいても **Control** 群に比して、細胞内 **Ca** 流入量は増加していることが確認され (図1)、既報の **EBGase** と同様の結果が得られた。細胞内 **Ca** 流入量やピークから候補薬の中でも反応性の違いも確認されたが、決して著大な差異ではなかった。この結果を受け、企業とリコンビナント **EBGase** 製剤を含む新規培養液の開発に進むが、試作培養液による臨床現場で判断可能な **CASA** や **SMAS** もしくは目視法を用いた精子運動能評価の実験では、既報で認められた精子運動能の上昇が本実験認められない結果であった。その後原因特定検討を行った。明らかな原因究明までの結果は至っていないが、既論文実験での市販培養液の組成 (未公表) 変化による影響、および試作培養液組成における特定分子の影響を示唆する実験結果を得られたこと、が確認された。しかしながら、現段階では未だ新規薬剤添加の培養試作液において、臨床現場で可能な測定法である精子運動測定機器や目視法を用いた精子運動能を指標とする検討では安定的な再現性を有する結果までは得られておらず、精子活性化別指標の検討や培養液組成に関する影響のさらなる追究が課題となっている。

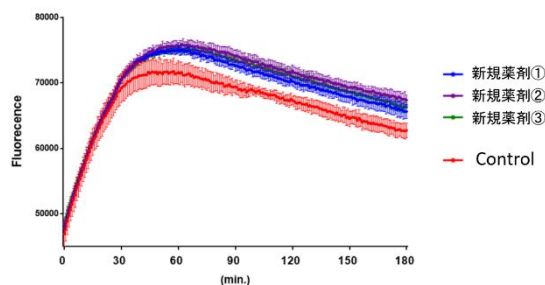


図1 各種新規薬剤添加後の細胞内Ca流入の経時的変化

(2) 「マウスによる新規薬剤投与による受精率および胚盤胞到達率の検証」:

マウス精子において既論文報告と同様、**EBG** 添加による受精率および胚盤胞到達率の改善を示す

再現性のある結果が得られている。

(3)「臨床応用に向けた最適化リコンビナント EBCase 製剤合成法の確立」: EBCase 製剤を含む新規培養液の開発を主眼として企業連携を図っているため、上記未成果により大量合成法の確立まで行うことには至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	杉原 一廣 (Sugihara Kazuhiro) (00265878)	藤田医科大学・保健学研究科・教授 (33916)	

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