

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11208

研究課題名(和文) ヒト造精機能障害症例でのペルオキシソーム脂質代謝機能の解析と臨床応用への展開

研究課題名(英文) Analysis of male infertility and peroxisome dysfunction

研究代表者

水野 由美 (Mizuno, Yumi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20584014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはこれまでの研究で、プラスマローゲン合成過程の異常で奇形精子を伴う不妊症を呈することを明らかにした。本研究では、プラスマローゲン前駆体の投与が奇形精子の先体形成の改善に役立つことを明らかにした。また、ペルオキシソームの脂質代謝異常を呈するマウス精子では、先体膜の形成または膜同士の接着に異常が起きていることや、円形精子細胞から精子へと尾部を形成し形態変化する際に、細胞質が一部残ったままになっていることがわかった。次に、ヒト精子の解析で、精子運動や奇形率で正常範囲に満たない精子を解析した結果、男性不妊症のマーカーとなりうる分子を発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで詳細のわかっていなかった、精子形成におけるペルオキシソームの役割について明らかにすることができた。また、男性不妊症のマーカーになりうる分子を見つけることができた。少子高齢化が進む日本では、不妊症の治療に関わる知見は重要であり、本研究での奇形精子の発症メカニズムに関する成果は、将来の不妊症の治療や男性不妊症の検査マーカーとして役立てられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have revealed that abnormalities in the plasmalogen synthesis process result in malformed sperm. In this study, we show that oral administration of plasmalogen precursors helps improve acrosome formation in malformed sperm. Tysnd1 KO mice that have abnormal peroxisomal lipid metabolism, abnormalities occur in the formation of acrosome membranes or adhesion between membranes in sperms. In addition, we found that the cytoplasm remain partly during the morphology changes of sperm. Next, in the analysis of human sperm, we were able to discover a molecule that can be a marker for male infertility.

研究分野：生殖医学

キーワード：不妊症 男性不妊症 ペルオキシソーム 奇形精子

## 1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の原因としては造精機能障害が最も多い。また、造精機能障害の半数以上は突発性、つまり、原因不明である。造精機能障害の治療としては、拳児を得るために、状態の良い精子を見つけて人工授精、体外受精、顕微授精等の不妊治療を行う。しかし、造精機能そのものの治療に関して高い効果が期待される方法はまだ確立されていない。

これまでに申請者らは、ペルオキシソームの脂質代謝機能の低下を呈する Tysnd1 (Trypsin domain containing 1) 欠損マウスの表現型解析を行い、造精機能障害による雄性不妊を呈することを明らかにした。ペルオキシソームは、細胞内小器官の一つで、リン脂質の一種であるプラスマローゲン合成や超長鎖脂肪酸の代謝、分岐鎖脂肪酸の代謝などを担う。特にプラスマローゲンは、精子の先体膜に多く含まれており、先体反応時の先体内容物を放出しやすくする役割を持っている。これまでの国内外の研究で、ペルオキシソーム脂質代謝に関わる酵素の欠損マウスでは、造精機能障害による雄性不妊を呈することが知られている。

以上の背景から、本研究では、ペルオキシソームの機能異常と男性不妊症の発症機構について明らかにしようと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、造精機能障害を呈する男性不妊症のうち、ペルオキシソームの脂質代謝機能低下が原因で発症する症例とその発症メカニズムを明らかにし、診断や治療へ展開するための基盤を作ることを目的として研究を始めた。これまでに申請者らは、ペルオキシソームの脂質代謝機能の低下を呈する Tysnd1 (Trypsin domain containing 1) 欠損マウスの表現型解析を行い、造精機能障害による雄性不妊を呈することを明らかにした。しかし、ヒトの造精機能障害症例とペルオキシソームの脂質代謝機能との直接的な関連については明らかになっていない。そこで、本研究では、造精機能障害とペルオキシソーム機能について詳細に解析し、診断や治療法に役立てるところを目的とした。

## 3. 研究の方法

動物実験は、埼玉医科大学動物実験委員会より承認を得て行った。出来るだけ動物に苦痛を与えない実験方法を選択し、埼玉医科大学実験動物指針に従い実験を行った。Tysnd1 欠損マウスは雄性不妊のため、ヘテロマウス同士の交配により得た。精子形態の改善を目的としてプラスマローゲン前駆体の経口投与を行った。投与は、粉末飼料への混餌・自由摂食にて行った。妊孕性の確認は、C57BL/6J 雌マウスとの交配や体外受精によって検討をした。また、精巣および精巣上体を形態学的に解析するため、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

