

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592383

研究課題名（和文）ARTにおける適切な治療方針決定のための新しい精液検査法に関する研究

研究課題名（英文）Study on new sperm laboratory procedure for appropriate treatment options in the assisted reproductive technology

研究代表者

岩本 晃明 (Iwamoto, Teruaki)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：60046117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000 円、（間接経費） 1,170,000 円

研究成果の概要（和文）：不妊カップルの約半数原因に男性因子が見られるものの、その多くは原因不明であり、生殖補助技術（ART）を利用せざるを得ない現状である。研究代表者らは従来の精液検査に加えて治療方針決定のために精子の妊孕性を診断出来る新しい検査法の開発に取り組んだ。精子運動が不良なために妊娠しにくい精子無力症の原因の一つとなる精嚢タンパクのSemenogelin(Sg)に注目し妊娠中のパートナーの精子へのSg結合率、結合量と男性不妊症例とで比較し後者でより有意に高値であることを明らかにした。男性不妊患者精子のSg結合率、結合量測定が新しい検査法になりうるのか今後妊娠率、出産率との関連性を明らかにしなければならない。

研究成果の概要（英文）：Half of infertile couples are caused by a male factor. However, the most of the cause are unknown. Therefore, it is forced to use current state assisted reproductive technology (ART). Research delegates worked on the development of new tests that can diagnose the fertility of sperm for the treatment decision-in addition to a conventional semen analysis (sperm concentration, motility and morphology). Semenogelin (Sg), seminal vesicle protein is one of the causes of asthenozoospermia. Therefore, Sg binding rate and the amount of binding to the sperm of male infertility patients and partners of fertile women as control were measured. As a result, it was revealed that these parameters were significantly higher in former cases than in latter. In the future, it is necessary to clarify association with the relevance pregnancy rate and the birth rate of infertile couple whether the measurements of Sg binding to male infertile patient's sperm can be a new method for semen analysis.

研究分野：泌尿器科

科研費の分科・細目：生殖医学

キーワード：精子運動抑制因子 セメノジェリン 精子無力症 精液検査 男性不妊症 精嚢蛋白 妊孕能 少子化

1. 研究開始当初の背景

(1) 男子不妊症外来の中で精子無力症によって妊娠に至らない症例を多く経験し、何とか精子の運動を活発にさせる方法はないものかと思案していた頃、Gagnon 一派が1981年哺乳類精漿中に除膜精子の運動を抑制する精子運動抑制因子(Seminal plasma sperm motility inhibitor 以下SPMI と略す)の存在を発見したことを知り、このSPMIが精子無力症の原因究明の手がかりになるのではと1986年、SPMIの精製分離から基礎研究にタッチした。SPMIの精製分離を1回の射出精液量が最も多いブタを選び成功した。このSPMIの研究成果を1987年のCanadian Fertility and Andrology Society Annual Meetingにて発表しAward for presentationを受賞した。(J Andrology 9:377-383,1988, J Urology 140:1045-1048,1988)。ブタSPMIは分子量55kDで14,16,18kDの3つのポリペプチドからなる塩基性蛋白で免疫電顕から精囊より分泌される膜蛋白であることが明らかになった。これらのSPMIが精子運動を阻害する機序は精子の運動機構に重要なdynein腕に存在するdynein ATPaseの活性を阻害することにより除膜精子の運動を抑制することが判明した(Mol Repro Devel 31:55-62,1992, Mol Repro Devel 36:475-481,1993)。この間の研究で得られた成果から、SPMIは精子無力症の原因の一つになりえるのではないかと推察した。

(2) SPMIの前駆体がSemenogelin(Sg)であることを突き止めた。そこでSgについての遺伝子工学的研究が開始された。精巢内で形成された精子は、運動能・受精能は持たず、機能的には未熟である。この未熟な精子は精巢上体で運動能を獲得し、射出の際に運動を開始する。この過程において、卵や雌性生殖器官分泌因子により精子の

