

機関番号:32206

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2008年～2010年

課題番号:20591899

研究課題名(和文)精嚢蛋白をマーカーとした精子の質を判定する検査法の確立

研究課題名(英文)Establishment of the laboratory procedure to judge the quality of the sperm which assumed seminal vesicle protein a marker

研究代表者

岩本 晃明 (IWAMOTO TERUAKI)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号:60046117

研究成果の概要(和文):

従来、精子無力症の診断には顕微鏡下で精子運動率の測定を行うのが唯一の方法であったが、私たちが作成した Semenogelin(Sg)抗体を用いて精子へのSgの結合性を検討した所、精子運動率とSg結合率、結合量は負の相関を有し、精子無力症の診断パラメータとして有用であることが明らかになった。従来の検査法である精子運動率測定の問題点とされる射出後の時間や検者間差に影響されない新規マーカーとしての応用が期待される。

研究成果の概要(英文):

For a diagnosis of the asthenozoospermia, the only method is conventional measurement of sperm motility rate under a microscope. We investigate the association between Semenogelin(Sg) and spermatozoa in infertile men with asthenozoospermia using a anti-Sg antibody. Spermatozoa, washed by Percoll density gradients, were immunostained with anti-Sg antibody and subjected to flow cytometric analysis. The proportion of spermatozoa labeled with the antibody and the average intensity of fluorescence labeling per spermatozoa were analyzed in relation to the parameters used for semen analysis. A significant negative correlation was found between sperm motility and the proportion and intensity of labeling. The method presented in this study allows reproducible and objective assessment of the asthenozoospermia.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード:精子、精子運動抑制因子、精子無力症、検査法、生体分子

1. 研究開始当初の背景

女性一人当たりの平均出産数を示す合計特殊出生率が 1.29 となり、人口の減少が目前に迫っているわが国において、不妊症の治療は重要課題の一つである。平成 16 年、政府は少子化社会対策大綱を策定し、重点課題の中に『不妊治療への支援等に取り組む』という項目を織り込んだ。そこには「不妊を取り巻く要因など不妊に関する研究の取り組みを進める」という記載があるが、不妊症を扱う生殖医療の現状をみると、その原因究明よりむしろ対症療法的な生殖補助技術 (ART) の発展を目指す方向に向かっていることが危惧される。我々男性不妊を専門とする泌尿器科としては、自然妊娠を望むカップルの要望に応えるべく不妊症の基礎から臨床へつながる研究を行っていくことが、少子化対策の重要な一策であると考え。申請者は、男子不妊症外来の中で精子無力症によって妊娠に至らない症例を多く経験し、精子運動抑制因子 (Seminal plasma sperm motility inhibitor, 以下 SPMI と略す) が精子無力症の原因究明の手がかりになるのではと、SPMI の基礎および臨床研究を 20 年以上継続してきた。SPMI が精子運動を抑制する機序は、精子の運動機構に重要な dynein 腕に存在する dynein ATPase の活性を阻害することによると判明した (Mol Reprod Devel 31:55-62, 1992, 36:475-481, 1993)。SPMI の前駆体は精液凝固体の主要蛋白である semenogelin (Sg) であることを突き止め、次いで健常男性の精漿中 Sg 濃度と運動率を検討したところ軽度の負の相関を認めた (J Androl, 24:878, 2003)。また、Sg は活性酸素の生成を抑制することで精子の capacitation を阻害することも明らかにしている (J Androl, 22:672-79, 2001)。最近では免疫電子顕微鏡法ならびにフロー

サイトメーターを用いて Sg の精子細胞膜への結合性について検討を始めており、精子無力症患者の精子細胞膜には Sg が高率に結合していること、そしてその局在は精子の細胞膜が障害された部位であることを観察している。これらの予備検討から診断法としての有用性を確信し、現在抗 Sg 抗体を使用した精子の質評価法に関する特許申請中である。

国内外の関連研究の中でも、Sg の精子運動機構に着目した研究は我々独自のものである。生殖補助技術の発展にはめざましいものがあるが、まだまだ安全性が保障されたわけではないことから、自然妊娠が期待できる精子運動性改善のための機序解明、さらに創薬を目指すことは重要な課題で、現在のところ本研究に類する精子無力症の原因にせまる研究は見られない。

