

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462472

研究課題名(和文) プロテオームプロファイリングを用いた不妊男性精液の網羅的メタボロミクス解析

研究課題名(英文) Proteomics analysis of semen obtained from male infertile patients

研究代表者

鈴木 吉也 (Suzuki, Kichiya)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師

研究者番号：30422116

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)：原因不明の不妊に関与する因子群が精液中に存在するのではないかと仮定し、質量分析計(MS)を用いた精液プロテオームプロファイリングを実行し候補因子群を抽出、さらに、これらの因子の健常者群と不妊症患者群間で比較検討し、生殖補助技術を適応する指標を決定することを目的とした。精液のプロテオミクスプロファイリングの解析をLC/MSにより行い、その結果、200以上のタンパク質ピークを確認し、その内の数十ピークは健常者群と不妊症患者群間で有意な差が認められた。以上の結果より、不妊症男性精液におけるプロテオミクス解析にMSを用いることにより、今後のマーカー探索に向けた基礎的知見を蓄積することができた。

研究成果の概要(英文)：We have hypothesized that whether there are factors involved in male infertility with unknown reasons in semen. Therefore we have performed proteome profiling of semen using mass spectrometry (MS) to isolated and determine candidate factors in semen by comparing between healthy volunteers and male infertile patients. Finally we have identified more than two hundreds of protein peaks in semen and chosen approximately twenty candidate molecules, which may involve in male infertility. This result suggested that proteomics analysis of semen using MS is a powerful tool to explore candidate factors related to male infertility and accumulated fundamental knowledge in this field.

研究分野：生殖医学

キーワード：生殖医学 男性不妊 精液 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

現在、挙児希望を主訴に産婦人科外来を受診する不妊患者カップルの中で、検査上正常であるが原因不明の不妊に悩むものが10%以上の割合で存在する。これらの症例に対しては、最終的に体外受精法(IVF)または(および)細胞質内精子注入法(ICSI)を行うが、これまでのところ、これらの生殖補助技術がfirst choiceとして有効かどうかを推測できるバイオマーカーは未だに見つかっていない。我々は、もし体外受精成績予後判定を予測するマーカー分子の存在を精液プロテオームプロファイリング解析により決定することができれば、高額な医療費の削減、および適切な生殖補助技術の選択(IVFまたはICSI)により妊娠に至るまでの期間短縮により患者負担の削減を計ることができると考えた。

従来の方法による精液などのタンパク質解析は、カラムを用いた精製、Edman degradation法によるアミノ酸配列決定等、単一分子を解析するために多くの機材を必要とし、解析にも時間を要した。しかし近年のMatrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (MS)における技術進歩は、MS単体の使用で短時間に多数の蛋白質質量分析を可能にした。例えば米国バンダービルト大学Mass spectrometry Research CenterのCaprioliとChaurandは肺癌患者組織(42サンプル)と正常肺組織(8サンプル)に対してMSを施行し、患者の予後のブライント試験コホート調査を行った。(Yanagisawa et al. Lancet 2003 362:415-6) その結果、MALDI-MSにより得られた1600以上のタンパク質のピークの内、15が非小細胞癌患者の予後に密接に関連していることを明らかにした。

さらに、我々とCaprioliのグループは、MALDI-MSの特性が、精巣上体における部位特異的蛋白発現機構の解析に非常に有用なことを示した(Chaurand et al.

Electrophoresis 2002 23:3125-3135, Chaurand et al. Proteomics 2003 3:2221-39 図1参照, Fouchecourt et al. Endocrinology 144:887-900)

最近の研究で我々は、精巣上体液中に分子量2000から50万の範囲内で400以上のタンパク質ピークを追跡し、その内の50のタンパク質が精巣上体頭部から尾部にかけて独特な部位特異性を示すことを明らかにした(図1. Chaurand et al. Proteomics 2003 3:2221-39より改変)。

その後、さらに技術に改善を重ね、スポットの直径を2mm(図1)から0.5mmまで微細化し、それぞれのスポットから得られたプロテオームプロファイリングを連結統合し、画像化する事を可能にした。