最終成熟が起こり、受精能を得る(受精能獲得)。そして卵周辺部において先体胞の開口分泌が起き(先体反応)、受精に至る。また哺乳類をはじめとした一部の動物では、この受精過程において精漿に含まれる因子が精子の運動能や受精能に対して抑制的に働くことが判っている。これまでに精漿中の精子受精能獲得を抑制する因子(受精能抑制因子)として種々の物質が研究されて来た。ヒト精子においては前立腺から分泌されるprostasomeが精子細胞膜の流動性を低下させ(E Carlini, et al. (1997) Arch. Biochem. Biophys. 343, 6-12.)、先体反応を抑制する(NL Cross & P Mahasreshti (1997) Arch. Androl. 39, 39-44.)。そしてヒト副生殖腺の一つである精囊からも精子運動抑制因子が同定されている(H Lilja, et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 1894-1900; T Iwamoto, et al. (1995) FEBS Lett. 368, 420-424)。このように、精子の外部環境因子による精子機能の制御は、受精において必要不可欠な現象であり、注目されている研究分野である。申請者は、男子不妊症外来の中で精子無力症によって妊娠に至らない症例を多く経験し、この原因としてSPMI精子無力症の原因究明の手がかりになるのではと、SPMIの基礎的および臨床研究を20年以上継続してきた。SPMIが精子運動を抑制する機序は、精子の運動機構に重要なdynein腕に存在するdynein ATPaseの活性を阻害することによると判明した(T Iwamoto, et al. Mol Reprod Devel (1992)31:55-62, (1993) 36:475-481)。SPMIの前駆体は精液凝固体の主要蛋白であるsemenogelin (SEMG)であることを突き止め、次いで健常男性の精漿中SEMG濃度と運動率を検討したところ軽度の負の相関を認めた(K Yoshida et al, J Androl, (2003)24:878-884)。また、SEMGは活性酸素の生成を抑制することで精子の受精能獲得を阻害することも明らかにしてい

る (E de Lamirande et al. J Androl, (2001) 22:672-79)。また申請者らは免疫電子顕微鏡法ならびにフローサイトメーターを用いて SEMG の精子細胞膜への結合性について検討を始めており、精子無力症患者の精子細胞膜には SEMG が高率に結合していること、そしてその局在は精子の細胞膜が障害された部位であることを観察している。一方、未だに受精能抑制因子の生理的作用における分子メカニズムは明らかになっていない。また Kawano ら (N Kawano & M Yoshida, (2007) Biol. Reprod. 76, 353-61) は、SEMG のマウスにおける相同タンパク質である SVS2 が in vivo において受精能抑制因子として働くことをごく最近明らかにしている。

2. 研究の目的

(1) 2005 年女性一人当たりの平均出産数を示す合計特殊出生率が過去最低の 1.26 となり、その後徐々に上昇するも、2009 年 1.37 で上昇傾向は止まりとなり、本邦での少子化問題は深刻な社会問題の一つである。

(2) 現在、不妊カップルの頻度は約 10 組に 1 組に認められ、その原因に男性因子が半数見られるものの非手術療法は皆無である。従って生殖補助技術 (ART) を利用せざるを得ない現状である。原因究明は置き去りに漫然と ART が行なわれて治療に経済的な負担が大きく、現在の様な不況がつづけばさらに多くの不妊カップルが挙児を諦めざるを得ない。その原因のひとつとしては適切な治療法選択に有用な精液検査が行われないことにある。このような社会的な背景から申請者らは今までに培った技術、研究成果をもとに従来の精液検査に加えて、ART における適切な治療方針決定のための包括的に精子の妊娠性を診断出来る新しい検査法を開発し、適切な治療法選択とそれによる無駄な検査と治療を廃することにより、不妊カップルの経済的な支援を目指したい。

3. 研究の方法

(1) 従来、精子無力症の診断には顕微鏡下で精子運動率の測定を行うのが唯一の方法であり、さらに正常に受精能獲得が可能かどうかは現実的には評価が難しく、通常の精液検査では行われてこなかった。上述したように SPMI は精子無力症の診断パラメータの 1 つとして有用であるだけでなく、基礎研究では受精能獲得にも関与していることが明らかとなっており、SPMI 結合性を利用して運動性のみならず、包括的に精子の質を判定する新規マーカーとして確立することを目指そうと考えた。