患者検体を用いた解析では、埼玉医科大学産婦人科の不妊症外来を受診する患者のうち、精液検査・体外受精等で精液の採取を必要とする患者の同意を得て精液検体を収集した。WHO の基準による精液の評価を顕微鏡下で行い、精液量・精子数・運動率・奇形率から造精機能障害の有無を判断した。WHO の基準をクリアした検体は、正常コントロール群とした。精子のプラスマローゲン測定は LC-MS/MS にて行った。

## 4. 研究成果

Tysnd1 欠損マウス精子は、ほぼ正常な精子と奇形精子が混在するが、頭部の丸い精子では先体を欠く。研究代表者らはこれまでの研究で、プラスマローゲン合成過程の異常で奇形精子を呈することを明らかにした。そこでプラスマローゲン前駆体の投与が奇形精子の改善に効果があるのではないかと考えた。Tysnd1 欠損マウスにプラスマローゲン前駆体を経口投与した結果、Tysnd1 欠損マウス精子の奇形精子で多くみられた先体の欠損が少なくなり、先体形成の改善に役立つことを明らかにした。プラスマローゲン前駆体の投与で精子形態の改善が出来たため、次に妊孕性について検討を行った。しかし、プラスマローゲン前駆体を投与した Tysnd1 欠損マウス雄と野生型雌を用いた自然交配では妊娠には至らなかった。そのため、光学顕微鏡的に一見正常に見える精子でも微細構造に何か異常があるのではないかと考え、形態学的にさらに詳細な解析を進めた。その結果、ほぼ正常な形態を持つ精子においても透過型電子顕微鏡による観察では、核と先体小胞の間に空間が見られ先体膜の形成または膜同士の接着に異常が起きていることがわかった。また、円形精子細胞から精子へと尾部を形成し形態変化する際には、ミトコンドリアなどの一部を残して細胞質の多くは除去されるが、Tysnd1 欠損マウスの精子では、細胞質が一部残ったままの精子が多く見られた。以上の結果から、プラスマローゲン前駆体の投与は先体形成における形態改善に役立つことが明らかになった。また、光学顕微鏡での観察で、一見正常な形態に見える精子においても微細構造に異常が見られるケースがあることがわかった。また、今回のプラスマローゲン前駆体投与の結果から、プラスマローゲン合成以外に

も精子形成におけるペルオキシソームの重要な役割があると考えられ、特に、精子形成における比較的后半の形態変化にかかわる部分にまだ明らかにされていないメカニズムがあるのではないかと考えられた。

次に、ヒト造精機能障害患者のペルオキシソーム機能を明らかにするため、ヒト精子に含まれるプラスマローゲンの分子種が、正常範囲の精子と正常範囲外の精子とで違いがあるかどうかについて解析を行った。SMAS（精子運動解析装置）を用いてコンピュータ的に正常範囲の検体と正常範囲外の検体の判別を行い、プラスマローゲン分子種に違いがあるかどうかの比較を行った。プラスマローゲンの各分子種は、コリン型およびエタノールアミン型および、sn-1位とsn-2位を構成する脂肪酸の種類について測定し分析した。その結果、精液検査で正常範囲の精子検体と比較して正常範囲外精子において有意に減少するプラスマローゲン分子種および、有意に上昇する分子種が見つかった。これらの分子種のうちの一つは、Tysnd1欠損マウスの精巣上体での解析で、野生型マウスと比較して有意に上昇するプラスマローゲン分子種と同一であった。

最後に、プラスマローゲン合成過程と一部共通の合成経路で生成されるリン脂質に着目し、LC-MS/MSにてマウス精巣のリン脂質を解析したところ、有意に発現変動する分子種を同定した。このリン脂質の精子形成との関連を明らかにすることで新たな知見が得られる可能性がある。

