

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14944

研究課題名(和文)精子活性化作用を有する天然物を用いた不妊症治療薬の開発

研究課題名(英文) Establishment of medicine for male infertility which activate sperm from natural products

研究代表者

太田 智絵 (Ohta, Tomoe)

長崎国際大学・薬学部・助教

研究者番号：10804221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：天然由来の精子活性化物質の探索とその作用メカニズム解明を目的として、生薬エキスおよび天然化合物ライブラリーから精子活性化スクリーニングを実施し、2種の生薬エキスおよび2種の化合物を見出した。見出した化合物の1つであるML-2-3について、マウスの体外受精の受精率を検討したところ、有意に受精率を向上させた。さらに、本化合物を用いて、精子運動解析システムによる詳細なモニタリング、経時的な先体反応の観察、濃度の最適化、安全性の確認などを実施し、安全性の立証および作用機序の解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、生殖補助医療に精子活性化剤が用いられているが、薬効や安全性が十分に立証されておらず、新たな精子活性化剤が望まれている。一方で、天然物の精子活性化剤に関する研究はなく、本研究は天然物分野における精子活性化剤探索研究の先駆的研究である。本研究結果により、新たな精子活性成分の提示でき、その作用メカニズムの特定が可能となる。さらに本研究を進めることで、機能性食品等や精子活性化剤の開発に繋がる可能性があることから、男性不妊症治療に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to find the sperm activators from natural products and the mechanism of them. We found two crude drugs and two compounds from sperm activation screening of about 40 kinds of crude drug extracts and compounds. Among active compounds, we found ML-2-3 increased the success rate of IVF in mice with low fertilization rate. Furthermore, to elucidate the mechanism of the compound, we examined the detailed monitoring using a sperm motility analysis system, observation of acrosome reactions over time, optimum concentration of the compound for sperm activation, and effect of sperm using the compound on egg.

研究分野：天然物化学

キーワード：精子活性化 男性不妊症 天然物 体外受精 生薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年日本では 5 組に 1 組の夫婦が不妊症であると言われており、そのうちの約半数が「男性不妊症」である。男性不妊症の主な原因は造精機能障害だが、その詳細なメカニズムが不明瞭であることから、有効な薬剤の開発に至っておらず、現時点で根本的治療法はない。今日、体外受精 (IVF) や顕微授精などの生殖補助医療が汎用されているが、出産に至ったケースは 2012 年で 11.6 % と低く、受精率を高めることが課題となっている。改善策の一つに、生殖補助医療における精子活性化剤の使用がある。精子活性化剤であるペントキシフェリンは精子の運動性を賦活させることが知られているが、受精率上昇作用に関するエビデンスは十分でない。さらに催奇形性等の検討も少ないことから、効果が立証された、安全性の高い精子活性化剤が求められている。

(2) 天然物は多彩な化学構造を有する化合物を数多く含有し、豊富な生物活性を示すものが多いことから、これまでに多くの薬剤が天然物から生み出されてきた。しかし、国内外の研究グループを見ても精子活性化及び受精率上昇作用を持つ天然物の探索およびその作用機序に関する研究は皆無である。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、我々が確立した IVF アッセイ系を軸とし、文献的・伝承的に生殖能力の改善に効果があると期待される生薬エキスおよび天然化合物についてスクリーニングを実施することで、精子活性化作用を有し IVF の受精率を向上させる化合物を同定する。

(2) 上記で効果があった化合物を用いて、至適濃度や安全性について確認する。さらに精子の運動性および先体反応を経時的に解析し、化合物が IVF の受精率向上にどのように寄与するかを明らかにすることで、効果が高く安全性の高い精子活性化剤の創出に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 生薬エキスおよび天然化合物ライブラリーのスクリーニング

我々が保有する生薬エキス (約 130 種) および天然化合物 (約 250 種) ライブラリーのうち、文献的および伝承的に生殖能力の改善に効果があるなどの薬効が期待される 40 種について、精子運動を観察した。サンプル添加した HTF 培地に、BALB/c マウスの精子を加え、経時的に精子運動の様子を電子顕微鏡にて観察した。(研究協力者: 長崎国際大学 正山 征洋 特任教授、長崎国際大学 宇都 拓洋 准教授、長崎国際大学 藤井 俊輔 講師)

(2) 活性成分の IVF の受精率の確認

精子運動の向上が認められた化合物について、マウスの IVF の受精率を調べた。サンプル添加した HTF 培地に BALB/c マウスの精子を加え、50 分間培養した。培養後、ICR マウス由来卵子を添加し、24 時間培養後に 2 細胞期の細胞数を確認した。(研究協力者: 長崎国際大学 田中 宏光 准教授)