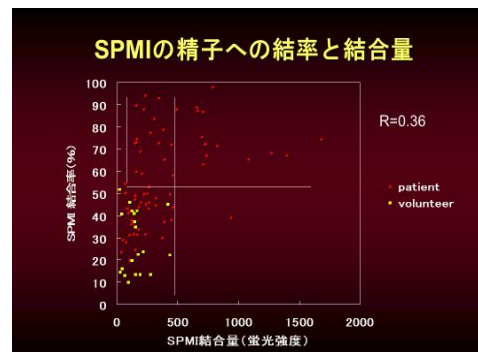
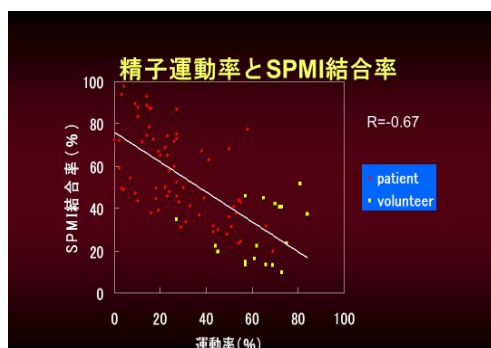
(2) SPMI をマーカーとして不妊症患者の精子と SPMI との結合率、結合量を測定する。そのカップルがどのような ART 治療によって最終的に妊娠、児を得たのか追跡調査を行う。幸い当リプロダクションセンターでは予後について outcome をきちんと得られるシステムが確立しており、研究期間 3 年の妊娠出産例と SPMI の精子結合率、結合量との相関を解析することによって、初診時検査によって男性側要因を正確に診断する基準を決定し、不妊カップルに適切な治療方針を提示するための新しい精液検査結果を提供できると確信する。

4. 研究成果

(1) 精子に対する semenogelin (Sg) 結合率を測定するため、精液から精子洗浄および固定の後、抗 Sg 抗体による免疫染色を行い、FACS による解析を行う実験系を立ち上げた。既報に基づき試薬や器具を揃えた上で、実際の臨床精液検体を用いて一連の操作を行ったが、当初は抗 Sg 抗体による精子の染色シグナルが検出できず、結合率が測定できなかった。緩衝化 buffer による固定に問題があると考え、その pH を測定したところ強塩基性となっていた。固定中に強塩基性溶液中で、抗原 (Sg) が精子膜表面より流出してしまったことが予想された。そこで、緩衝液を変更し中性付近となるようにしたうえで固定を行った

ところ、抗Sg抗体による染色が検出できるようになった。このことよりSgの立体構造はpHの影響を強く受け、精子膜との結合性に影響することが推察された。今後はこの点を更に追求し、その意義を検討していきたいと考えている。また、大量の臨床精液検体を処理する必要があるため、96穴プレートを用いた小スケールでの精子染色法の条件を検討し、実際の臨床検体を用いてその有効性を確認することができた。現在はこれらの成果の下に、臨床精液検体におけるSg結合率のデータを蓄積している段階である。一方、精子無力症患者の精子におけるSgの結合形態を明らかにする目的で、電子顕微鏡による観察を行い精子無力症患者の精子には、Sgの結合シグナルが多数見られ、その部位は細胞膜が欠失した部分に局在していた。また、運動率の良い精子での結合様式を明らかにする目的で未固定での染色を検討したところ、運動精子は染色されないことを確認した。Percoll洗浄後の健常男性精子においてはSgの結合は殆ど見られなかった。

(2) 男性不妊の患者と自然妊娠した妊婦のパートナーを健常者ボランティアとして精液試料を収集しSg結合能、結合量を測定した。精子無力症患者ではSPMIの精子への結合性が、精子無力症診断の補助となり得ることが示唆されたが男性不妊患者精子において、Sg結合率($71.46 \pm 21.68\%$)と運動率($29.28 \pm 19.58\%$)の間に相関は見られなかった。正常ボランティアのSg結合率($19.83 \pm 2.26\%$)



と比較して、男性不妊患者精子におけるSg結合率は有意に高値を示した。またSPMIの結合率が55%以上の精子を結合量500以上と以下で分けた群を比較しても精子パラメーターに明らかな違いは認めなかった。しかし、SPMIが精子膜構造の破綻した部位に結合するという事を考えると、結合量の違いにより受精能に違いが出てくる可能性示唆された。今回の知見からSg結合率55%以上、結合量500以上を精子無力症診断のカットオフ値とした。精子無力症の原因の一つとして、精子の細胞膜が障害された部位にSPMIが結合することにより何らかの情報伝達系が働き、精子運動をブロックしていることが示唆された。この精子内での情報伝達系について今後検討されなければならない。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計10件)

- ① Sato Y, Iwamoto T, Shinka T, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Yamauchi A, Nakahori Y. Y Chromosome gr/gr Subdeletion Is Associated with Lower Semen Quality in Young Men from the General Japanese Population but Not in Fertile Japanese Men. *Biol Reprod.* 査読あり 2014 Jun;90(6):116.
doi: .1095/biolreprod.114.118810. Epub 2014 Apr 23.
- ② T Iwamoto, S Nozawa, MN Mieno, K

