

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20086

研究課題名(和文) 精液・精漿中のマイクロRNA解析による男性不妊症診断法の開発

研究課題名(英文) New methods for diagnosis of male infertility

研究代表者

福原 慎一郎 (FUKUHARA, Shinichiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20609870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：男性不妊患者および妊孕性が確認されたボランティアの精液、精漿中のRNAを抽出し、精液から精路や尿路の上皮細胞や白血球の混入を除去し、マイクロRNA抽出する手法の確立にむけて検証を行っている。また、以前より我々の施設では精子形成に関わる精巣特異的たんぱく質を数多く研究してきており、いくつかの新たなたんぱく質についてその局在と機能について新知見を積み重ねてきた。そのいくつかのたんぱく質を制御するマイクロRNAについて現在検討を行っている。その中でcapping protein betaが妊孕性に関わっていることを発見し報告し、現在も検討を積み重ねているところである。

研究成果の概要(英文)：We have been establishing the method to extract RNA and purify it from fertile men and infertile men. We found that Human CP 3 (hCP 3) that was one of the most important actin binding proteins localized in the neck legion of human sperm had an important role for male fertile. hCP 3 is expressed in testis, changes its localization dynamically during spermatogenesis, and has some association with male infertility. We are investigating several micro RNAs that regulate this protein.

研究分野：泌尿器科

キーワード：男性不妊

### 1. 研究開始当初の背景

わが国や欧米諸国では、全夫婦の割以上が不妊に悩まされており、その原因の半分は男性側にある。しかし、男性不妊については遺伝的素因や環境ホルモンなどの関与が示唆されているが、大部分が原因不明である。少子高齢化が進む我が国において不妊症は出生率低下の要因の一つとして少子化社会対策基本法〔2003年〕にもその治療支援が盛り込まれ、不妊症への社会的関心が一層高まっている。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。また、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。事実、世界プロジェクトとして執り行われた若年男性の生殖能調査において、我が国の若年男性の精子濃度が世界的にみても著しく低下していることや、100人に1人の高頻度で無精子症が存在することが明らかにされた。また、この最も重症な男性不妊症である非閉塞性無精子症の患者の治療法として、精巣内精子再手術 (TESE) が行われている。しかしながら、その精子採取率は約40%であり、多くの患者が精子獲得を果たせず、身体的、精神的、経済的負担のみを負わされている。これまで信頼性のある精巣内精子成功予測はTESE前の精巣生検とされているが、侵襲的で感受性、特異性ともに7割程度にとどまる。そのため、治療選択に必要な信頼性の高いパラメーターや精巣内精子採取予測の非侵襲的で特異度・感度の高い検査法の開発が強く望まれている。一方、マイクロRNAは乳がん、大腸がんなどや認知症を早期発見する次世代診断システムの大規模な開発プロジェクトが進むなど、将来の臨床応用が期待されている分野である。精子の分化の各段階でそれぞれ特異的なマイクロRNAがかかわっていることが報告されてきており、精液中のマイクロRNAを検出・測定することにより妊孕性が非侵襲的に診断できる可能性があり、本研究はこの仮説を明らかにすることを目的とする。すなわち、身体的にも経済的にも負担の少ない男性不妊症の新規診断法を開発し、的確な不妊症治療法の選択に資することを目的とする。

### 2. 研究の目的

近年、不妊治療の主体となっている補助生殖医療技術 (ART)、特に体外受精 (IVF)・顕微授精 (ICSI) の発達は不妊治療に大きな光と影を落としている。政府が体外受精・顕微授精による不妊治療に公的助成制度 (特定不妊治療費助成事業) を開始した2004年には、新鮮卵を用いたARTの全国集計件数 (総治療周期数) は、年間8万6千件であったが、年々増加の一途をたどり、2012年には21万件となっている。しかしながら、出生児数は2004年

では1万2千人であったのに対し、2012年には1万人とむしろ減少しており、これは採卵あたりの妊娠率が21.6% (2004年) から16.5% (2012年) に減少していることが主な原因と考えられる。つまり、助成制度によるARTの広がりがみられる一方で、結果としてQuality不良の配偶子の使用による妊娠率・出生児数の低下が問題化している。男性不妊の場合、ICSIに使用する選択精子のQualityが極めて妊娠率に重要であることは論を待たない。事実、全国集計のTESE-ICSIの妊娠あたりの流産率は27.6%と極めて高く、流産率改善のためには、選択精子のQualityの評価と改善が求められている。しかし、一般臨床の現場では、より運動性の高い精子がQualityの高い精子とされ、できるだけ運動性の良好な精子を選択するといった方策しかとらわれておらず、非運動精子では、高倍率観察での正常形態精子の選別の有効性や、DNAダメージの少ない精子を選択するために実験的な試みがなされているが、コスト面や技術の煩雑さから現状では実用化に至っていない。さらに、前述したように、無精子症におけるTESEの精子採取率の改善も急務である。これらの問題を解決すべく、本研究ではマイクロRNAを用いた新たな男性生殖機能評価法開発を目的として、以下の2点に絞って検討を進める。

(1) 新しいより信頼性の高い精液検査パラメーターの開発を行う。最近、精子の運動性や形態のみならず、精子代謝状態が妊孕性と関連する事実や精子あるいは精漿中タンパク組成と精子妊孕性が関連することが明らかにされてきている。しかしながら、これまでの単一の代謝系パラメーターやタンパクマーカーは測定法が煩雑でコスト面や再現性、さらに感度・特異度ともに実用的とは言えない。そこで、精液検体中のマイクロRNAプロファイルを分析し、従来の精液検査パラメーターとの比較、妊孕群と不妊群との2群間比較、さらにART結果との関連を解析し、その有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