以上の結果から、本研究で同定した分子は、男性不妊症のマーカー因子などの開発に役立てられる可能性があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamaru Shunsuke, Kajihara Takeshi, Mizuno Yosuke, Mizuno Yumi, Tochigi Hideno, Ishihara Osumu	4. 巻 53
2. 論文標題 Endometrial microRNAs and their aberrant expression patterns	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00252-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 水野 由美, 梶原 健, 水野 洋介, 石原 理	4. 巻 36(2):
2. 論文標題 精子形成におけるペルオキシソームの役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Mammarian Ova Research	6. 最初と最後の頁 79-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamaru Shunsuke, Kajihara Takeshi, Mizuno Yumi, Takano Natsuko, Tochigi Hideno, Sato Tomomi, Ishihara Osamu	4. 巻 52
2. 論文標題 Heparin prevents oxidative stress-induced apoptosis in human decidualized endometrial stromal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 209 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-019-00220-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Naoki, Sato Tsuyoshi, Yumoto Megumi, Kokabu Shoichiro, Fukushima Yosuke, Kawata Yumiko, Kajihara Takeshi, Mizuno Yumi, Mizuno Yosuke, Kawakami Tetsuji, Kirita Tadaaki, Hayata Tadayoshi, Noda Masaki, Yoda Tetsuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Cyclic stretch induces decorin expression via yes-associated protein in tenocytes: A possible mechanism for hyperplasia in masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 175 ~ 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2018.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Machiko, Kajihara Takeshi, Mizuno Yumi, Sato Tomomi, Ishihara Osamu	4. 巻 17
2. 論文標題 Loss of high-mobility group N5 contributes to the promotion of human endometrial stromal cell decidualization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 493 ~ 499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栃木秀乃、山口哲、水野由美、田丸俊輔、水野洋介、梶原 健、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜脱落膜化過程を制御するmicroRNA の網羅的な探索とその機能解析
3. 学会等名 52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 智昭、難波 聡、片山 恵里、前田 ありさ、霞澤 匠、左 勝則、田丸 俊輔、水野 由美、水野 洋介、齋藤 恵、石原 理、大竹 明、亀井 良政
2. 発表標題 STR解析により全奇胎と部分奇胎の多胎妊娠と診断された胎児共存奇胎の1例.
3. 学会等名 第6回日本産科婦人科遺伝診療学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野由美, 水野洋介, 梶原 健, 石原 理
2. 発表標題 ペルオキシソーム機能の低下を示すTysnd1欠損マウスは細胞質残余を伴う奇形精子を呈する
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 健、水野由美、田丸俊輔、斎藤良平、佐藤 毅
2. 発表標題 細胞伸展（メカニカルストレッチ）は形態学的、生化学的にも子宮内膜脱落膜化過程を制御する
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田丸俊輔、水野由美、梶原 健、岸 美裕子、佐藤智美、小黒辰夫、石原 理
2. 発表標題 脱落膜化子宮内膜間質細胞における脂肪酸代謝調節機構の解明とオクタン酸の役割
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野由美、水野洋介、梶原 健、石原 理
2. 発表標題 ペルオキシソーム軽度脂質代謝異常マウスの雄性不妊発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第37回受精着床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山縣 洸、水野由美、梶原 健、栃木秀乃、田丸俊輔、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜脱落膜化細胞から分泌されるエクソソームの精製とその役割
3. 学会等名 第37回受精着床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 由美
2. 発表標題 ペルオキシソームの機能異常と精子
3. 学会等名 第59回日本卵子学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野由美, 水野洋介, 梶原 健, 石原 理
2. 発表標題 ペルオキシソームの軽度機能低下による表現型とその発症メカニズムについて
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野由美, 水野洋介, 梶原 健, 石原 理, 岡崎康司
2. 発表標題 Tysnd1欠損による造精機能障害はプラスマローゲン前駆体の投与で改善する
3. 学会等名 第15回RCGMフロンティアシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野由美, 仲地 豊, 水野洋介, 金田秀貴, 若菜茂晴, 岡崎康司
2. 発表標題 ペルオキシソームプロテアーゼTysnd1を欠損したマウスの病態発症機構の解明と改善への試み
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 産婦人科疾患の罹患可能性の判定を補助する方法、産婦人科疾患の罹患可能性を診断するためのデータを収集する方法、及び産婦人科疾患の診断用キット	発明者 水野由美、梶原 健、 田丸俊輔、三井智美、 栗崎智美	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-152478	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	水野 洋介  (Mizuno Yosuke)  (30406532)	埼玉医科大学・医学部・准教授    (32409)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	梶原 健  (Kajihara Takeshi)  (80286103)	埼玉医科大学・医学部・教授    (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------