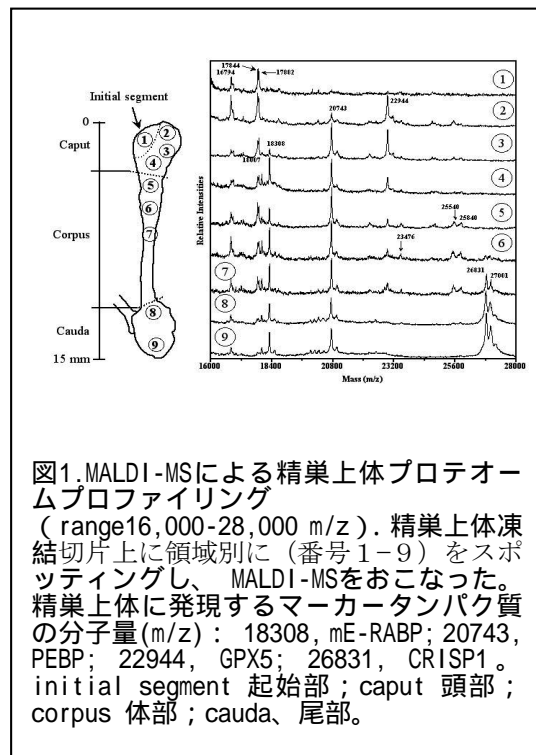


図1. MALDI-MSによる精巣上体プロテオームプロファイリング (range 16,000-28,000 m/z). 精巣上体凍結切片上に領域別に(番号1-9)をスポットティングし、MALDI-MSをおこなった。精巣上体に発現するマーカータンパク質の分子量(m/z): 18308, mE-RABP; 20743, PEBP; 22944, GPX5; 26831, CRISP1. initial segment 起始部; caput 頭部; corpus 体部; cauda、尾部。

2. 研究の目的

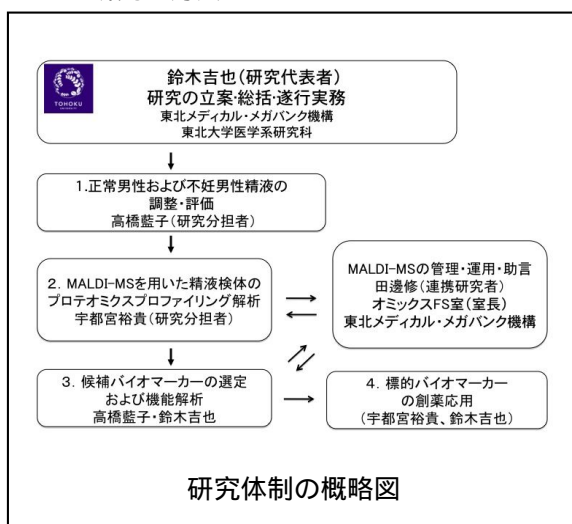
これまで我々のグループは、精液の4つの構成要素、精子、精巣上体液、前立腺液、精囊液のうち、精巣上体液に注目し研究を続けてきた。正常な精子は精巣上体内を通過中に管腔内の連続した環境変化に暴露されるこ

とにより精子表面が様々に修飾されることにより最終的に運動能と受精能を獲得する。これらのことから、精巣上体で分泌されるタンパク質群が精子の質や、IVFまたはICSIの成功率に深く関わっていると我々は仮定した。

我々のグループは脈々と精巣上体をターゲットにした研究を行っており、特に精巣上体特異的リポカリン遺伝子をモデルにその遺伝子発現機構の解明に取り組み、それに関連した転写因子の同定を行った。また、マウスの精巣上体を標的としたプロテオミクス解析によって簡便に大量の情報（ビックデータ）を処理するための基本的技術・情報資源は蓄積されている。これら両者の研究で培ってきた資源は本研究でも活用、発展されると考えた。

我々はこの仮説に基づき、前述したMSの特性（1. 短時間でのプロテオームプロファイリングの回収および解析、2. サンプル調整が簡便）を利用して精力的に精液プロテオームプロファイリング解析を行い、生殖補助医療の必要性の有無を決定するバイオマーカー候補分子群を選別し、最重要バイオマーカーを同定する事を目標にした。

3. 研究の方法



(1) 正常男性および不妊男性精液の調整・

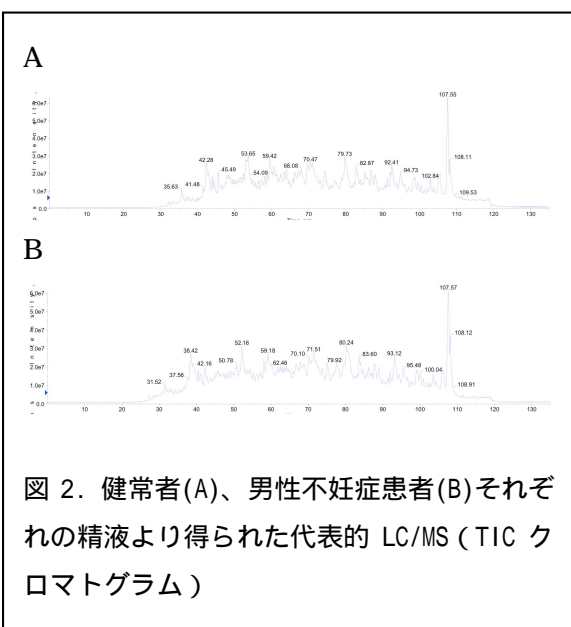
評価

正常男性および不妊症男性の射精後精液を的手法にて回収する。液状化後に500g x 5分遠心し、精子成分と精漿成分に分画し-80にて保存した。精子の一部は、将来の形態観察、免疫組織化学染色に備えて、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液中で固定し保存した。

