

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19198

研究課題名(和文) 哺乳類精子に対する新規診断マーカーと可逆的受精能阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of new diagnostic markers and reversible fertility inhibitors for mammalian spermatozoa

研究代表者

藤原 祥高 (Fujihara, Yoshitaka)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：70578848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者がこれまで発見した「見かけ正常な受精不全精子」に着目して、ヒトや家畜等で異常精子を検出できる抗体作製と新規候補因子の同定をゲノム編集マウスの開発を通して実施した。その結果、良質な抗体を得ることはできなかったが、精子膜タンパク質SPACA4と精巣上体タンパク質LCNs、LY6G5B/Cが精子受精能力に必要で診断マーカー候補となる事を見つけた。さらに、マウス解析からPDCL2タンパク質が精子形成に必須であることを発見し、このヒトタンパク質に特異的に結合する2種類の小分子化合物の同定に成功した。現在、これらを用いて可逆的な受精能阻害効果の検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、研究代表者が一貫して進めてきた男性不妊の新たな表現型「見かけ正常な受精不全精子」を示す原因遺伝子の探索と検出方法の開発に貢献する。原因遺伝子の発見は、哺乳類精子の受精能力制御メカニズムの解明に繋がり、検出法はヒトや家畜等の精子性状検査の主項目である精子量、形態、運動性に続く第四の検査項目としての可能性を再検証できた。また、精子タンパク質を対象に小分子化合物による受精機能阻害はホルモン療法に頼らない可逆的な男性避妊薬の開発に向けて研究を推進できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the newly discovered "morphologically normal spermatozoa with fertilization defects". We developed antibodies to detect abnormal spermatozoa in humans and domestic animals and identified new candidates through the development of genome-edited mice. While we could not obtain high-quality antibodies, we did find that sperm membrane protein SPACA4 and epididymal proteins LCNs and LY6G5B/C are necessary for the sperm fertilizing ability and can be candidates for diagnostic infertility markers. Furthermore, we discovered that the PDCL2 protein is essential for spermatogenesis via mutant mouse analysis and succeeded in identifying two types of small-molecule compounds that specifically bind to the human PDCL2 protein. Currently, we are investigating the reversible fertility inhibitory effects using these compounds.

研究分野：実験動物学

キーワード：診断マーカー 男性不妊 哺乳類精子 小分子化合物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では不妊が社会問題となっており、その原因の約半数が男性不妊であることが知られている。日本産婦人科学会の報告では、一年間に産まれる子供のおよそ 15 人に 1 人が体外受精により生まれている、不妊治療に掛かる費用等の問題はあがあるが、今後も体外受精に用いる精子の性状検査の需要が高まっていくことが予想される。一方、家畜でも自然交配と凍結精子を用いた人工授精が併用され、精子凍結のために精子の性状検査を行った上で実施されている。従来の家畜やヒト精子の性状検査項目は、精液量・形態観察・運動性などが主流で、本研究が着目する「見かけ正常な受精不全精子」を検出できる精子診断マーカーは研究開始当初には存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が発見した「見かけ正常な受精不全精子」を検出する精子診断マーカーの開発、そして小分子化合物による可逆的な精子受精能阻害剤の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 見かけ正常な受精不全精子を検出する精子診断マーカーの開発

研究代表者がこれまで開発してきた雄性不妊モデルマウスの多くは、正常な形態と運動性を持つ精子にも関わらず受精できない事から、男性不妊患者においても一因となり得ると考えた。実際に、研究代表者が発見した精子膜タンパク質 SPACA1 や GPI アンカータンパク質 TEX101 は男性不妊症や家畜の精子診断マーカーとして報告されている (Kishida et al. *Zygote* 2016; Schiza et al. *Mol Cell Proteomics*. 2019)。そこで、2019 年に報告した子宮から卵管への精子移行に必須な精子 GPI アンカータンパク質 LYPD4 (Fujihara et al. *PNAS*. 2019) や 2020 年に報告した受精膜融合に必須な精子膜タンパク質 FIMP, SOF1, SPACA6, TMEM95 (Fujihara et al. *PNAS*. 2020; Noda et al. *PNAS*. 2020) を解析対象とした。これらの KO マウス精子も形態や運動性は正常であることから、精子診断マーカーの有力候補として検証した。具体的には、精子における局在・タンパク質量・翻訳後修飾などが指標となるように抗体を作製し、精子検体を簡易検査によって異常の検出やその割合を蛍光顕微鏡や精子運動性測定装置を用いて検定することを目標とした。

