

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年4月1日～2013年3月31日

課題番号：22591810

研究課題名（和文） 非侵襲的男性不妊症診断及び治療法の確立

研究課題名（英文） Exploitation of noninvasive genetic diagnosis for therapy of male infertility

研究代表者

田中 宏光 (TANAKA HIROMITSU)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：10263310

研究成果の概要（和文）：私たちは、マイクロアレイやPCRによって、男性不妊症患者の10%以上の原因遺伝子を特定することができる系を開発した。一方、私たちは生薬である甘草がマウスにおいて授精能を上げることを見出した。今後、これたの結果をもとに、男性不妊症患者の遺伝子診断の結果と甘草の受精上昇効果の関連を解析し、男性不妊症 DNA 診断にもとづき ART よりも容易な治療薬の提供を目指す。

研究成果の概要（英文）：We developed the system which can identify 10% or more genetic factors of a male infertility by a microarray or PCR. On the other hand, we found out that the licorice which is a herbal medicine raised fertilization ability in a mouse. Next, it is a purpose to provide curative medicine based on male infertility DNA diagnosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1170,000	5,070,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

先進国では、7組のカップルに1組以上が不妊症と報告されている。そのうち約半数が男性側の要因であり、男性不妊症の約半数が原因不明の男性不妊症である。また近年、環境ホルモン等の影響により、自然界に生息する様々な動物の性の異常や生殖

能力の低下が報告されている。さらに、ヒト精液中の精子数が減少しているという報告や、我が国や欧米諸国では高頻度に不妊症患者が存在するという事実は、人類の生殖能力にも同様な変化が起こりつつある可能性を示唆している。不妊症の治療や避妊に関する研究は、これまで女性側に大きな

比重が置かれていた。一方、不妊原因の約半数を占める男性不妊は先進諸国で増加傾向を示すとも言われているが、多くは病態すら明らかではなく、原因もほとんど不明である。その一部の要因としてY染色体の異常が指摘されているが、多様な男性不妊症の原因を説明するにはあまりにも不十分である。そのような状況での男性不妊症の発生機序の解明による診断法、治療法の開発が強く望まれている。

不妊症患者の治療には、様々な方法が考え出されている。男性不妊症の場合、精液中に精子が認められない場合においても、精巣から精子細胞を見つけ出し、卵に注入することが可能である。また、精子細胞を支持するセルトリ細胞に不妊の原因がある場合、男性不妊症患者から精子になる以前の細胞を取り出し、一時的に育て、顕微授精することも可能である。このような技術が先行開発されているが男性不妊症の原因は不明のままであり、男性不妊症の原因の理解に基づいた治療法の選択と成功率の向上が望まれる。

不妊症治療に関する個人の精神的、経済的負担の問題については、最近しばしば一般新聞紙上でも取り上げられ、また国際的にも重要視されている。一方、ヒトゲノムプロジェクトは、遺伝子の一次構造の解析をもとに、遺伝子変化と病気、もしくは病気になりやすさとの関係を明らかにする方向に発展し、さらに、その治療にもそれらの情報を役立てようとしている。これら様々な不妊の原因を短時間に遺伝子レベルで理解し、男性不妊症患者個人に適した経済的且つ現時点におけるより確実な治療法を提示できる技術を確立することは、有益である。

とくに精液の mRNA やタンパク質を用

いた非侵襲的不妊症診断法は、男性不妊症の大きな割合を占める精巣機能障害による特発性男性不妊症の原因を明らかにし、不妊原因の理解に基づく治療の実現を通して、社会の要望に応えるものである。

一方、実験動物を用いる生殖毒性・賦活化試験法は既に実用段階にあり、微量の化学物質による生殖機能への影響を鋭敏に検出できることを実証済みである。医薬品化合物を含む化学物質の環境影響評価、医薬品開発における生殖毒性・安全性試験法として非常に有用と考えられ、応用分野は広い。本申請により開発しようとする不妊症遺伝子検査法、生殖毒性・賦活化試験法は、男性不妊原因の診断、化学物質の生体影響評価という、社会的に重要でありかつ強い要望がある2つの分野において独創的な解決手段を提供できる。

