

令和元年6月10日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20188

研究課題名(和文) SPACA1の胚発生に与える影響の解析とそれを用いた難治性不妊症の治療法の開発

研究課題名(英文) The effect of SPACA1 on the development of early embryo and development of therapy for refractory infertility by SPACA1

研究代表者

岸田 和美(Kishida, Kazumi)

滋賀医科大学・医学部・技術職員

研究者番号：50582631

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)：先行研究ではSPACA1がヒト体外受精での胚発生に深く関与すると推察される結果を得た。SPACA1は卵活性化を担う可能性があるとして推察し(1)ヒト精子SPACA1の卵活性化に影響を及ぼす分子との関連性(2)化学療法誘導性マウスにおける精巣・精子中のSpaca1の発現および疑似Spaca1低発現マウスの作出(3) Recombinant SPACA1注入による卵子活性に及ぼす影響の検討を行った。本研究期間内に十分な結果を得ることができなかったため、現在も進行中であるが、近日中に結果が得られる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では精子先体関連タンパク質であるSPACA1に着目し、男性不妊症の効率的な胚発育および妊娠率の向上を図るシステム構築を目的としている。Recombinant SPACA1をICSI時に卵子に注入することにより、卵子が活性化することが明らかになれば、精子による卵活性化障害に対する新しい治療を開発することができる。本研究が臨床応用されれば、日本における出生率の向上に繋がることが期待され、社会的に大きな意味を持つものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our previous study showed that SPACA1 is deeply involved in early stage embryonic development just after fertilization in human. We speculated that SPACA1 might be responsible for egg activation and examined the influence on the relationship between human sperm SPACA1 and molecules that affect egg activation, establishment of low SPACA1 mouse model, in that lower expression of SPACA1 is induced in testis and sperm by chemotherapy and the effect on egg activation by the recombinant SPACA1 injection. Since sufficient results could not be obtained within the period of this study, it remains ongoing.

研究分野：生殖医学

キーワード：精子 SPACA1 男性不妊

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

1. 研究開始当初の背景

精子先体関連タンパク質の1つである Sperm acrosome associated1 (SPACA1)は、ヒト精子に存在する膜タンパク質としてはじめて同定された。その mRNA は精巣で特異的に発現し、タンパク質に翻訳された後は精子の先体および赤道節の先体内膜に分布することが、間接免疫蛍光法および電子顕微鏡による観察で示されている。また、抗 SPACA1 抗体の添加により、精子の透明帯除去ハムスター卵への侵入が阻止されたこと(Hao et al., Biol Reprod. 2002)、SPACA1 knockout mouse では、巨大頭部精子症となり、先体形成が障害され男性不妊になること (Fujihara et al., development 2012) から、SPACA1 が先体の形成に深く関わるとともに精子と卵との膜融合反応に関与すると報告されている。

SPACA1 の受精後の役割については不明であったが、我々はこれまでに当院を受診した 40 歳未満の不妊治療施行患者を対象として余剰精子を用い SPACA1 が体外受精(C-IVF)成績を予測するマーカー分子となるかを検討した(Kishida et al., Zygote. 2016)。その結果、ヒト精子では SPACA1 は、(A)赤道節および先体主部に強く発現するもの、(B)赤道節および先体主部に弱く発現するもの、(C)赤道節のみに発現するもの、以上の 3 タイプに分類されることを見いだした。次に 3 タイプの精子の割合と赤道節および先体主部の SPACA1 の発現強度をインデックス化する SPACA1 インデックス*を設定し(1 個の精子中ではなく単位精子数あたりの SPACA1 量と相関する。赤道節および先体主部に SPACA1 が豊富な精子が多いほどインデックス値が高くなる。)体外受精患者における SPACA1 インデックスと胚盤胞発生率について検討した。その結果 SPACA1 インデックスと正常な胚盤胞発生率には顕著な正の相関が認められることを明らかとした ($r=0.829$ 、 $P=0.00162$)。しかし、SPACA1 インデックスと受精率には相関は認められなかった($r=0.289$ 、 $P=0.389$)。これらの結果から、SPACA1 が、受精後の胚発生に深く関わっていることが強く推察された。

精子と卵が受精する際、卵のカルシウムの放出(カルシウムオシレーション)により、卵子の活性化が開始されるが、受精後の卵子の発生に深く関わる精子由来因子は、sperm oocyte-activating factor (SOAF)と呼ばれている。現在、phospholipase C zeta (PLC ζ)(Yoon et al., J Clin Invest. 2008) などがその候補となっている。recombinant human PLC ζ をマウスとヒトの卵子に injection するとカルシウムオシレーションが誘導され、卵子が活性化することが報告されている(Yoon et al., Hum Reprod. 2012)。また、カルシウムオシレーションを誘導することにより、その後の卵質への影響を及ぼすことが報告されている (Bos-Mikich et al., Dev Biol 1997)。我々の研究をもとに、精子先体に発現する SPACA1 も PLC ζ と同様に SOAF の役割を担う、あるいは、PLC ζ を活性化する遺伝子である可能性があるかと推察し、受精後の胚発生に強い影響をもつのではないかと考えた。また、recombinant human SPACA1 を卵子内に injection することにより卵子活性が誘導され、胚形成が障害される難治性不妊の新しい治療方法になるのではないかとこの着想に至った。

