

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16733

研究課題名(和文)アクチンキャッピングプロテインの精子妊孕能への影響と発現制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of testis specific actin capping protein on sperm fertility

研究代表者

惣田 哲次(Soda, Tetsuji)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20722656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：精巣特異的アクチンキャッピングプロテイン(CP)の精子妊孕能への関与を検討するため、体外受精(IVF)を行った男性不妊症患者の精液を用い、CPのタンパク発現と治療成績との関連について検討を行った。研究に同意を得られた82例を対象とし、CPの免疫組織染色にて評価し、正常形態精子100個をカウントし正常染色率を算出した。正常染色された正常群(n=46)では異常染色群(n=36)と比較して有意に受精率が高かった(65.5% vs 46.0%, p<0.05)。CPは体外受精の治療成績を予測する男性側のバイオマーカーになりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

男性不妊症はその多くが原因不明であり原因究明が強く望まれている。細胞骨格を構成するアクチンの重要な制御タンパクの一つアクチンキャッピングプロテインは、精巣特異的に発現しており精子形成に関わっていることが示唆されているが、临床上、妊孕能にいかに関与しているかは解明されていなかった。今回の解析により精巣特異的アクチンキャッピングプロテインはその構成タンパクの不均衡やタンパク発現の低下があると体外受精において受精率が低下することが判明した。アクチンキャッピングプロテインは体外受精の治療成績を予測する男性側のバイオマーカーになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the association of testis-specific actin capping protein (CP) on sperm fertility, we used ejaculated semen from infertile patients and analyzed the protein expression of CP by immunostaining and treatment results of in-vitro fertilization (IVF). A total of 82 patients were analyzed and divided into two groups, normal immunostaining group (n=46) and abnormal staining one (n=36). The fertilization rate was significantly higher in normal staining group than abnormal one (65.6% vs 46.0%, p<0.05). Though it was not significant, clinical pregnancy rate was higher in normal group than abnormal one (36.1% vs 26.9%, p= 0.40). In conclusion, testis specific CP was suggested to be associated with sperm fertilization and success rate of IVF, and can be a potential biomarker to predict the treatment result of IVF.

研究分野：生殖医療

キーワード：男性不妊症 アクチンキャッピングプロテイン 精巣特異的 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

男性不妊症はその多くが原因不明であり、原因究明が強く望まれている。最も重傷な男性不妊症である非閉塞性無精子症患者では精子形成が著しく障害を受けており、これまでも原因タンパクの同定が試みられてきた。我々は細胞骨格を構成するアクチンの重要な制御タンパクの一つ、アクチンキャッピングプロテインが精巣特異的に発現しており精子の形態形成に関わっていることを見いだしてきた。さらには、妊孕能の確認された健常ボランティアと男性不妊症患者の射出精子を用いた解析により、アクチンキャッピングプロテインは精子の形態形成だけでなく、精子の妊孕能にも関わっている可能性が推測された。一方、当タンパクは二つのサブユニット、キャッピングプロテイン 3および 3 (CP 3, CP 3) によって構成されているが、近年CP 3の発現はカルシウムオシレーションと呼ばれる卵の活性化因子である Phospholipase C zeta (PLC)と両方向性のプロモーターによって制御されていることが報告された。精巣特異的アクチンキャッピングプロテインが精子の受精後にも妊孕能に関与していることが推測された。

2. 研究の目的

アクチンキャッピングプロテインの精子の妊孕能への関与を明らかにするため、男性不妊症患者からの臨床検体を用いたタンパク発現の異常がいかに男性不妊に影響しているか解析することを目的とする。

3. 研究の方法

アクチンキャッピングプロテインの精子の妊孕能への関与を明らかにするため、男性不妊症患者の精液サンプルを用い、精液検査の各パラメータと精巣特異的アクチンキャッピングプロテインのタンパク発現、さらには体外受精や顕微授精における受精率および妊娠率を比較検討することで、当タンパクの精子の妊孕能への関与を検討する。タンパク発現は得られた精子検体を免疫組織染色することで評価することとした。精子頭部が CP 3 と CP 3 の双方に染色されるものを正常染色精子とし、CP 3 と CP 3 いずれかの染色欠損や染色低下を認めるものを異常染色精子とした。一方、CP 3 および CP 3 の発現制御機構の解析のため、CP 3 のプロモーター領域をレポーターアッセイを用いて同定する。