2. 研究の目的

これまで、我々は、

- ①マウス精子細胞特異的に発現する遺伝子群のクローニングとその機能解析を行い、
- ②これら遺伝子群のほとんどがヒトにも保存されていることから、それらをクローニングし、各タンパク質の発現と機能解析を行うと共にゲノム構造の解析を行ってきた。
- ③男性不妊症患者、妊孕性確認男性からの血液及び精液 DNA サンプルを収集し、それら特異的遺伝子の染色体上の一次構造解析を行い、男性不妊症原因遺伝子変異や single nucleotide polymorphisms (SNPs) を明らかにしてきた(表1)。
- ④精液中にこれら遺伝子の転写物 (mRNA) やタンパク質が存在することを明らかにし、mRNA やタンパク質を男性不妊症患者と妊孕性の確認された男性で比較検討できることを示した。

これらの結果をもとに、私たちが作成して

表1 精子細胞特異的遺伝子のSNPs解析

Gene	Number of SNPs in ORF	Number of nonsynonymous SNPs
PRM1	4	0
PRM2*	0	0
TNP1*	2	2
TNP2	5	5
HANP1	5	5
t-actin 1/ACTL7B	4	1
t-actin 2/ACTL7A	6	2
tPAP/PAPOLB	7	4
GSG3/CAPZA3	1	1
TSSK1/TSSK1B	10	2
TSSK2*	11	7
HASPIN	9	8
SPERIZIN/ZNRF4	19	9
CETN1*	4	3
TAF7	3	1
TEKTIN-T/TEKT2	7	4
MEISBTZ	5	2

* PRM2, TNP1, TSSK2 及び Cetn1 には、男性不妊症の原因と考えられる遺伝子変異が見つかった。

きたマイクロアレイ、SNPs 診断プローブ、特異的抗体を用い、原因不明の男性不妊症患者の精液に含まれる染色体 DNA、mRNA、タンパク質に関して組織を用いることなく非侵襲的に解析できる系を確立する。

3. 研究の方法

全体構想は以下の図にまとめたが詳細は、各番号を付した順に説明を加えた (図1)。

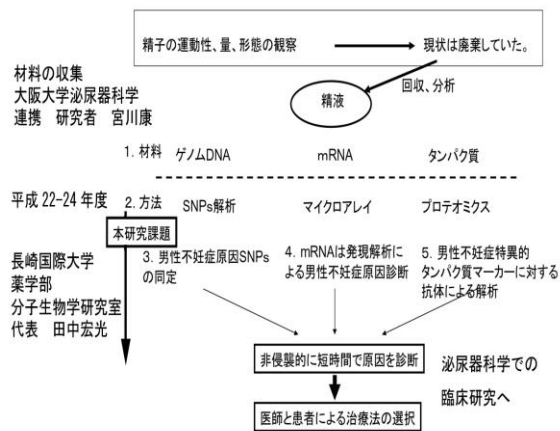


図1 計画構造の模式図

①精子細胞特異的エネルギー代謝アイソザイム遺伝子のSNPs ディスカバリー

私たちは既に、材料である精液から染色体DNAを男性不妊症患者1000例以上、妊孕性の確認された男性300例について収集を終え、SNP解析を進めている。また、精液からmRNAやタンパク質を臨床の現場から回収

しエネルギー代謝に関する精子細胞特異的アイソザイム遺伝子に関して解析をさらに進める。

②精子 mRNA の発現解析

精子形成特異的遺伝子群の発現シグニチャーパターンの変化による男性不妊症の診断が可能である事を、雄性不妊 KO マウス精子における特異発現シグニチャーをマイクロアレイで解析することにより示すことが出来た。また、環境ホルモン ビスフェノールAを低濃度でネズミに与えマイクロアレイ解析を行った結果、組織上で毒性が観察される以前から遺伝子発現の変化としてとらえることができた。さらにヒト精巣特異的遺伝子のDNAマイクロアレイを作成しヒト精子 mRNA 発現シグニチャーを調べる系を確立した。今までは、完成した精子に mRNA は含まれないとされていた。しかしながら最近になって、完成精子にも多くの mRNA が存在することが明らかになった。私たちの作成した精細胞特異的遺伝子に特化したマイクロアレイを用い精液の mRNA 発現解析が可能であるか検討を行った結果、精液を1日放置した後でも、精液から mRNA を抽出しマイクロアレイ解析が可能であることを突き止めた。精子は、精液中で少なくとも1日は死に絶えることがなく、また精子の mRNA は安定に保存されていた。そこで、完成精子に含まれる mRNA に着目し、男性不妊症と完成精子 mRNA の関係について解析を試みる。

