

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08239

研究課題名(和文) 加齢性不妊症の克服を目指した生殖機能改善法の開発

研究課題名(英文) Development of reproductive technology against aging-related infertility

研究代表者

竹尾 透 (Takeo, Toru)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・講師

研究者番号：10517014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に存在する硫黄は、レドックス恒常性の維持や生体機能の調節に関与することが知られているが、生殖における役割は未だ不明な部分が多い。そこで本研究では、精子における生体硫黄の機能解明や加齢による精子中硫黄の酸化状態を評価し、加齢性不妊症における生体硫黄の関連を検証した。精子中チオールの酸化は、精子運動パターンを変化させ、受精能を低下させることが明らかになった。さらに、加齢に伴う受精能低下と並行して、精子や各種生殖器官の酸化状態の変化が観察された。以上、本知見は、生体硫黄の酸化が精子の受精能低下に関与することを示し、チオール酸化を標的とした加齢性不妊症の予防、診断、治療法の開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、精子中チオールの酸化還元状態が受精能に関与することを明らかにし、精子に起因する不妊症の解明や予防・診断・および治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sulfur-containing compounds are involved in maintenance of redox homeostasis and regulation of biological functions. However, the role of the sulfur-containing compounds in reproduction is still unknown. Previously, we have shown that various sulfur-containing compounds are useful for improving fertility, and find the importance of biological sulfur in reproduction. Therefore, in this study, we examined the function of membrane protein with thiol groups in sperm. First, we investigated the effect of oxidation of thiol groups on the fertilization ability of sperm. Oxidation of thiol groups altered the sperm motility pattern and reduced the fertility. Furthermore, sperm in which thiols were oxidized had impaired calcium homeostasis and suppressed capacitation. In summary, the present findings indicate that oxidation of thiols in sperm protein is involved in the decrease in fertility of sperm, and the evaluation of thiol groups in sperm would be useful for diagnosis of male infertility.

研究分野：薬学、生殖生物学、実験動物学

キーワード：不妊症 生殖工学技術 受精 精子 卵子 受精能獲得 生体硫黄 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不妊症は、妊娠を望むカップルが1年以上の不妊期間がある状態と定義され、晩婚化および少子化による人口減少を課題とする本邦において克服すべき疾患である。不妊症を克服するためには、加齢に伴う受精能低下に関与する因子の解明が必要であり、本知見に基づいた予防・治療法の開発が求められている。これまでに私達は、含硫化合物が受精機能の改善に有効であることを明らかにしており、含硫化合物を利用した生殖工学技術の開発にも取り組んでいる。本知見から、含硫化合物が受精機能における有用性は示されているが、生殖細胞における生体硫黄の役割や加齢による生体硫黄の状態変化は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、生体硫黄が受精機能に及ぼす影響を明らかにすることで、加齢に関連する不妊症の原因解明、予防・治療法の開発に繋がる基礎的知見の収集を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、C57BL/6 系統の成熟雄マウスから採取した精子を用いて、膜非透過性のチオール選択的酸化剤 (5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) : DTNB) を処理した精子膜上チオールが酸化された精子の受精能を評価した。また、C57BL/6 系統の老齢雄マウスを用いて、受精能および精子や各種生殖器官の酸化状態の変化を評価した。

4. 研究成果

1. チオール酸化型精子の調製

タンパク質中チオール基を酸化した精子を調製するために、各種濃度の DTNB を精子に処理した。精子中チオールと DTNB の反応については、DTNB の反応産物である TNB 量を評価することで、精子が酸化されたことが確認できた。

2. チオール酸化が精子における受精能の低下

精子膜上タンパク質中チオール基の酸化と受精能の関係を評価するために、DTNB を処理した精子を用いて体外受精を行った。その結果、DTNB によりチオール基が酸化された精子は、受精能の低下が認められた。

3. チオール酸化型精子における先体反応誘起率

精子中チオール基の酸化が受精能を低下させる原因を明らかにするために、精子の受精能を示す指標となる先体反応誘起率を評価したが、DTNB 処理精子は先体反応誘起率に変化を及ぼさなかった。

4. チオール酸化型精子における運動能の低下

精子中チオール基の酸化が運動能に及ぼす影響を明らかにするために、精子運動性解析装置により運動能を評価した結果、DTNB 処理精子は、受精能獲得過程に起こるハイパーアクチベーションの指標となる精子頭部の振幅 (ALH) が低下した。

5. チオール酸化型精子におけるカルシウム量の低下

精子中チオール基の酸化が受精能獲得過程において生じる細胞内カルシウム量の上昇に及ぼす影響を評価するために、Fluo 4-AM によりカルシウムを標識し、フローサイトメトリーを用いて細胞内カルシウム量の変化を評価した。その結果、DTNB 処理精子では、培養中の精子内カルシウム量が減少した。