(2) 小分子化合物による可逆的な精子受精能阻害剤の開発

上記 (1) の発展型として、可逆的な受精能力の阻害効果を示す小分子化合物の探索を試みた。具体的には、KO 雄マウスが不妊を示す原因タンパク質を同定して、大腸菌や哺乳類細胞を用いてリコンビナントタンパク質を精製し、研究代表者が客員教員を務める米国ベ일러医科大学創薬センターにて DNA エンコードライブラリーを用いて目的タンパク質に結合する小分子化合物を共同研究者と協力して探索した。強い結合を示す小分子化合物を絞り込めたら、結合部位に変異を導入した精製タンパク質などで再検証を行い、野生型雄マウスへの投与実験により精子の形態観察、運動性解析、そして体外受精などの一般的な受精能力解析を行うことで阻害効果を測ることを計画した。

4. 研究成果

(1) 見かけ正常な受精不全精子を検出する精子診断マーカーの開発

これまで使用してきた抗 LYPD4 抗体はウエスタンブロット (WB) と膜透過処理後のマウス精子を免疫蛍光染色 (IF) することができた (Fujihara et al. *PNAS*. 2019)。本研究では、生きたマウス精子で検出できる新たな抗体作製を試みたが、残念ながら良好な反応性を持つ抗体を得ることはできなかった。その他、SPACA6 については、共同研究先が WB に使える抗体作出に成功し (Lu et al. *PNAS*. 2023)、今後は分与して頂いて研究に用いる計画である。そして、精子膜タンパク質 SPACA4 に対する反応性の高いモノクローナル抗体の作製に

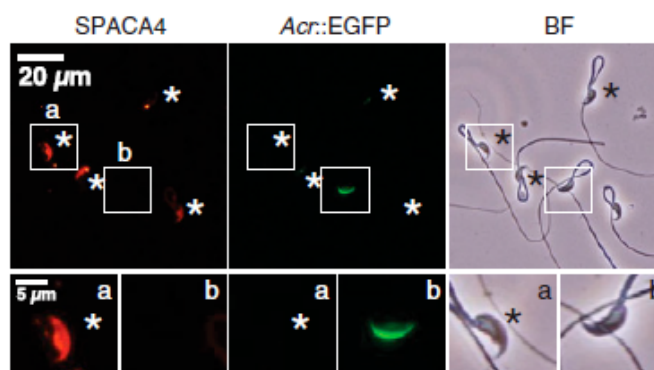


図 1. 生きたマウス精子での SPACA4 の局在観察。抗 SPACA4 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、SPACA4 は受精可能な先体反応後精子 (緑色蛍光消失) でのみ検出された。SPACA4-KO 精子は卵子透明帯の通過異常を示すことから、精子膜タンパク質 SPACA4 は受精に必要な因子である事を発見した (PNAS. 2021)。

成功したため、生きたマウス精子の IF を行ったところ、先体反応後の SPACA4 が精子頭部に露出し卵子の透明帯通過に重要な役割を持つことをウィーンバイオセンターとの国際共同研究により KO マウス解析から明らかにした (図 1; Fujihara et al. PNAS, 2021)。