*SPACA1 indexes = [(% of A-pattern sperm) x 2] + [(% of B-pattern sperm) x 1]

2. 研究の目的

先行研究をもとに、SPACA1 は SOAF の役割を担う可能性があるかと推察し、次の 3 つのテーマに沿って研究を進めた。

(1)ヒト精子 SPACA1 の卵子活性化に影響を及ぼす分子との関連性に関する研究を行った。SOAF の候補である PLC ζ と SPACA1 との関係性、および C-IVF 成績との関連性を検討した。次に、癌治療等に用いられる Busulfan を用いて、(2)化学療法誘導性マウスにおける精巣・精子中の Spaca1 の発現および疑似 Spaca1 低発現マウスの作出を行った。Busulfan 投与による薬害が精巣および精子形成に及ぼす影響を観察し Spaca1 低発現モデルマウスを作出することを目的とした。さらに、SPACA1 が、受精後の胚発生に強く影響するか検討することを目的とし、(3) Human SPACA1 full length protein(Recombinant SPACA1)の注入による卵子の活性に及ぼす影響の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) C-IVF を施行する 40 歳未満の不妊治療施行患者を対象とし、同意の得られた患者の余剰精子を用いた。精子処理後 3 時間成熟培養をした後、免疫染色法によって SPACA1 および PLC ζ の局在を確認した。染色標本あたり 100 個の精子を観察した。また、各々の局在と C-IVF 成績の関連性について検討した。

(2) 生後 5 週齢の ICR マウスを対照区、Busulfan 投与区(22mg/kg, 44mg/kg)の 3 群に分けた。生理食塩水または Busulfan 投与から 6 週間目の精巣の状態、精巣上体尾精子の観察を行った。得られた精子は凍結保存し研究(3)に利用した。

(3) Recombinant SPACA1 の精子あたりのタンパク量を設定するため SPACA1 インデックスが良好な C-IVF 患者の精子の SPACA1 量を求めた。Recombinant SPACA1 は Human SPACA1 full length protein (abcam 164368)を対象として、Western blotting を用い調べ、1 個の卵子に注入するタンパク量を求めた。8 週齢の ICR 雌マウス 3 匹に PMSG を投与して卵巣を刺激し 48 時間後に hCG を投与した後、M 卵を回収した。研究(2)で得られた精子と、前述のように規定した Recombinant SPACA1 を精子と共に顕微注入し、その後の胚分割を定時的に 5 日間観察した。

4. 研究成果

(1)精子処理後3時間成熟培養をした後、免疫染色法によって SPACA1 および PLCζ の局在を確認したところ、ヒト精子では SPACA1 は精子頭部に3パターンの局在が認められたのに対し、PLCζ の発現は先体後部または尾部のみであり、双方の局在に係性はなかった。また、精子先体前部の SPACA1 の発現輝度が強いと C-IVF 成績は良好であったが、PLCζ の局在は C-IVF 成績に係性はなかった。

(2)精巣重量は Busulfan 投与区が対照区より低重量を示した。病理所見では対照区は正常な精巣細胞を示したが、Busulfan 投与区は部分的な喪失が観察された。44mg/kg 投与群では細胞がほぼ壊滅していた。免疫染色での Spaca1 の観察は、円形精子細胞、後期精子細胞の先体が形成されている部分に分布していた。44mg/kg 投与群では細胞がほぼ壊滅していたため、Spaca1 の分布が確認できなかった。一方、精巣上体尾精子の観察では、Busulfan 投与による精子の形態には影響がなかったが、Busulfan 投与量依存的に精子運動率が低下した。また、免疫染色での Spaca1 の観察は、Busulfan 投与量依存的に Spaca1 インデックスが低下し、Western blotting による Spaca1 の検出も、44mg/kg 投与群では著しく低下した。以上のことから、Busulfan 投与は精巣および精子中の Spaca1 発現に影響した。更に、Busulfan 投与により、人為的に Spaca1 インデックス低下マウスを作出できた。

(3)卵に注入する Recombinant SPACA1 の定量を行った。現在、Mouse recombinant Spaca1 は販売されていないため、Human SPACA1 full length protein を対象とした。精子あたりの SPACA1 インデックスが良好な C-IVF 施行患者5組の余剰精子を、1ml あたり 5600 万個に調整し Western blotting を行って、SPACA1 の発現を調べた。Las4000 ソフトを用いて SPACA1 のタンパク質量を輝度に変換し、希釈した Recombinant SPACA1 の輝度と比較して計算した。最終的に、SPACA1 の量を 1pg とした。まず SPACA1 自体に卵活性化機能があるか観察した。マウスの卵胞腔に Recombinant SPACA1 を注入しカルシウムオシレーションが誘導できるか観察したところ、胚の分割は起こらず、Recombinant SPACA1 のみでは卵活性化が困難であった。次に、Busulfan 投与 22mg/kg 群で得られたマウスの精子を卵細胞質に注入したのち、卵胞腔に Recombinant SPACA1 を注入し、胚の発育過程を観察した。また、精子と Recombinant SPACA1 を同時に卵細胞質へ注入し、胚の発育過程を観察した。しかし、Piezo ICSI 等の技術面で技術習得に時間がかかり、本研究期間内に十分な結果を得ることができなかったため、現在も研究を施行している。近日中に結果が得られる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。