- Yamakawa,K Baba, M Yoshiike, M Namiki, E Koh, J Kanaya,A Okuyama, K Matsumiya, A Tsujimura, H Kanetake,J Eguchi, NE Skakkebaek, M Vierula,J Toppari, N Jorgensen:Semen quality of 1559 young men from four cities in Japan: a cross-sectional population-based study. *bmjopen*. 査読あり *bmj.com* on April 30, 2013 - Published by group.bmj.com
- ③ T Iwamoto, S Nozawa,M Yoshiike,M Namiki, E Koh,J Kanaya, A Okuyama, K Matsumiya,A Tsujimura,K Komatsu, T Tsukamoto,N Itoh, MN Mieno.M Vierula,J Toppari, NE Skakkebak, N Jorgensen :Semen quality of fertile Japanese men:a cross-sectional population-based study of 792 men. *bmjopen* 査読あり *bmj.com* on January 31, 2013 - Published by group.bmj.com
- ④ Nakahori Y,Sato Y, Ewis AA, Iwamoto T, Shinka T, Nozawa S,Yoshiike M, Yang XJ, Sei M,Namiki M,Koh E,Ito N, Matsumiya K, Nakagome Y. Climatic influence on the reproductive characteristics of Japanese males.*J Hum Genet*. 査読あり 2012 Jun;57(6):375-8. doi: 10.1038/jhg.2012.38. Epub 2012 Apr 26.
- ⑤ Imai K, Yoshinaga J, Yoshikane M, Shiraishi H, Mieno MN, Yoshiike M, Nozawa S, Iwamoto T.Pyrethroid insecticide exposure and semen quality of young Japanese men. *Reprod Toxicol*. 査読あり 2014 Jan;43:38-44. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.10.010. Epub 2013 Nov 1.
- ⑥ Y Sato, T Shinka, T Iwamoto, A Yamauchi,Ya Nakahori : Y Chromosome Haplogroup D2* Lineage Is Associated with Azoospermia in Japanese Males *Biol Reprod*. 査読あり 2013 Apr 25;88(4):107.doi:10.1095/biolreprod.112.105718.
- ⑦ Y Sato, K Yoshida, S Nozawa,M Yoshiike, M Arai, T Otoi, and T Iwamoto : Establishment of adult mouse sertoli cell lines by using starvation method.Reproduction 査読あり March 18, 2013 REP-12-0086 Reproduction Advance Publication first posted online on 18 March 2013
- ⑨ Sato Y, Jinam T, Iwamoto T, Yamauchi A, Imoto I, Inoue I, Tajima A. : Replication Study and Meta-Analysis of Human Non-Obstructive Azoospermia in Japanese Populations. 査読あり 2013 Mar 6. [Epub ahead of print]
- ⑩ Sin HS, Koh E, Taya M, Iijima M, Sugimoto K, Maeda Y, Yoshida A, Iwamoto T, Namiki M. A novel Y chromosome microdeletion with the loss of an endogenous retrovirus (ERV)-related testis-specific transcript in AZFb region. *J Urol* 査読あり 2011;186(4):1545-52.
- 〔学会発表〕(計 5 件)
- ① 山崎一恭、菅藤哲、高見澤聡、藤倉洋子、室井美樹、柳田薫、岩本晃明、両側精索静脈瘤に対して腹腔鏡下内精索静脈結紮術を施行し、精子運動率の著明な改善を得た高度精子無力症の 1 例 第76 回日本泌尿器科学会東部総会 2011年10 月21 日 東京
- ② 松下知彦、長谷川太郎、中野勝、岩本晃明、精管精巢上体管吻合術後 4 7 日目に射出精子の出現を見た閉塞性無精子症の

一例 第99回日本泌尿器科学会総会

2011年4月24日 名古屋

- ③ 河野菜摘子、荒木直也、吉田 薫、吉田学、宮戸健二、 精囊分泌タンパクSVS2のマウス体内受精における役割について
日本動物学会第82回大会 2011年9月23日 旭川
- ④ 河野菜摘子、荒木直也、吉田 薫、吉田学、宮戸健二、 精囊分泌タンパクSVS2のマウス体内受精における役割について
第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日 横浜
- ⑤ 山崎一恭、西山博之、岩本晃明シンポジウム7 高齢不妊カップルに対する治療戦略 加齢が精子の質/男性生殖機能に及ぼす影響～射出精子の質の向上を目指して～ 第58日本生殖医学会 学術講演会・総会 神戸 11/16 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本晃明 (IWAMOTO Teruaki)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：60046117

(2)研究分担者

吉田薫 (YOSHIDA Kaoru)

桐蔭横浜大学・先端医用工学センタ

ー・講師

研究者番号：70398973

吉池美紀 (YOSHIIKE Miki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究

技術員

研究者番号：60398964