また、精巣上体で発現する遺伝子を対象に CRISPR-Cas9 を用いて KO マウスを開発した結果、リポカリン (Lipocalin: LCN) ファミリー及び Ly6 ファミリー遺伝子の中からクラスターを形成する Lcn5, 6, 8, 9, 10 と Ly6g5b, 5c が精子受精能力に必要であることを明らかにした (Sakurai, Fujihara et al. *Andrology*, 2022#1)。驚いたことに、これらの KO マウス (上記遺伝子の位置順に従って Lcn8-10/9 と表記) 精子は形態や運動性には特に異常は見られない「見かけ正常な受精不全精子」であることが分かった。特に、LCN-KO 雄マウスは不妊を示し、その精子から ADAM3 だけでなく CMTM2A/B も消失していることを発見した (図 2)。その一方で、KO マウスが同様の表現型を示すことが報告されている OVCH2 や RNASE10 にはほとんど影響が見られなかった。LCNs や LY6G5B/C に対する抗体の樹立も試みたが、残念ながら WB と IF 共に良好なシグナルを検出できる抗体を樹立することはできなかった。以上より、本研究の第一段階である抗体作出が困難を極めたため、最終目的を完遂することは叶わなかった。しかし、新たな精巣上体における精子受精能力の成熟に関与する因子を複数同定することに成功した。今後は、ファミリー遺伝子の中から (単一もしくは複数の) 責任因子同定を試みる計画である。

(2) 小分子化合物による可逆的な精子受精能阻害剤の開発

マウス精巣内に存在する生殖細胞の小胞体付近に局在する PDCL2 の KO マウスを CRISPR-Cas9 により開発したところ雄性不妊を示し、その原因は精子形成異常であることが分かった (図 3; Fujihara et al. *Andrology*, 2022#2)。さらに解析を続けた結果、PDCL2 は精子先体形成に必須な因子であることが明らかになり、次に PDCL2 タンパク質に結合する小分子化合物の探索を行った。

4, 400 億種類を超える小分子化合物ライブラリーを保有し、研究代表者が客員教員を務める米国ベイラー医科大学創薬センターにて DNA エンコード小分子化合物ライブラリーを用いてヒト PDCL2 に結合する小分子化合物 2 種類 (CDD-2364, -2377) の同定に成功した (図 4; Ye et al. *Andrology*, 2022#3)。しかし、残念ながら計画していた野生型雄マウスへの小分子化合物の投与実験による生殖能力の検討を研究期間内に完了することはできなかった。最終目標は前述の通り、可逆的な精子受精能阻害剤の開発で、PDCL2 を含む研究代表者がこれまで発見してきた精子受精能力に必須なタンパク質を標的に現在も国際共同研究を推進している。今後はヒト以外の動物種の標的タンパク質に特異的に結合する小分子化合物の探索を進めていきたいと考えている。

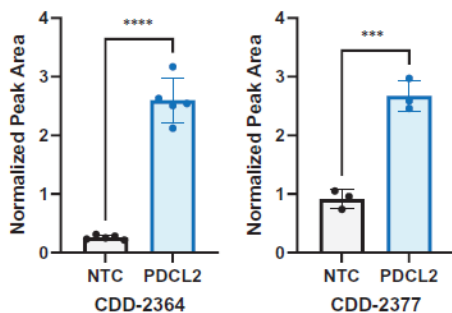


図 4. ヒト PDCL2 に結合する小分子化合物の同定。DNA エンコード技術により標的タンパク質へ特異的に結合する小分子化合物を効率良く見つけることができた (*Andrology*, 2022#3)。

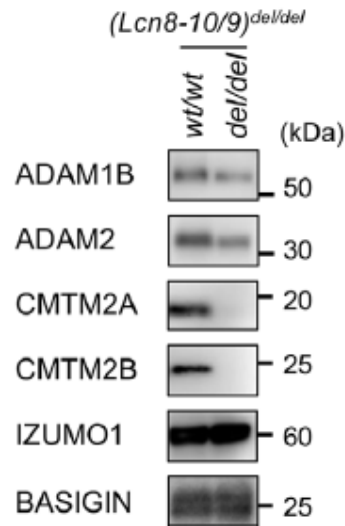


図 2. LCN クラスター KO マウス精子の WB 解析。精巣上体内腔から分泌される LCNs を KO すると、精子膜タンパク質 ADAM3 だけでなく CMTM2A/B も消失して不妊になることが分かった (*Andrology*, 2022#1)。