臨床研究倫理審査承認を得た後、本研究について説明の上、同意を得た男性不妊患者および妊孕性が確認された健常ボランティアを対象として、精液・精漿中のRNAを抽出し、マイクロRNAのプロファイリングを行う。

妊孕性の確認されたボランティアおよび不妊患者の精子核評価実験を行い、必要に応じて精巣生検も行う。マイクロRNAプロファイルと精液パラメーターや精巣組織像あるいは精子核成熟度との比較検討を行う。

以上の発現プロファイルデータと実際の精液パラメータや精巣組織像の比較検討結果から、非侵襲的かつ信頼性の高いあらたな男性

不妊症の新規診断法の開発を行う。

(1)ボランティア(健常群・不妊群)生殖機能評価ならびにサンプル収集

一般精液検査や各種血清内分泌ホルモン値といった通常の不妊診療で施行する検査だけでは、精子の受精能などの評価は不十分なため、これら以外に精子核成熟度の評価(Chohan, KR. et al. J Androl. 2006; 27: 53-9)も行う。さらに不妊症患者で、医学的適応と患者同意があれば、精巣生検術や精巣内精子採取術を行い、その成績を明らかにする。リクルートが予定通り進まない場合は、ホームページなどで直接、生殖医療機関、患者、ボランティアへの協力の呼びかけとエントリー作業を行い、サンプル数を統計学的解析の可能なレベルまで確保するようにする。

(2)精液中のマイクロRNAの解析

精子は精粗細胞から精子へと分化するにわたって、ダイナミックに形態の変化を遂げる。その分化の各段階でそれぞれ特異的なマイクロRNAがかかわってきていることが報告されつつある。男性不妊患者および妊孕性が確認された健常ボランティアの精液・精漿中のRNAを抽出し、マイクロRNAのプロファイリングを行う。妊孕性の確認されたボランティアおよび不妊患者の精子核評価実験を行い、必要に応じて精巣生検も行う。マイクロRNAプロファイルと精液パラメーターや精巣組織像あるいは精子核成熟度との比較検討を行う。以上の発現プロファイルデータと実際の精液パラメーターや精巣組織像の比較検討結果から、非侵襲的かつ信頼性の高いあらたな男性不妊症の新規診断法の開発を行い、リアルタイムPCR法を用いて新規診断法の有効性を確認する。

#### 4. 研究成果

精子は精粗細胞から精子へと分化するにあたって、ダイナミックに形態の変化を遂げる。その分化の各段階でそれぞれ特異的なマイクロRNAが関わってきていることが報告されつつある。男性不妊患者および妊孕性が確認されたボランティアの精液、精漿中のRNAを抽出し、精液から精路や尿路上皮細胞や白血球の混入を除去し、マイクロRNA抽出する手法の確立にむけて検証を行っている。また、以前より我々の施設では精子形成に関わる精巣特異的たんぱく質を数多く研究してきており、いくつかの新たなたんぱく質についてその局在と機能について新知見を積み重ねてきた。そのいくつかのたんぱく質を制御するマイクロRNAについて現在検討を行っている。その中でcapping protein betaが妊孕性に関わっていることを発見し報告し(図1)現在も検討を積み重ねているところである。

図 1



#### 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 1 件)

福原慎一郎、宮川康 ART時代の男性不妊診療【男性不妊症の診察】臨床泌尿器科 査読無 70巻 2016 208-213

〔学会発表〕(計 5 件)

The 32<sup>nd</sup> annual EAU congress. Single nucleotide polymorphisms within the novel testis-specific Haspin gene encoding a serine/threonine protein kinase in human male infertility. Yasushi Miyagawa, Tetsuji Soda, Norichika Ueda, Shinichiro Fukuhara, Hiroshi Kiuchi, Akira Tsujimura, Hiromitsu Tanaka, Norio Nonomura. 2017/3/24 London

第61回日本生殖医学会学術講演会・総会「男性不妊患者の射出精子における精巣特異的アクチンキャッピングプロテインの発現解析」惣田哲次、宮川康、上田倫央、福原慎一郎、藤田和利、木内寛、岡本吉夫、中西佳子、一谷有希子、吉住彩香、土屋真紀、田中宏光、野々村祝夫 2016/11/3 横浜

第35回日本アンドロロジー学会学術大会「男性不妊患者における精巣特異的スクシニルCoaトランスフェラーゼのSNP解析」惣田哲次、田中宏光、上田倫央、竹澤健太郎、福原慎一郎、木内博、宮川康、辻村晃、野々村祝夫 2016/6/24 前橋

AUA annual meeting 2016. A novel transcriptional factor Nkap1 is a germ cell-specific suppressor of Notch signaling and may be a candidate causative gene of complete maturation arrest. Yasushi Miyagawa, Tetsuji Soda, Kentaro Takezawa, Shinichiro Fukuhara, Hiroshi Kluchi, Akira Tsujimura, Masato Igawa,

Hiromitsu Tanaka, Norio Nonomura 2016/5/9  
San Diego

AUA annual meeting 2016. Human capping protein 3, a novel isoform of testis-specific actin capping protein 3 subunit; the dynamic transcriptional profiles during spermatogenesis and possible implications of male infertility. Tetsuji Soda, Yasushi Miyagawa, Norichika Ueda, Kentaro Takezawa, Shinichiro Fukuhara, Hiroshi Kiuchi, Hiromitsu Tanaka, Norio Nonomura 2016/5/9 San Diego

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

福原 慎一郎 (FUKUHARA, Shinichiro)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20609870