③エネルギー代謝アイソザイム遺伝子産物

私たちは、ケトン体代謝系で機能する新規遺伝子 Scot-t をクローニングし、精子がケトン体をエネルギーとして用いられることを明らかにした。さらに、ヒト Scot-t 遺伝子をクローニングし、男性不妊症患者のSNPs解析の結果から Scot-t の酵素活性低下を招く遺

伝子変化が精子運動不全を伴う不妊と密接な関係があることが分かった。

そこで、タンパク質一次構造変化をとらえることのできる抗体を分離し、イライザー法等によって、エネルギー代謝アイソザイム遺伝子産物の一次構造や、発現情報を収集できる系を確立し、男性不妊症と妊孕性の確認されたボランティアについてのデータを収集し比較解析を行う。

4. 解析系の開発

これらの結果をもとに、今まで廃棄されていた臨床現場の精液から mRNA を調整し、マイクロアレイを用い mRNA 発現解析を進め、精液を用いた遺伝子検査法を確立する。また、ゲノム解析 (SNP 解析) はインベーター法を用いて精子細胞特異的エネルギー代謝アイソザイム遺伝子の遺伝子診断法を確立する (すでにいくつかの遺伝子のプライマーは設定済み)。

婚姻の後、避妊を行わず 2 年間子供ができない場合、不妊症と診断される。子供を望むカップルが、不妊症を疑い病院に出向くまでには、晩婚化が進行する中、女性の出産適齢期を考えると不妊症として早く適した治療を受けることが重要である。そのためには、不妊症に対して気軽で且つ的確な診断を得られることが望まれる。本研究の成果は、非侵襲的に容易に不妊症の診断を可能にする。研究成果を大阪大学泌尿器科において臨床のデータを蓄積する。

4. 研究成果

私たちは、マウスを用い精子細胞特異的遺伝子の機能不全が雄性不妊症の原因であることを明らかにしてきた。また、同定してきた不妊症原因遺伝子について、そのヒトゲノム DNA の一次構造を男性不妊症群と妊孕性確認群の 2 つの集団で解析を進めた。その結果、

原因不明の男性不妊症患者のうち 1 割以上の原因と考えられる男性不妊症関連 SNPs

(Single Nucleotide Polymorphisms) および遺伝子変異を明らかにした。

また、日本人男性に多く見出される精子特異的遺伝子上の SNPs に関して生化学的解析を進めた。その結果、エネルギー代謝に関与する精子細胞に特異的に発現するアイソザイムの 2 つの遺伝子に存在する SNPs によって、遺伝子産物の酵素活性が低下すること、さらにその SNP をもつ男性不妊症患者の精液中のアイソザイムの酵素活性が低下することが明らかになった。その他のいくつかの男性不妊症関連 SNPs を国際科学雑誌で出版する事が出来た。

これらの男性不妊症に関係する SNPs を容易に同定できる反応系を用い、非侵襲的な男性不妊症原因診断系を臨床現場に届けたい。

5. 主な発表論文等は下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Tainaka H, Takahashi H, Umezawa M, Tanaka H, Nishimune Y, Oshio S, Takeda K. Evaluation of the testicular toxicity of prenatal exposure to bisphenol A based on microarray analysis combined with MeSH annotation. *J Toxicol Sci.* 37:539-548 (2012). 査読有

2. Okuda H, Tsujimura A, Irie S, Yamamoto K, Fukuhara S, Matsuoka Y, Takao T, Miyagawa Y, Nonomura N, Wada M, Tanaka H. A Single Nucleotide Polymorphism within the Novel Sex-Linked Testis-Specific Retrotransposed PGAM4 Gene Influences Human Male Fertility. *PLoS ONE* 7:e35195 (2012). 査読有

3. Irie S, Nakamura J, Miyagawa Y, Tsujimura A, Okuda H, Yamamoto K, Fukuhara S, Yoshioka I, Hiroshi K, Matsuoka Y, Takao T, Nonomura N, Ikawa M, Tokuhiko K, Okabe M, Shibata T, Fujimoto K, Wada M, Tanaka H. Primary screening of single nucleotide polymorphisms in human calreticulin 3

(CALR3). The Open Androl J 3:30-35 (2011). 査読有

4. Takahashi H, Tainaka H, Umezawa M, Takeda K, Tanaka H, Nishimune Y, Oshio S. Evaluation of testicular toxicology of doxorubicin based on microarray analysis of testicular specific gene expression. J Toxicol Sci 36:559-567 (2011). 査読有

