

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16739

研究課題名（和文）特発性男性不妊症の病態解明、バイオマーカー開発のための精子・精漿プロテオーム解析

研究課題名（英文）Proteomic analysis of human semen for elucidation of etiologies and development of biomarker in idiopathic male infertility

研究代表者

竹島 徹平（Takeshima, Teppei）

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：80811603

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：バイオマーカー候補として精子形成関連タンパク質（ミトコンドリア機能に関連）であるタンパク質A、てんかん関連タンパク質（繊毛・鞭毛に関連）であるBが特発性男性不妊群で発現低下していることが示唆された（Western Blotで検証済み）。

抗がん剤投与による造精機能障害患者と特発性造精機能障害患者の精子に発現するタンパク質を比較定量し、抗がん剤投与群でてんかん関連タンパクや酸化ストレス関連タンパクが高発現していることが示唆されたがWBで検証されず。今後は抗がん剤投与後に造精機能障害を有する患者と抗がん剤投与後に精液所見正常であった患者の精子中のタンパク質を定量比較する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国において合計特殊出生率は減少の一途を辿っており、深刻な少子化が進んでいる。現在5-6組に1組のカップルが不妊と考えられており、その原因の約半数が男性因子が関与している。男性不妊の約半数が原因の特定が困難である特発性男性不妊症であり、病態が不明であるがゆえに治療介入が困難であるという現状がある。そのため、特発性男性不妊症の原因解明および治療法の開発目的に精液中（精子・精漿）のバイオマーカーとなるタンパク質を同定するために本研究を行い、複数のマーカー候補となるタンパク質を同定した。今後検証を重ね、特発性男性不妊症の治療法確立に繋げていきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Protein A, a spermatogenesis-related protein (related to mitochondrial function), and B, an epilepsy-related protein (related to cilia and flagella), as candidate biomarkers, were suggested to be downregulated in the idiopathic male infertility group (already verified by Western-Blotting).

Comparison and quantification of proteins expressed in spermatozoa of patients with spermatogenesis dysfunction due to anticancer drug administration and those with idiopathic spermatogenesis dysfunction suggested that epilepsy-related proteins and oxidative stress-related proteins are highly expressed in the anticancer drug administration group, but this was not verified in WB. In the future, we plan to quantitatively compare proteins in sperm of patients with impaired spermatogenesis after anticancer drug administration and those with normal semen findings after anticancer drug administration.

研究分野：男性不妊症

キーワード：男性不妊症 プロテオミクス バイオマーカー探索

### 1. 研究開始当初の背景

現在、全カップルの6組に1組が不妊症と考えられており、その約半数に男性因子が関与していると考えられる。平成27年に行われた厚生労働省の男性不妊診療実態調査によると年間5000人超の男性不妊患者が新規に外来受診をしていることが明らかになった。しかし、同調査ではまた男性因子の約半数が特発性(原因不明)であることも明らかになった。その要因としては、男性不妊症はさまざまな疾患および病態の集合体であり、各病態の全容解明がまだまだ大きく進んでいないことが挙げられる。そのような理由からも、生殖補助医療(assisted reproductive technology: ART)の進歩に伴い、男性因子は治療介入を経ずにARTを導入されている例が少なくない。しかし男性因子を有するカップルのART治療成績は概ね不良であり、特発性男性不妊症の病態解明および治療法の開発は急務であると考えられる。経験的に漢方治療やサプリメントの内服などが行われているが、いずれも病態に則した治療とは言い難く、有効性についても決して高いとは言えないのが現状である。今回われわれは、特発性男性不妊患者をはじめとして、その他の男性因子患者についてもそれぞれに特異的に発現する精液中のバイオマーカー、そして妊娠の有無でそれぞれに発現する精液中のバイオマーカーがあれば、妊娠という治療アウトカム改善のための有効な治療法の開発に繋がるのではないかと考えた

### 2. 研究の目的

本研究では、疾患群と対照群間に発現量に差異のある精液中タンパク質を網羅的に解析することが可能である。男性不妊症は多くの病態の集合体であり、タンパクの構成も皆共通ではなく、いくつかのパターンに分けられると推測される。タンパクの構成パターンから病態进行分类することが可能である。精液検査は、男性の妊孕性を評価する重要なツールであるが、精子濃度や運動率以外にも、精子の「質」や妊娠の可否などを評価する再現可能かつ客観的なマーカーが臨床重要であると考えられる。本研究の目的は、疾患群と対照群間の精子または精漿中に発現量の差があるタンパク質を解析することにより、臨床上有効なバイオマーカーを探索するとともに男性不妊症の病態解明や治療法の開発、創薬へと繋げていくことにあり、患者の治療期間の短縮、および医療経済的なコスト低減にも繋がり社会にも還元可能であると考えられる。