(2) MSを用いた精液検体のプロテオミクスプロファイリング解析

上記で用意した精液の濃度測定をQubit Protein Assay Kitを用いて行い、還元とアルキル化を行った後、メタノールクロロホルム沈殿を行なった。pH調整を行なった後、トリプシン消化をover nightで行い、酸性化、pH調整後に濃度測定を行い200ng/μLに調整した。脱塩した後、乾燥の過程を経てLC/MSを行なった。上記により検出された精液タンパク質プロファイルを正常人グループと生殖補助医療対象グループの組み合わせで解析を行なった。

4. 研究成果



研究申請段階ではMALDI-TOF法を用いて精液検体のプロテオミクスプロファイリング

を行う予定であったが、Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC/MS)を併用し、分画した精子成分と精漿成分のサンプル調整条件、MS条件を各種試みた結果、LC/MSがより安定してシグナル検出可能であり、それに前処理プロトコルを各種組み合わせた結果、格段のノイズの減少を達成することができた。

その結果、200以上のタンパク質ピークを確認し、その内の数十ピークは健常者群と男性不妊症患者群間で違いが認められた(図2)

以上の結果より、健常者と男性不妊症患者精液におけるプロテオミクス解析にLC/MSを用いることにより、今後の男性不妊症に関連するマーカー探索に向けた基礎的知見を蓄積することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件 全て査読あり)

1. Kuriyama S, Yaegashi N, Nagami F, Arai T, Kawaguchi Y, Osumi N, Sakaida M, Suzuki Y, Nakayama K, Hashizume H, Tamiya G, Kawame H, Suzuki K, Hozawa A, Nakaya N, Kikuya M, Metoki H, Tsuji I, Fuse N, Kiyomoto H, Sugawara J, Tsuboi A, Egawa S, Ito K, Chida K, Ishii T, Tomita H, Taki Y, Minegishi N, Ishii N, Yasuda J, Igarashi K, Shimizu R, Nagasaki M, Koshiba S, Kinoshita K, Ogishima S, Takai-Igarashi T, Tominaga T, Tanabe O, Ohuchi N, Shimosegawa T, Kure S, Tanaka H, Ito S, Hitomi J, Tanno K, Nakamura M, Ogasawara K, Kobayashi S, Sakata K, Satoh M, Shimizu A, Sasaki M, Endo R, Sobue K, Tohoku Medical Megabank Project Study Group T, Yamamoto M. The Tohoku Medical Megabank Project: Design

and Mission.

J Epidemiol. 26:493-511. 2016

doi: 10.2188/jea.JE20150268.

2. Kurosawa H, Utsunomiya H, Shiga N, Takahashi A, Ihara M, Ishibashi M, Nishimoto N, Watanabe Z, Abe H, Kumagai J, Terada Y, Igarashi H, Takahashi T, Fukui A, Suganuma R, Tachibana M, Yaegashi N.

Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption.

Human Reprod. 31: 2321-2330. 2016

doi: 10.1093/humrep/dew187.

3. Otsuki A, Otsuki T, Tokunaga H, Niikura H, Nagase S, Sugiyama T, Toyoshima M, Utsunomiya H, Yokoyama Y, Mizunuma H, Sato N, Terada Y, Shoji T, Sugiyama T, Nakahara K, Ohta T, Yamada H, Tase T, Nishiyama H, Fujimori K, Takano T, Takahashi F, Watanabe Y, Yaegashi N.

Evaluation of postoperative chemotherapy in patients with uterine carcinosarcoma: a retrospective survey of the Tohoku Gynecologic Cancer Unit.

Int J Clin Oncol. 20:574-578. 2015

doi:10.1007/s10147-014-0732-0.

4. Nagai T, Niikura H, Okamoto S, Nakabayashi K, Matoda M, Utsunomiya H, Nagase S, Watanabe M, Takeshima N, Yaegashi N.

A new diagnostic method for rapid detection of lymph node metastases using a one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in endometrial cancer.

*Ann Surg Oncol.*22:980-986. 2015

doi:10.1245/s10434-014-4038-2.

5 Tadakawa M, Sugawara J, Saito M, Nishigori H, Utsunomiya H, Nagase S, Tokunaga H, Kurakata-Nakamura M, Sugiyama T, Yaegashi N.

Fertility and pregnancy outcomes following

B-Lynch sutures for post-partum hemorrhage.

*J Obstet Gynaecol Res.*41:559-564. 2015

doi: 10.1111/jog.12590.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 吉也 (SUZUKI, KICHIYA)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師

研究者番号：30422116

(2) 研究分担者

宇都宮 裕貴 (UTSUNOMIYA, HIROKI)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：10359507

立花 眞仁 (TACHIBANA, MASAHITO)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30431571

高橋 藍子 (TAKAHASHI, AIKO)

東北大学・大学病院・生殖補助医療胚培養士

研究者番号：30436125