4. 研究成果

射出精子を得られ体外受精を行った男性不妊症患者のうち、研究に同意が得られた82例を対象とした。CP 3 と CP 3 のタンパク発現を免疫組織染色で評価し、正常形態精子100個をカウントした上で正常染色率を算出した。さらに、正常染色率と受精率、胚盤胞到達率、妊娠率との関連について検討した。年齢は、夫の平均値が 37.8 ± 5.0 歳、妻の平均値が 36.7 ± 4.4 歳であった。精子濃度は $130 \pm 68 \times 10^6$ /ml、運動率は $60.3 \pm 16.3\%$ 、奇形率は $47.9 \pm 15.0\%$ であった。全体の受精率は $57.0 \pm 35.3\%$ 、正常染色率の中央値は81.2%であった。CP 3 および CP 3 の正常染色率80%以上を正常群 (n=46)、80%未満を異常群 (n=36) の2群にわけて検討した。各群の患者背景は、夫および妻年齢、精液所見の運動率、正常形態精子率に有意差は認めず精子濃度のみ各々 $148 \pm 9.8 \times 10^6$ /ml、 $108 \pm 11 \times 10^6$ /mlと異常群で有意に低値であったが、体外受精を行う上で結果に影響する差ではないと考えた (Table 1)。

Table 1

	All ages		
	Normal stain \geq 80% (n=46)	Normal stain $<$ 80% (n=46)	p-value
Male age (years)	37.2 \pm 0.7	38.6 \pm 0.8	0.216
Female age (years)	36.7 \pm 0.7	36.9 \pm 0.7	0.832
Sperm concentration (10 ⁶ /ml)	147.9 \pm 9.8	107.9 \pm 11.0	$<$ 0.01
Clinical pregnancy (%)	60.2 \pm 2.4	60.4 \pm 2.7	0.969
Normal morphology (%)	45.5 \pm 2.2	50.9 \pm 2.5	0.103
White blood cell in semen	22.7 \pm 3.5	20.6 \pm 4.0	0.692

各群の受精率はそれぞれ65.6%、46.0% ($p<0.05$) であり、正常群で有意に受精率が高かった。胚盤胞到達率は56.9%、57.8%と2群間に差は認めなかったが、妊娠率は有意差を認めないものの正常群が高かった (36.1 % vs 26.9 %, $p=0.40$) (Table 2)。女性の妊娠率が低下するとされている36歳以上の例を除いて検討した場合も同様の結果だった。以上より精巣特異的アクチンキャッピングプロテインのタンパク発現は受精率との間に関連を認め、体外受精の治療成績を予測する男性側のバイオマーカーになりうることを示唆された。体外受精施行群だけでなく卵細胞質内精子注入法 (ICSI) 施行群における検討も試みたが、症例数が十分ではなく解析には至らなかった。一方、キャッピングプロテイン 3のプロモーター解析については現在も進行中である。

Table 2

	Normal stain \geq 80% (n=46)	Normal stain $<$ 80% (n=46)	p-value
Fertilization rate (%)	65.6 (n=46)	46.0 (n=36)	0.011
Blastocyst development rate (%)	56.9 (n=38)	57.8 (n=27)	0.918
Good-quality blastocyst development rate (%)	24.6 (n=38)	19.4 (n=27)	0.468
Clinical pregnancies /embryo (%)	36.1 (n=36)	26.9 (n=26)	0.395
Birth rate /embryo (%)	28.1 (n=16)	10.0 (n=15)	0.162
Birth rate /cycle (%)	31.3 (n=16)	10.0 (n=15)	0.124

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tetsuji Soda, Yasushi Miyagawa, Shinichiro Fukuhara, Hiromitsu Tanaka	4. 巻 19
2. 論文標題 Physiological Role of Actin Regulation in Male Fertility: Insight Into Actin Capping Proteins in Spermatogenic Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive medicine and biology	6. 最初と最後の頁 120-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12316	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 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 1件）

1. 発表者名 稲垣裕介、惣田哲次、福原慎一郎、上田倫央、藤田和利、木内寛、植村元秀、今村亮一、宮川康、中西佳子、一谷有希子、土屋真紀、岡本吉夫、野々村祝夫
2. 発表標題 精巣特異的アクチンキャッピングプロテインと受精率についての検討
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 第37回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲垣裕介、惣田哲次、関井洋輔、上田倫央、竹澤健太郎、福原慎一郎、藤田和利、木内寛、宮川康、土屋真紀、岡本吉夫、野々村祝夫
2. 発表標題 補助生殖医療における男性不妊の予測因子としての精巣特異的アクチンキャッピングプロテインの有用性の検討
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 Shinichiro Fukuhara, Tetsuji Soda, Yusuke Inagaki, Norichika Ueda, Hiroshi Kiuchi, Yasushi Miyagawa, and Norio Nonomura
2. 発表標題 HUMAN TESTIS-SPECIFIC ACTIN CAPPING PROTEIN 3 AS A POSSIBLE BIOMARKER FOR MALE INFERTILITY
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福原 慎一郎、惣田 哲次、関井 洋輔、稲垣 裕介、上田 倫央、竹澤 健太郎、木内 寛、岡本 吉夫、宮川 康、野々村 祝夫
2. 発表標題 精巣特異的アクチンキャッピングプロテインの補助生殖医療における男性側予測因子としての有用性の検討
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----