2. 研究の目的

本研究は従来にはない客観的な精子無力症診断法の確立を目的として新規マーカーを用いて精子の質を判定する臨床診断キットの開発を目指すものである。精子運動率の測定には現在顕微鏡下に目視で測定しているが検者間差が見られることが知られておりさらに射出後の時間によって運動率が低下する。そこで我々が精製した Sg をマーカーとして Sg の精子に対する結合部位を明らかにし、精子無力症における Sg 結合率・結合量の下限值などの判定条件を設定する。そして多数の不妊症患者ならびに健常男性の精子において検討を行い、精子無力症診断法として Sg の結合性が新たなマーカーとなることを証明する。さらには抗 Sg 抗体を用いた診断キットを開発し従来にはない客観的な精子無力症診断法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 男子不妊症（精子無力症含む）の試料バンクの構築：外来患者の精子・精漿・血清・DNAを継続して収集する。

(2) フローサイトメーターを使用したSPMI結合性の検討：健常者と不妊患者の洗浄精子を2%PFAで固定後、抗Sg抗体と反応させ、Alexa488標識抗マウスIgGで染色し、フローサイトメーターを使用してSPMIの陽性率（%）ならびに結合量（蛍光強度）を解析する。そして、精子無力症のカットオフ値を設定する。

(3) 上記手法で不妊クリニックを受診した患者の精子のSg結合率。結合量を測定しSg結合性と受精率、着床率、妊娠率等の臨床データとの関連を解析する

(4) 精子に対するSPMI結合性の観察
健常者と男性不妊症患者の精液をパーコールで遠心し、洗浄精子を調整する。抗Sgモノクローナル抗体で免疫染色し、光顕および電顕レベルでSgの精子細胞膜への結合性すなわち局在および結合量の相違を検討する。

4. 研究成果

(1) 不妊外来を受診した精子運動率 50%以下の患者および健常ボランティア男性のpercoll 洗浄精子を固定後、抗 Sg モノクローナル抗体と反応させ、蛍光標識 2 次抗体で染色し、フローサイトメーターを使用して Sg の結合率 (%) ならびに結合量（蛍光強度）を解析した。その結果、Sg 結合率 (mean±SD) は患者 (63±17%) で健常男性 (29±14%) に比較して有意に高く ($p<0.0001$)、精子運動率および生存率との間に強い負の相関 ($r=-0.64$, $r=-0.68$) が認められた。Sg 結合量も同様に患者 (579±456) は健常男性 (184±143) より有意に高く ($p=0.01$)、精子運動率および生存

率との間に負の相関 ($r=-0.37$, $r=-0.45$) を認めた。また Sg 結合率と結合量の間には正の相関 ($r=0.538$) が認められた。精子無力症患者は SPMI 結合率 55%以上かつ結合量 450 以上に分布しており、今回の対象集団においてはここがカットオフ値と考えられた。

(2) SPMI が運動不良な精子細胞膜を通過するのか、あるいは、もともと運動不良な精子細胞膜内に SPMI が存在するのか免疫電顕による検索を行った。研究協力者である千葉大形態形成学年森清隆教授らの協力を受け、結果をよりクリアにするため検体作製過程で起きるアーチファクトを最小限に留める工夫を検討しているものの、検討に充分量の運動不良精子を得ることの困難さなどもあり、結論を導き出すには更なる研究期間を要する。

(3) 上記カットオフ値が妊娠の予測因子となり得るのかを検証するため、不妊カップルの精子 SPMI 結合率および結合量を測定し、その値と顕微授精による受精率を検討した。その結果、精子運動率と Sg 結合能、結合率は負の相関を有し、さらに受精率とも負の相関があることを明らかにした。しかしながらまだ症例数が少ないことから結論には至らなかった。

(4) 抗 Sg 抗体を用いて運動不良精子のみならず機能不良と考えられる精子を吸着・排除し超選択的に受精に適する良質精子のみを選別する方法として磁性ビーズを用いた検討を行ったが精子を捕捉することはできなかった。またマイクロ流体チップに精通している共同国際ナショナルの下木原博士らと共同で抗 Sg 抗体をマイクロ流体チップの流路に固定する前検討として精子をマイクロチップに流せるかを検討したが精液の粘度が問題となり細い流路に精液を流すことが困難であることが判明した。今後は流

路に流す前の簡便な精子洗浄処理法を検討する。

5. 主な発表論文等

(1) [雑誌論文] (計 14 件)