5. Nagai M, Moriyama T, Mehmood R, Tokuhiko K, Ikawa M, Okabe M, Tanaka H, Yoneda Y. Mice lacking Ran binding protein 1 are viable and show male infertility. FEBS Lett 585:791-796 (2011). 査読有

6. Irie S, Nakamura J, Tsujimura A, Miyagawa Y, Tanaka H. Single Nucleotide Polymorphisms of the IZUMO Gene in Male Infertile Patients. Nagasaki Int Univ Rev 10, 209-218 (2010). 査読有

[学会発表] (計 24 件)

1. 精巣生殖細胞特異的アクチンキャッピング蛋白 $\alpha 3$ の精巣・精巣上体およびアクロゾーム反応における発現様式の検討 / 宮川康、辻村 晃、奥田英伸、山本圭介、福原慎一郎、中山治郎、高尾徹也、田中宏光、奥山明彦 / 2010 年 4 月 / 第 98 回日本泌尿器科学会 (盛岡市)

2. 男性不妊患者に検出される IZUMO 遺伝子の一塩基多型 / 宮川 康、奥田英伸、山本圭介、福原慎一郎、高尾徹也、辻村 晃、野々村祝夫、奥山明彦、入江新司、中村順子、田中宏光 / 2010 年 7 月 / 第 29 回日本アンドロロジー学会 (東京都)

3. 分子生物学的手法を用いた精細胞の分化過程における形態的变化及びミトコンドリアの局在に関する検討 / 奥田 英伸、辻村 晃、山本 圭介、福原慎一郎、高尾 徹也、宮川 康、野々村 祝夫、奥山 明彦、田中宏光 / 2010 年 7 月 / 第 29 回日本アンドロロジー学会 (東京都)

4. 男性不妊症患者における IZUMO 遺伝子の一塩基多型 / 宮川 康、奥田英伸、山本圭介、福原慎一郎、高尾徹也、辻村 晃、野々村祝夫、奥山明彦、入江新司、中村順子、田中宏光 / 2010 年 11 月 / 第 55 回日本生殖医学会 (徳島市)

5. ヒト精巣内生殖細胞の分化過程における形態的变化及びミトコンドリアの局在に関する検討と臨床応用 / 奥田英伸、辻村晃、

山本圭介、福原慎一郎、高尾徹也、宮川康、野々村祝夫、奥山明彦、田中宏光 / 2010 年 11 月 / 第 55 回日本生殖医学会 (徳島市)

6. Analysis of sperm ability to reach female oviduct in OAZ-t deficient mouse labeled green acrosome and red mitochondria / Hiromitsu Tanaka, Masaru Okabe, Morimasa Wada, Kyoko Fujimoto, Sadaki Yokota / 2010 年 12 月 / 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸)

7. 男性不妊症患者における Calsperin(CALR3) 遺伝子の一塩基多型解析 / 宮川康、奥田英伸、山本圭介、福原慎一郎、吉岡巖、木内寛、松岡庸洋、高尾徹也、辻村 晃、野々村祝夫、入江新司、中村順子、伊川正人、岡部勝、田中宏光 / 2011 年 4 月 / 第 99 回日本泌尿器科学会 (名古屋)

8. ヒト精巣内生殖細胞の分化過程における形態的变化及びミトコンドリアの局在に関する検討 / 奥田英伸、山本圭介、福原慎一郎、松岡庸洋、高尾徹也、宮川康、辻村 晃、野々村祝夫、田中宏光 / 2011 年 4 月 / 第 99 回日本泌尿器科学会 (名古屋)

9. 精子細胞特異的遺伝子の解析とその臨床応用 / 田中宏光 / 2011 年 7 月 / 特定領域生殖サイクル 若手勉強会 2011
mAb TRA98 の認識する抗原抗原の発現解析と抗原同定 / 小野原侑子、田中宏光、土田順司、五島直樹、川上和孝 / 2011 年 7 月 / 特定領域生殖サイクル 若手勉強会 2011

10. 精巣内精子採取術 (TESE) で採取した精細胞の精細胞分化過程判定の正確性 / 奥田英伸、山本圭介、福原慎一郎、木内寛、高尾徹也、宮川康、辻村 晃、野々村祝夫、田中宏光 / 2011 年 12 月 / 第 56 回日本生殖医学会 (横浜)