6. 老齢雄マウスにおける受精能の低下と酸化状態の変化

成熟雌マウスあるいは老齢雌マウスと成熟雌マウスを交配させた結果、老齢雄マウスにおいて受精率の低下が認められた。また、精子や各種生殖器官の酸化状態の変化が観察された。

以上、本知見は、生体硫黄の酸化が精子の受精能低下に関与することを示しており、精子の受精能診断におけるチオール基評価の有用性やチオール酸化を標的とした加齢性不妊症の予防や治療法の開発が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Takeo T, Nakagata N

In Vitro Fertilization in Mice, Cold Spring Harb Protocols, 2018(6) 2018年4月

[学会発表](計12件)

1. Toru Takeo, Naomi Nakagata

Mouse Reproductive Technology, TT2019 Workshop 2019年4月11日

2. Satohiro Nakao, Ayumi Mukunoki, Hidetaka Yoshimoto, Kana Tamura, Chihiro Sugahara, Koharu Kirikihira, Kotono Ito, Mei Yamada, Serina Kuroshima, Ryusei Maeda, Jorge Sztejn, Toru Takeo, Naomi Nakagata

Research & Development of Mouse Reproductive Technology in CARD, The 15th Transgenic Technology Meeting 2019年4月8日

3. Toru Takeo, Naomi Nakagata
Development of Mouse Reproductive Technology, 2019 AMMRA/AMPC Meeting 2019年2月22日
4. Toru Takeo
Advances in Mouse Reproductive Technology, 8th AFLAS conference 2018 2018年11月30日
5. Satohiro Nakao, Kazuki Shirakado, Kana Tamura, Mayumi Ikeda, Yu Ishima, Toru Takeo, Naomi Nakagata
Oxidation of protein thiols reduces sperm fertility by suppressing hyperactivation, Fourth World Congress of Reproductive Biology 2017年9月28日
6. 白角一樹、中尾聡宏、田村香菜、池田真由美、異島 優、竹尾 透、中潟直己
生殖医療技術への応用を企図した精子中硫黄の機能解析、熊本大学生命資源研究・支援センター遺伝子実験施設アクティブボード 2017年7月3日
7. Toru Takeo, Naomi Nakagata
A Powerful Strategy To Conduct Mouse Research By Using The High-efficient Reproductive Technology, Genome Editing USA Congress and co-located Advances in Transgenic Technology USA Congress 2017年5月12日
8. 白角一樹、中尾 聡弘、田村 香菜、竹尾 透、池田 真由美、異島 優、中潟 直己
男性不妊治療に対する新規標的としての精子中チオール基の重要性、日本薬学会第 137 年会 2017年3月26日
9. 白角一樹、中尾聡宏、田村香菜、池田真由美、異島 優、竹尾 透、中潟直己
精子生体膜中チオールの酸化による受精能獲得の抑制、第 34 回生殖工学会 2016年12月3日
10. 白角一樹、中尾聡宏、田村香菜、池田真由美、異島 優、竹尾 透、中潟直己
精子の受精能獲得における生体硫黄の役割、第 39 回日本分子生物学会 2016年12月2日
11. 竹尾 透、吉本英高、椋木歩、竹本賢司、白角一樹、田村香菜、野田雅文、須賀原千明、桐木平小春、山下紀代子、近藤朋子、春口幸恵、中牟田裕子、竹下由美、梅野智子、石田恵理、高橋郁、岩本まり、土山修治、坂本亘、中川佳子、中潟直己
最新の生殖工学技術を用いたマウス研究の迅速化、第 39 回日本分子生物学会 2016年12月2日
12. Kazuki Shirakado, Satohiro Nakao, Kana Tamura, Hidetaka Yoshimoto, Mayumi Ikeda, Yu Ishima, Toru Takeo, Naomi Nakagata
Simple diagnosis of sperm fertility by determining the level of protein thiols using Ellman's reagent, 7th AFLAS Congress 2016年11月8日

〔図書〕(計1件)

Takeo T, Sztejn JM, Nakagata N.
The CARD method for mouse sperm cryopreservation and in vitro fertilization using frozen-thawed sperm, Microinjection, Methods in Molecular Biology, 243-256, 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. 熊本大学生命資源研究・支援センター 資源開発分野：
http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html
2. Nakagata Lab:
<https://nakagata-lab.weebly.com/>
3. マウス生殖工学技術マニュアル
<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：異島 優

ローマ字氏名： ISHIMA Yu

所属研究機関名：徳島大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00457590

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。