### 3. 研究の方法

プロテオーム解析は検体を疾患群と正常群に分類し両群で発現に差異のあるタンパクを見出し、発現タンパクを定量することを目的としている。その中でも着目したのが、特発性男性不妊症例(原因が同定困難だが、精子濃度または運動率の低下がみられる)および抗がん剤投与後の造精機能障害を有する症例である。対照群として正常精液所見症例をおき、精子数(細胞数)を調整した上で質量分析法により両群間に発現量の差異のあるタンパク質の網羅的解析を施行する。その中から、分散分析で有意に群間の差異を認め、発現量が5倍以上のタンパク質を抽出する。その中から、有効なバイオマーカーとなりうる候補タンパクを絞り、タンパク質の作用や、タンパク質-タンパク質相互作用につき STRING 解析を行う。候補となるタンパク質に対する抗体を一次抗体としたウエスタンブロットを施行し、検証を行う。また、他の検体についても同バイオマーカーの発現につき確認を行う。

### 4. 研究成果

バイオマーカー候補として精子形成関連タンパク質(ミトコンドリア機能に関連)であるタンパク質A、てんかん関連タンパク質(繊毛・鞭毛に関連)であるBが特発性男性不妊群で発現低下していることが示唆された(図1:Western Blot 結果)。

また、抗がん剤投与による造精機能障害患者と特発性造精機能障害患者の精子に発現するタンパク質を比較定量し、抗がん剤投与群でてんかん関連タンパクや酸化ストレス関連タンパクが高発現していることが示唆されたがWBで検証されず。今後は抗がん剤投与後に造精機能障害を有する患者と抗がん剤投与後に精液所見正常であった患者の精子中のタンパク質を定量比較する予定である。

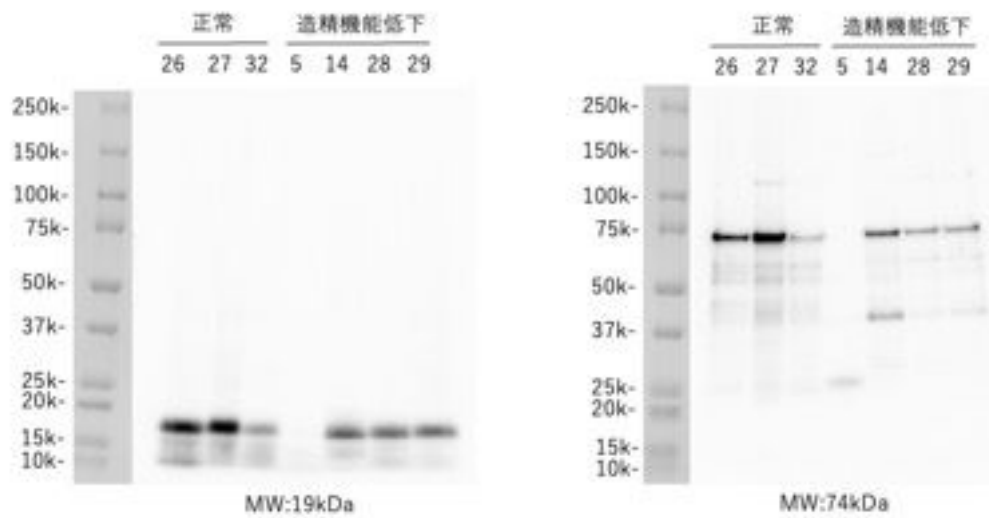


図1 タンパク質 A(左)および B(右)の Western Blot 結果。造精機能低下群で発現量低下

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹島 徹平
2. 発表標題 抗がん剤投与後の精液中活性酸素と造精機能障害の関連に関する検討
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第40回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teppei Takeshima, Shinnosuke Kuroda, Yasushi Yumura, Yoko Ino, Yayoi Kimura
2. 発表標題 Analysis on alternations of sperm protein profiles to elucidate the mechanism of impaired spermatogenesis by cancer chemotherapy
3. 学会等名 European Society of Reproduction and Embryology (ESHRE)（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teppei Takeshima, Shinnosuke Kuroda, Yasushi Yumura, Yoko Ino, Yayoi Kimura
2. 発表標題 Analysis on alternations of sperm protein profiles to elucidate the mechanism of impaired spermatogenesis by cancer chemotherapy
3. 学会等名 American Society of Reproductive Medicine (ASRM)
4. 発表年 2021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
研究協力者	木村 弥生  (Kimura Yayoi)	横浜市立大学先端医科学研究センタープロテオーム解析センター  (22701)	

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	井野 洋子  (Ino Yoko)	横浜市立大学先端医科学研究センタープロテオーム解析センター  (22701)	

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
---------	---------