

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462467

研究課題名(和文) ヒト体液を用いた精子無力症原因因子の簡易検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a simple method to find factors causing Asthenozoospermia with the human body fluid

研究代表者

高崎 延佳 (Takasaki, Nobuyoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・招聘研究員

研究者番号：00342808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：男性不妊症のおよそ80%を占める精子無力症発症の原因遺伝子変異を特定する手法の開発を目指し、精子無力症患者精子に対して数種類のマーカー精子タンパク質の変動を基準とするスクリーニング方法を確立した。開発した手法によって実際におよそ200例の精子無力症患者の中から、ヒトGALNTL5遺伝子上に母親由来と推測されるヘテロの1塩基欠損によって精子無力症を発症した患者を一例同定することに成功した。更に次世代シーケンサーの導入で、感度の高い遺伝子変異検出が可能になり、精子幹細胞に生じた極僅かな割合のヒトGALNTL5遺伝子変異が原因とされる、極めて稀な精子無力症発症例の検出にも成功することができた。

研究成果の概要(英文)：Asthenozoospermia, defined as low sperm motility, is commonly observed in infertile men. However, very few causative gene mutations in human patients have been identified because an efficient detection method has not been established. To identify mutations in GALNTL5 which is a functional gene for the maintenance of sperm motility, we screened the sperm samples from 208 infertile men mainly diagnosed as asthenozoospermia by detecting an abnormal reduction in the abundance of GALNTL5 protein and accompanying reductions in the abundances of other marker proteins, we consequently identified a patient with asthenozoospermia carrying a heterozygous point deletion of GALNTL5 in 50% of the spermatozoa. Furthermore, using the next-generation sequencing, another rare case of mutation on GALNTL5 gene was detected only in the sperm cells at low frequency but not in the somatic blood cells of a patient diagnosed with asthenozoospermia.

研究分野：分子発生学

キーワード：男性不妊症 精子無力症 アンドロロジー

1. 研究開始当初の背景

日本国内で不妊に悩むカップルの割合が6組に1組の割合に上昇しており、その中で男性側が原因となる男性不妊症のおよそ80%が、精子の運動能障害(精子無力症)に起因することが明らかになってきた。しかし、医療現場では精子無力症の原因を解明することなく、安易に体外受精などの生殖補助医療が遂行されているのが現状である。

精子無力症の原因因子検査法の確立は、男性不妊症診断・治療法の発展を促進させる医療イノベーションに繋がり、日本における少子化進行の阻止という意味でその成果は社会に大いに貢献できるものであると考えられた。

2. 研究の目的

男性不妊の原因は1) 精子輸送路の閉塞、2) 前立腺炎、3) 勃起・射精障害および4) 精巣での精子形成障害に分けられるが、このうち1) -3) に関しては現在、診断が可能でそれぞれに治療法が確立されている。これに対し、4) 精子形成障害を伴う男性不妊症のおよそ80%が、精子運動能障害と診断される精子無力症であることが報告されている。しかし、精子無力症の治療法はおろか、原因因子を特定する手法は全く確立されていない。

本研究の目的は、男性不妊症治療法の開発を目指す上で、まずは精子無力症患者精子を用いた精子構成タンパク質異常の検出から精子無力症原因因子を同定する手法の開発にある。

3. 研究の方法

タンパク質翻訳後修飾の一つ、糖鎖修飾に働く糖転移酵素遺伝子に高い相同性を持ち、精巣特異的に発現する *Galnt15* 遺伝子ヘテロ欠損マウスが、1) 遺伝子のヘテロ欠損によって、ヒト精子無力症の症状と似た精子運動能障害による雄性不妊の表現型を示すこと、2) ヘテロ欠損マウスの精子運動能低下は、精子の運動エネルギー産生する解糖系タンパク質の減少に因ること、3) *Galnt15* 遺伝子ヘテロ欠損マウスの精子では、先体と呼ばれる卵との受精に寄与する精子特異的膜構造体に存在するタンパク質においても正常精子より減少していることを我々は報告している。

そこで、精子無力症の発症原因を効率良く同定するために、ヒトゲノムにも存在する *GALNTL5* 遺伝子の変異によって発症した精子無力症の検出方法の確立をモデルとして、*Galnt15* 遺伝子欠損マウス精子で観察された複数の精子タンパク質量の変動を基に、精子無力症患者精子を対象にマーカータンパク質量の変動を検出するスクリーニング方法の開発を試みた。

4. 研究成果

実際に200例以上の精子無力症患者の精子を

対象に、*Galnt15* 遺伝子欠損マウス精子で観察された複数の精子タンパク質量の変動を観察することを試みた(図1参照)。

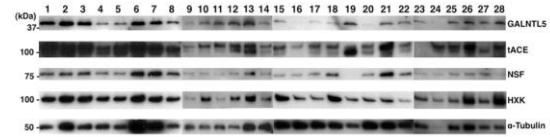


図1

その結果、検出されたタンパク質異常のパターンから、ヒト *GALNTL5* 遺伝子上に変異が推測された45例の精子無力症患者の選別に成功した。

その中から実際に母親由来と推測されるヒト *GALNTL5* 遺伝子上のエクソン6番にヘテロの1塩基欠失によって精子無力症を発症した症例を同定することに成功した(図1のレーン9番の患者精子)。本例では、既存の精子選別手法を用いることで、遺伝子変異を持たない精子を濃縮できることを示すことにも成功した(図2参照)。