(3) 活性成分の最適濃度の確認

IVF の受精率向上が認められた化合物について、最適濃度の検討を行った。(2) と同様の方法を用い、4 種類のサンプル添加濃度でそれぞれ行った。

(4) 活性成分の至適濃度での安全性の確認

偽妊娠マウスを用い IVF 由来受精卵の移植を行った。つまり、至適濃度である 20 μ M の ML-2-3 を処理した精子由来の受精卵を用い、KSOM 培地にて培養した。胞胚期になったものを ICR 偽妊娠マウスの子宮に移植し、出産させた。

(5) 活性成分の精子運動モニタリング

IVF の受精率向上が認められた化合物について、コンピューター補助精子分析を行った。サンプル添加した HTF 培地にて B6 マウスの精子を培養し、経時的に精子を採取し、HTM-CEROS にて運動精子数、運動速度、運動特性などを評価した。

(6) 活性成分の先体反応の観察

IVF の受精率向上が認められた化合物について、精子の先体反応に与える影響を解析した。サンプル添加した HTF 培地にて acrosin/EGFP マウスの精子を培養し、経時的に精子を採取し、電子顕微鏡にて観察した。可視光および蛍光下のそれぞれにおける精子数をカウントした。(研究協力者: 長崎国際大学 田中 宏光 准教授)

4. 研究成果

(1) 生薬エキスおよび天然化合物ライブラリーのスクリーニング

天然物由来の精子活性化物質の探索を目的として、我々が保有する生薬エキスおよび天然化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。文献的及び伝承的に生殖能力の改善に効果があるなどの薬効が期待される 40 種を選択し、BALB/c マウスの精子運動を経時的に確認した。その結果、2 種の生薬エキスおよび 2 種の天然化合物が精子活性化作用を示すことを明らかにした。

(2) *Morinda lucida* から単離した ML-2-3 の精子活性化作用

上記のスクリーニングの結果で得られた 2 種の天然化合物の 1 つは ML-2-3 である。ML-2-3 はガーナ産薬用植物 *Morinda lucida* に含有し、構造中にテトラサイクリックイリドイドを有する非常にユニークな化合物である。本化合物は我々が単離・構造決定し、抗トリパノソーマ活性などを見出した有用な化合物である。まず我々は、BALB/c マウス精子を用い、ML-2-3 の IVF の受精率を調べた。図 1A に示すように、ML-2-3 はコントロールに比べて、有意な IVF の受精率の向上が見られた。さらに、本化合物の最適濃度についても検証し、20 μ M が最も IVF の受精率が高いことが明らかになった (図 1B)。

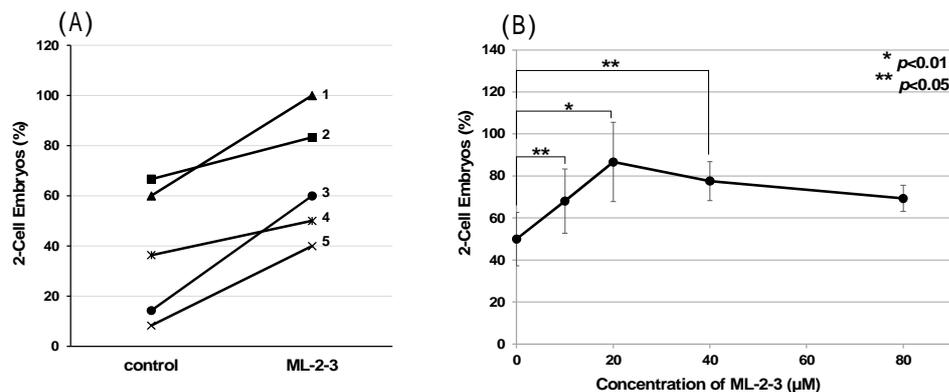


図 1 ML-2-3 の IVF の受精率 (A) および至適濃度の検討 (B)

さらに、ML-2-3 の胚に与える影響を確認するために、偽妊娠マウスへの IVF 由来受精卵の移植を行った。ML-2-3 で処理した精子由来の受精卵は正常に発生が進行し、異常が見られない産子を得ることができた。

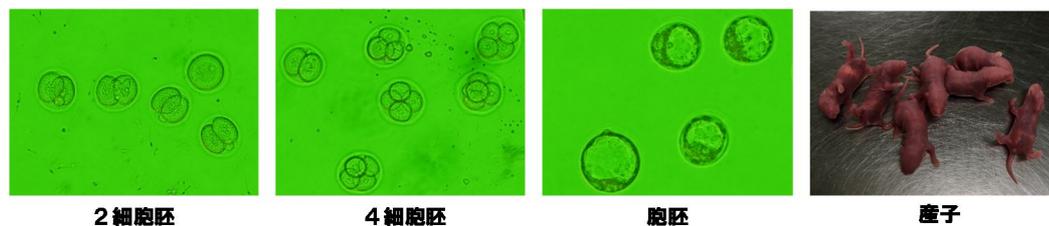


図 2 ML-2-3 処理後の胚および産子

続いて、ML-2-3 が精子に与える影響を検討するために、精子運動を詳細に解析した。コンピューター補助精子分析を用いて、運動精子数、運動速度、運動特性などの項目を評価した。その結果、ML-2-3 処理した精子はコントロールに比べて、運動精子、高速運動精子の比率の増加および非運動精子の比率の減少が見られた (図 3)。一方、その他の運動速度や運動特性には影響を与えなかった。