- ① Kawano N, Yoshida K, Miyado K, Yoshida M. Lipid Rafts: Keys to Sperm Maturation, Fertilization, and Early Embryogenesis. *JLipids*, 査読有, 2011, 264706
- ② 谷口由香里, 岩本 晃明, 平野 泰子, 山田 治美, 旭 満里子, 藤倉 洋子, 室井 美樹, 茂木 美恵, 菅藤 哲, 高見澤 聡, 柳田 薫: hCG/r-hFSH 自己注射により精液所見が正常化した低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の一例. *日本受精着床学会誌*, 査読有, 2011, 28(1):40-45
- ③ Terai K, Yoshida K, Yoshiike M, Fujime M, Iwamoto T. Association of seminal plasma motility inhibitors/ semenogelins with sperm in asthenozoospermia-infertile men. *Urol Int*. 査読有, 85(2), 2010, 209-15
- ④ Sato Y, Nozawa S, Yoshiike M, Arai M, Sasaki C, Iwamoto T. : Xenografting of testicular tissue from an infant human donor results in accelerated testicular maturation. *Hum Reprod*. 査読有, 25(5):1113-1122, 2010.
- ⑤ Amano T, Imao T, Takemae K, Iwamoto T, Nakanome M: Testosterone replacement theraph by testosterone ointment relieves lower urinary tract symptoms in late onset hypogonadism patients. *The Aging Male*, 査読有, 13(4):242-246, 2010.
- ⑥ Katabami T, Kato H, Asahina T, Hinohara S, Shin T, Kawata T, Ohta A, Iwamoto T, Tanaka Y.: Serum free testosterone and metabolic syndrome in Japanese men. *Endocr J*. 査読有, 2010;57(6):533-9.
- ⑦ 谷口由香里, 岩本晃明, 池田俊也, 山田治美, 平野泰子, 旭満里子, 片寄治男, 室井美樹, 藤倉洋子, 佐々木志野, 柳田薫: 抗酸化剤 (ビタミン-E, -C, グルタチオン) による造精機能障害改善効果の検討. *日本受精着床学会誌*, 査読有, 2010, 7:104-11
- ⑧ 松下知彦, 長谷川太郎, 中野勝, 石田徳人, 岩本晃明: 高度乏精子を呈した左精索静脈瘤症例に低位結紮術を施行し術後精液所見の正常化及び自然妊娠を達成した一例. *日本受精着床学会誌*, 査読有, 2010, 27:237-240
- ⑨ Yoshida K, Krasznai ZT, Krasznai Z, Yoshiike M, Kawano N, Yoshida M, Morisawa M, Tóth Z, Bazsáné ZK, Márián T, Iwamoto T. Functional implications of membrane modification with semenogelins for inhibition of sperm motility in humans. *Cell Motil Cytoskeleton*, 査読有, 66(2), 2009, 99-108
- ⑩ Iwamoto T, Yanase T, Horie H, Namiki M, Okuyama A.: Late-onset hypogonadism (LOH) and androgens: validity of the measurement of free testosterone levels in the diagnostic criteria in Japan. *Int J Urol*. 査読有, 2009, 16:168-74.
- ⑪ Yoshida K, Kawano N, Yoshiike M, Yoshida M, Iwamoto T, Morisawa M: Physiological roles of semenogelin and zinc in sperm motility and semen