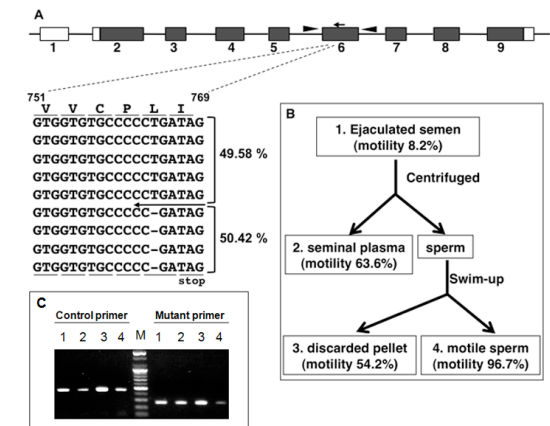


図2

更に次世代シーケンサーによる感度の高い遺伝子変異検出法の導入によって、患者体細胞には存在しない、極僅かな精子幹細胞の遺伝子変異(エクソン4番のスプライシングアクセプターサイトの塩基置換)が原因と推測される極めて稀な精子無力症発症例の同定に成功することができた(図3参照)。

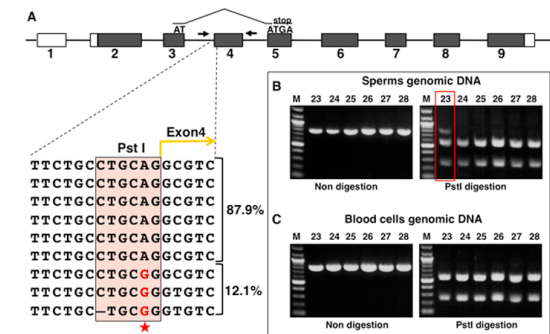


図3

本発症例では、2年間の追跡調査によって、遺伝子異常を持つ精子幹細胞が何らかの原因で死滅した可能性が示され、初診から2年後には精子がタンパク質量を増加させ、遺伝

子変異も消失、正常な運動能を回復している現象を確認することができた（図4参照）。

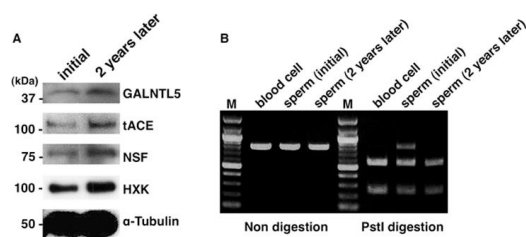


図4

一方で、精子無力症の発症原因因子の同定を容易にするマーカー精子タンパク質の種類数を増やすことを目標に、最終的に10個の分子マーカータンパク質抗体を有効使用できる条件を確立した。*GALNTL5* 遺伝子変異を起因とする精子無力症患者のスクリーニングのみならず、他の精子無力症の発症原因因子同定に10個の分子マーカータンパク質抗体が有効に機能するか、今後200例の精子無力症患者精子を対象にマーカータンパク質の変動を観察すると共に、導入に成功した次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異の検出方法によって、精子無力症患者精子を用いた精子構成タンパク質異常の検出から精子無力症原因因子を同定する我々が開発した手法の有効性を検証したい。

これまでの研究結果から、*GALNTL5* タンパク質分子が正常精子形成に必要な分子であることは示されてきたが、実際に*GALNTL5* タンパク質分子が精子形成において、どのような機能を有しているかは不明のままであった。そこで精子幹細胞由来とされる培養細胞株を用いて、薬剤誘導によって*GALNTL5* タンパク質を発現する培養細胞株の樹立を試みた。その結果、これまでに独立に二つの細胞株の樹立に成功し、樹立細胞株を用いて*GALNTL5* タンパク質に対して特異的に結合するタンパク質分子の同定を行うことができた。これらの新しく得た知見を基に、精子形成における*GALNTL5* タンパク質分子の機能に迫ることができるものと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

①高崎延佳、精子無力症の発症原因となる糖転移酵素様遺伝子の発見、医学のあゆみ、査読なし、249巻、pp. 682-687、2014

<http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=924908&AC=13970>

②Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, Matsuzaki H, Hagiuda J, Ishikawa H, Mochida K, Inoue K, Ogunuki N, Ogura A, Noce T, Ito C, Toshimori K, Narimatsu H A heterozygous mutation of *GALNTL5* affects male infertility with impairment of sperm

motility. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 査読有、Vol. 111, 2014, pp1120-1125

DOI: 10.1073/pnas.1310777111

〔学会発表〕（計3件）

①高崎延佳、萩生田純、成松久、糖転移酵素様遺伝子のヘテロ変異によって発症する精子無力症、第34回日本糖質学会年会 2015年8月1日、東京大学（文京区）

②Takasaki N, Hagiuda J, Ishikawa H, Narimatsu H, Screening and treatment of asthnozoospermia caused by a *GALNTL5* gene mutation. The 48th annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015年6月3日、つくば国際会議場（つくば市）

③Narimatsu H, Takasaki N. A heterozygous mutation of glycosyltransferase-like gene causes asthenozoospermia. Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014年11月19日、Honolulu, Hawaii

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：男性不妊症の原因因子検出方法及び男性不妊症モデル動物

発明者：高崎延佳、成松久、小倉淳郎、持田慶司

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-558770

出願年月日：平成 25 年 2 月 15 日

取得年月日：平成 28 年 5 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

高崎延佳（2014）精子無力症の原因となる遺伝子を発見 男性不妊症の適切な治療への期待 産総研 TODAY Vol. 14 No. 7:10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 延佳 (TAKASAKI, Nobuyoshi)

国立開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・招聘研究員

研究者番号：00342808

(2) 研究分担者

成松 久 (NARIMATSU, Hisashi)

国立開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・招聘研究員

研究者番号：40129581

(3) 連携研究者

石川 博通 (ISHIKAWA, Hiromichi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60112679

(4) 研究協力者

萩生田 純 (HAGIUDA, Jun)