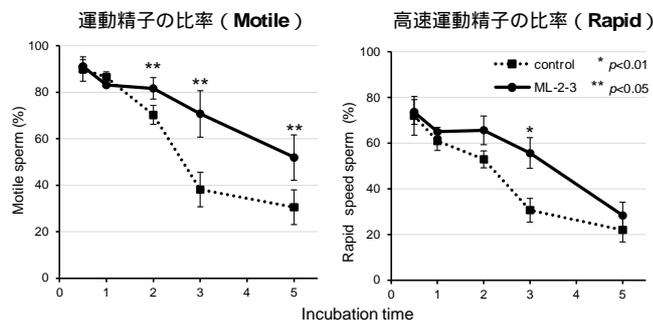


図 3 ML-2-3 の精子運動分析

さらに、ML-2-3 が精子の先体反応に与える影響を検討した。acrosin/EGFP マウスの精子の先体は通常、蛍光により発光するが、先体反応後は発光しない。この精子を用いて可視光および蛍光下において観察を行った。その結果、M-2-3 は先体反応に影響を与えなかった。

以上から、ML-2-3 は精子が機能する時間を短縮することなく、運動精子の割合を増加させることで、IVF の受精率を向上させることが示唆された。このような作用を有する精子活性化剤はこれまでに報告がなく、新たな作用機序を有する精子活性化剤の創出に繋がる可能性がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Aoki Yusuke, Tsujimura Akira, Kaseda Kazuhiro, Okabe Masaru, Tokuhiko Keizo, Ohta Tomoe, O'Bryan Moira K, Okuda Hidenobu, Kitamura Kouichi, Ogawa Yukiko, Fujiki Tsukasa, Wada Morimasa, Horie Shigeo, Nishimune Yoshitake, Tanaka Hiromitsu	4. 巻 85
2. 論文標題 Haprin-deficient Spermatozoa Are Incapable of in Vitro Fertilization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 534-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23344	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 該当する

1. 著者名 Ohta Tomoe, Tilkanont Tanatorn, Ayertey Frederick, Nakagawa Mina, Tung Nguyen Huu, Bolah Peter, Blagooee Heron, Appiah Alfred Ampomah, Ocloo Augustine, Ohashi Mitsuko, Tanoue Kensuke, Yamaguchi Yasuchika, Ohta Nobuo, Yamaoka Shoji, Iwanaga Shiro, Uto Takuhiro, Shoyama Yukihiro	4. 巻 164
2. 論文標題 Establishment of a quantitative and qualitative analysis and isolation method for tetracyclic iridoids from Morinda lucida Bentham leaves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 475 ~ 480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2018.10.044	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田 智絵、正山 征洋、宇都 拓洋、田中 宏光
2. 発表標題 ガーナ薬用植物 Morinda lucida に含有する成分の精子活性化作用
3. 学会等名 第3回食薬ヘルスイノベーション研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川未菜, 太田智絵, Frederick Ayertey, Tanatorn Tilkanont, Alfred Appiah, Augustine Ocloo, 大橋光子, 山岡昇司, 太田伸生, 岩永史郎, 宇都拓洋, 正山征洋
2. 発表標題 抗原虫活性を有するテトラサイクリックイリドイド類の効率的かつ簡易な単離方法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田智絵, Nguyen Huu Tung, 吉田達真, 宇都拓洋, Augustine Ocloo, 大橋光子, 岩永史郎, 山岡昇司, 太田伸生, 正山征洋
2. 発表標題 ガーナ産植物Morinda lucida Benthamに含まれる新規テトラサイクリックイリドイドの化学構造
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田智絵, Tanatorn Tilkanont, Nguyen Huu Tung, Frederick Ayertey, 田上兼輔, Alfred A. Appiah, Augustine Ocloo, 大橋光子, 宇都拓洋, 山口泰史, 岩永史郎, 太田伸生, 正山征洋
2. 発表標題 顧みられない熱帯病に有効なMorinda lucidaに含有する新規イリドイド化合物の分析
3. 学会等名 第2回食薬ヘルスイノベーション研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎国際大学 薬学部 薬品資源学研究室 研究紹介 http://niu.pharmacog.jp/index.html

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
研究協力者	正山 征洋 (Shoyama Yukihiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	宇都 拓洋 (Uto Takuhiro)		
研究協力者	田中 宏光 (Tanaka Hiromitsu)		
研究協力者	藤井 俊輔 (Fujii Shunsuke)		

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