- coagulation at ejaculation in human. Mol Hum Reprod. 査読有, 2008, 14: 151-156
- ⑫ Yoshida M, Kawano N, Yoshida K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms Cell Mol Life Sci 査読有 65(21), 2008, 3446-3457
- ⑬ Kawano N, Yoshida K, Iwamoto T, Yoshida M. Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa. Biol Reprod. 査読有, 79(6), 2008, 1153-1159
- ⑭ Yoko Sato, Shiari Nozawa, Teruaki Iwamoto; Study of spermatogenesis and thickening of lamina propria in the human seminiferous tubules. Fertility and Sterility, 査読有, 2008, 90:1310-1312
- (2) [学会発表] (計 15 件)
- ① S. Kanto, T. Iwamoto: clinical efficacy of recombinant FSH in male hypogonadotropin hypogonadism patients and normogonadotropic nonobstructive azoospermic patients with MATURATION arrest of spermatogenesis. GNRH. 2011.2 Salzburg
- ② 松下知彦, 長谷川太郎, 中野勝, 石田徳人, 岩本晃明: 高度乏精子を呈した左精索静脈瘤症例に低位結紮術を施行し術後精液所見の正常化及び自然妊娠を達成した一例. 日本受精着床学会 2010年7月. 横浜
- ③ Terai K, Yoshida K, Yoshiike M, Iwamoto T, Matsuura R, Yoshida A. Evaluation of sperm quality based on SPMIs binding on ICSI outcome. 11th International Symposium on SPERMATOLOGY. 2010.6 Okinawa.
- ④ Iwamoto T, Yamakawa K. Matsushita T: Current semen quality of Japanese men. 11th International Symposium on SPERMATOLOGY. 2010.6 Okinawa.
- ⑤ Matsushita T., Fukuda M., Ito C., Toyam Y., Toshimori K., Iwamoto T: Successful ICSI pregnancy with use of testicular sperm from a patients with necrostermia and teratozoospermia. 11th International Symposium on SPERMATOLOGY. 2010.6 Okinawa.
- ⑥ 岩本晃明, 三重野牧子, 野澤資重利, 吉池美紀, 山川克典, 松下知彦: 日本人男性の精子数は経時的に減少しているのか—男性不妊症患者からの解析—. 第54回日本生殖医学会総会学術講演会. 2009年11月. 金沢
- ⑦ 谷口由香里, 岩本晃明, 片寄治男, 室井美樹, 藤倉洋子, 佐々木志野, 柳田薫: 抗酸化剤 (ビタミン-E, -C, グルタチオン) による造精機能障害改善効果の検討. 第54回日本生殖医学会総会学術講演会 2009年11月. 金沢
- ⑧ 松下知彦, 中野勝, 関隆, 河村寿宏, 福田勝, 矢内原敦, 岩本晃明: 大船中央病院における TESE の経験. 第54回日本生殖医学会総会学術講演会 2009年11月. 金沢
- ⑨ 吉田薫, ヒト精囊分泌タンパク質 SEMG1&2 による精子受精能獲得過程の制御, 第8回受精シンポジウム (日本動物学会第80回大会), 2009年9月, 静岡
- ⑩ 岩本晃明, 三重野牧子, 野澤資重利, 吉池美紀, 山川克典, 松下知彦: 日本人男性のテストステロン値は経時的に低下

しているのか—男性不妊症患者からの解析—, 日本アンドロロジー学会第28回学術大会ならびに総会および第15回精子形成・精巣毒性研究会, 2009年7月. 富山

- ⑪ Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Mieno M: Individual variation of semen quality in healthy Japanese young men: seminal examinations for every month a year. 5th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters 2009. 5. Copenhagen
- ⑫ 佐藤陽子、菱川善隆、末松貴史、岩本晃明、小路武彦: 成熟マウス精巣由来セルトリ細胞株を用いたin vitro精子形成過程再現の試み、第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2008年10月、長崎
- ⑬ 松下知彦、木村将貴、寺井一隆、吉池美紀、中野勝、岩本晃明: 左精索静脈瘤手術時に結紮した静脈数と太さは術後の精液所見改善の予測因子となり得るのか。第53回日本生殖医学会総会・学術講演会、2008年10月。神戸
- ⑭ 吉田薫、吉池美紀、吉田学、森澤正昭、Zoltan Krasznai、Terez Marian、岩本晃明: 精囊分泌タンパク質Semenogelinの精子膜電位および膜透過性への影響、日本アンドロロジー学会第27回学術大会、2008年7月、京都
- ⑮ 寺井一隆、吉池美紀、松下知彦、木村将貴、岩本晃明: 聖マリアンナ医科大学不妊外来におけるKlinefelter症候群の臨床統計、日本アンドロロジー学会第27回学術大会、2008年7月、京都

(3) [図書] (計1件)

Yoshida K, Iwamoto T, and Yoshida M, Nova Science Publishers, Human Spermatozoa:

Maturation, Capacitation and Abnormalities. Effects of the Seminal Plasma Proteins Semenogelin (SEMG)/Seminal Vesicle Secretion 2 (SVS2) on Sperm Fertility pp.205-220, 2010, pp545

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 晃明 (IWAMOTO TERUAKI)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号: 60046117

(2) 研究分担者

吉田 薫 (YOSHIDA KAORU)
桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師
研究者番号: 70398973

吉池 美紀 (YOSHIKE MIKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
研究者番号: 60398964