11. In vitro fertilization (IVF) での精子活性化培地の改良 / 田中宏光、正山征洋、和田守正 / 2011 年 12 月 / 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜)

12. 新規解糖系レトロトランスポジション遺伝子、Phosphoglycerate mutase4 (PGAM4) の解析とその single nucleotide polymorphism(SNP) が男性不妊症に及ぼす影響 / 2012 年 4 月 / 第 100 回日本泌尿器科学会総会

13. Phosphoglycerate mutase 5 (Pgam 5) のマウス精巣における発現及び機能解析 / 2012 年 6 月 / 日本アンドロロジー学会第 31

回学術大会ならびに総会および第 18 回精子形成・精巢毒性研究会

14. 精巢内精子採取術 (TESE) で採取した精細胞の精細胞分化過程判定における正確性と精細胞 Map の有用性 / 2012 年 6 月 / 第 57 回日本生殖医学会学術講演会

15. In Vitro Fertilization (IVF) の効率を上げる甘草の水溶性成分内の同定 / 2012 年 8 月 / 応微バイオ研究会談話会 (大阪)

16. 生殖細胞核特異的に反応する mAb TRA98 の抗原同定 / 2012 年 11 月 / 特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第 5 回公開シンポジウム

17. A SNP within the Testis-specific PGAM4 Gene on X Chromosome Influences Human Male Fertility / 2012 年 12 月 / 第 35 回日本分子生物学会年会

18. 精細胞特異的に発現する解糖系遺伝子 Phosphoglycerate mutase 4 (PGAM4) の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) と男性不妊症の関係 / 2012 年 12 月 / 第 29 回日本薬学会九州支部大会

[国際的な学術会議 / シンポジウム]

19. 2013 年 5 月
BIotech2013/東京 「男性不妊症遺伝子診断と治療薬の開発」

20. 2012 年 11 月
特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第 5 回公開シンポジウム/京都 「生殖細胞核特異的に反応する mAb TRA98 の抗原同定」

21. 2012 年 10 月
Next Generation Sequencing Asia Congress/Singapore. Male infertility and single nucleotide polymorphisms of the human testis-specific PGAM4 gene on X chromosome.

22. 2011 年 11 月
特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第 4 回公開シンポジウム/大阪 「精子細胞特異的遺伝子 phosphoglycerate mutase 4 (PGAM4) の解析」

23. 2010 年 12 月
International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of

Germ Cells/Fukuoka. Analysis of haprin deficient mouse and its sperm activity.

24. 2010 年 6 月
11th International Symposium on Spermatology/Okinawa. Analysis of the sperm tail and head in OAZ-t deficient mouse.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 人工授精用培地及び同人工授精用培地を用いた人工授精方法

発明者: 田中宏光

権利者: 長崎国際大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-115766 号

出願年月日: 2011 年 5 月 24 日

国内外の別: 国内

名称: 人工授精用培地及び同人工授精用培地を用いた人工授精方法並びに妊娠促進剤

発明者: 田中宏光 その他 2 名

権利者: 長崎国際大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-26496 号

出願年月日: 2012 年 2 月 9 日

国内外の別: 国内

名称: 人工授精用培地及び同人工授精用培地を用いた人工授精方法並びに妊娠促進剤

発明者: 田中宏光 その他 2 名

権利者: 長崎国際大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-26496 号

出願年月日: 2012 年 2 月 9 日

国内外の別: 国内

名称: 妊孕性診断方法、妊孕性診断キット、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び抗体

発明者: 田中宏光 その他 5 名

権利者: 長崎国際大学 大阪大学 凸版印刷

種類: 特許

番号: PCT 出願 PCT/JP2010/001850

取得年月日: 2012 年 2 月 1 日

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www1.niu.ac.jp/about/teacher/detail.html?data%5Bid%5D=189>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中宏光 (TANAKA HIROMITSU)

長崎国際大・薬学部・准教授

研究者番号: 10263310

(2) 研究分担者

和田守正 (WADA MORIMASA)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号: 20220965

藤本京子 (FUJIMOTO KYOKO)

長崎国際大学・薬学部・助教

研究者番号: 50435137

(3) 連携研究者

辻村晃 (TSUJIMURA AKIRA)

大阪大学大学院・医学部・准教授

研究者番号: 40294053

宮川康 (MIYAGAWA YASUSHI)

大阪大学大学院・医学部・准教授

研究者番号: 70362704