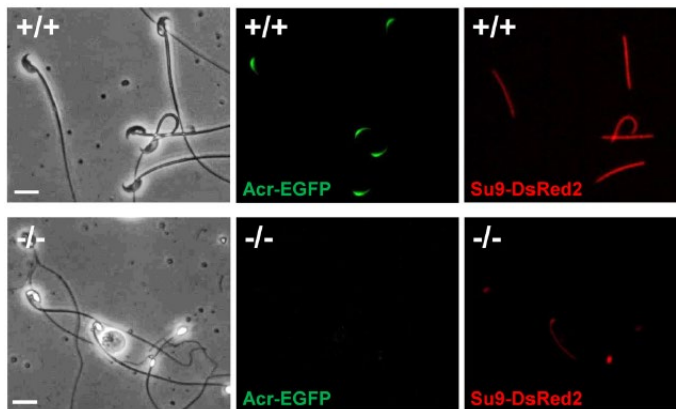


図 3. PDCL2-KO マウス精子の形態観察。PDCL2-KO マウス精子は先体 (緑色蛍光) の消失、並びに尾部のミトコンドリア (赤色蛍光) の異常が観察され、雄性不妊を示すことが分かった (*Andrology*, 2022#2)。

以上より、研究開始当初に計画した研究計画のうち、上記 2 つについて一定の成果を挙げることができた。しかし、実験に使用できる反応性の高い抗体が得られなかった事やコロナ渦での国際共同研究であったことから思うように研究が進まない事も予想以上に多かったが、引き続き国際共同研究を推進していきたい。

以上より、研究開始当初に計画した研究計画のうち、上記 2 つについて一定の成果を挙げることができた。しかし、実験に使用できる反応性の高い抗体が得られなかった事やコロナ渦での国際共同研究であったことから思うように研究が進まない事も予想以上に多かったが、引き続き国際共同研究を推進していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 8件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Noda T, Blaha A, Fujihara Y, Gert KR, Emori C, Deneke VE, Oura S, Panser K, Lu Y, Berent S, Kodani M, Cabrera-Quio LE, Pauli A, Ikawa M. | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 332 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03289-w | 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 |
| 1. 著者名 Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Larasati T, Fujihara Y, Ikawa M. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology | 6. 最初と最後の頁 e12467 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12467 | 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 - |
| 1. 著者名 Nozawa K, Fujihara Y, Devlin DJ, Deras RE, Kent K, Larina IV, Umezu K, Yu Z, Sutton CM, Ye Q, Dean LK, Emori C, Ikawa M, Garcia TX, Matzuk MM. | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 The testis-specific E3 ubiquitin ligase RNF133 is required for fecundity in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 BMC Biology | 6. 最初と最後の頁 161 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-022-01368-2 | 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 |
| 1. 著者名 Ye Q, Belabed H, Wang Y, Yu Z, Palaniappan M, Li JY, Kalovidouris SA, MacKenzie KR, Teng M, Young DW, Fujihara Y, Matzuk MM. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Advancing ASMS with LC MS/MS for the discovery of novel PDCL2 ligands from DNA encoded chemical library selections | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Andrology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.13309 | 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 |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Fujihara Y, Kobayashi K, Abbasi F, Endo T, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Andrology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13329 | 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 |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Sakurai N, Fujihara Y, Kobayashi K, Ikawa M. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 CRISPR/Cas9 mediated disruption of lipocalins, Ly6g5b, and Ly6g5c causes male subfertility in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Andrology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13350 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Fujihara Y, Tokuhiko K, Garcia TX, Matzuk MM, Ikawa M. | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 12 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology | 6. 最初と最後の頁 266-272 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/aja.aja_63_21 | 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 |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, Ikawa M, Pauli A. | 4. 巻 118 |
| 2. 論文標題 The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A. | 6. 最初と最後の頁 e2108777118 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2108777118 | 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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap
https://researchmap.jp/Yoshitaka_Fujihara/?lang=japanese
国立研究開発法人国立循環器病研究センター先端医療技術開発部HP
<https://www.ncvc.go.jp/res/divisions/amt/>
大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野HP
<https://egr.biken.osaka-u.ac.jp/>

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 | 伊川 正人 (Ikawa Masahito) | | |

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 | | | |
|---------|-------------|--|--|--|
| オーストリア | ウィーンバイオセンター | | | |
| 米国 | ベイラー医科大学 | | | |