

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390435

研究課題名（和文）男性不妊症の新たな検査法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel diagnostic method for male infertility

研究代表者

宮川 康（MIYAGAWA YASUSHI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70362704

研究成果の概要：新たな男性不妊症診断開発のために、我々が独自にクローニングした精子細胞特異的遺伝子を中心に、これらがコードする 14 の精巣タンパク質について 17 抗体を作成、準備し、男性不妊患者における精巣、精液の微量コード蛋白の検出を行った。17 抗体のうち 1 抗体のみ微量蛋白検出に優れ、無精子症患者の精巣におけるコードタンパク質検出と顕微鏡下精巣内精子採取術による精子検出成績に関連性が見出された。精液中の微量蛋白の検出は多くの抗体で不可能・不安定であった。今後、精子検出技術改善と精液への分泌蛋白などの新たなマーカー開発が望まれる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,200,000	2,160,000	7,200,000
2007 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	18,000,000	3,240,000	21,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：不妊症、生殖医療、少子化対策、遺伝子、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な分子生物学的手法ならびに遺伝子改変動物作成法などの技術進歩に伴い、これまでほとんど解明されていなかったほ乳類の精巣生殖細胞の分化に関わる様々な遺伝子が明らかにされ、解析されてきた。しかしながら、これまでの我が国や世界各国からの膨大な基礎的研究成果は臨床応用には結びついていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々がこれまでに独自に単離した

精巣生殖細胞特異的遺伝子のコードする蛋白質に対する抗体を用いて、男性不妊症の新たな検査法を開発するため、以下の 3 つの研究を進める。

(1) 我々が系統的に単離したマウス精細胞特異的遺伝子 80 種類について、それらのヒト相同遺伝子も段階的にクローニングし、そのコード蛋白に対する抗体作成を進めている。このうち様々な成熟段階のヒト精巣生殖細胞を特異的に認識できる抗体約 5 種類の作成に成功している。このようなヒトにおいて利

用できる抗体をさらに 10 種類以上増やし臨床応用を目指す。

(2)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採取術 (TESE) が行われているが、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、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採取成功予測は TESE 前の精巣生検とされているが、それとて感受性、特異性ともに 7 割程度である。この生検組織のサンプル中の精巣生殖細胞特異的蛋白の有無あるいは定量を行うことで精度の高い精子採取予測が可能になると考えられ、本研究において適正な抗体選択ならびにその臨床応用を目指す。

(3)精巣内精子採取予測の非侵襲的な検査法の開発をも目指す。我々の精巣生殖細胞特異的蛋白に対する抗体を用いて非閉塞性無精子症患者精液中の未熟生殖細胞検出を行ない、精巣内精子採取の予測を試みる。非閉塞性無精子症患者の精液中には精子は存在していないが、未熟生殖細胞が少量存在していることがあり、このような場合は精巣内精子採取率が高いとされている。しかし、これまでの検鏡やフローサイトメトリーによる未熟生殖細胞の検出には限界があり、結果として特異度がきわめて低い。特に、重症な無精子症では未熟生殖細胞数もわずかであり、我々の抗体を利用し、精巣生殖細胞特異的蛋白をウエスタンブロットや ELISA にて検出しごく微量の未熟生殖細胞の検出を行うことができれば、きわめて感受性・特異性の高い検査法が確立できる。

3. 研究の方法

(1)ヒト精子細胞特異的タンパク質に対するポリクローナル抗体作成

現在までに我々が新規にクローニングし、その解析を行っている精子細胞特異的に発現するタンパク質をコードする遺伝子について、リコンビナント蛋白を作成精製しウサギ、ラットへ免疫し、ポリクローナル抗体を作成。作成するヒト抗原を精度高く認識できる 5 種類 (CP-3、Haspin、Tektin-t、Scot-t、MP-68) のほかに、10 以上の抗体準備をめざす。また、その他に男性不妊症診断に有用と思われる既報の遺伝子について、抗体が他から入手が可能な場合、これを購入、譲受する。

(2)男性不妊患者の精液ならびに精巣生検顕微鏡下精巣精子抽出術 (microdissection TESE) は、手術用顕微鏡を用いて精巣全体をくまなく検索するものであり、これにより今まで絶対不妊とされ、原則的に精子形成がないとされたクライン

フェルター症候群、Sertoli cell-only syndrome などの疾患においても精巣内精子を回収可能な症例があり、さらに妊孕性の獲得まで示されたものもある。この結果、ヒト男性不妊症の診療において、絶対性不妊と確定診断するためには、顕微鏡下精巣精子抽出術 (MD-TESE) の施行が必須となった。申請者らは本邦でもっとも MD-TESE を数多く手がけており、無精子症患者 100 例以上の生検サンプル収集と精液サンプル収集を行う。

(3)ウエスタンブロットによる抗体検定作成済み抗体から順次、抗体の性能をウエスタンブロットで検定する。臨床サンプルを使用する前にまずリコンビナント蛋白で抗体価をしらべ、そのうち正常サンプル (精巣組織) を米国業者から購入し、抗体が機能することを確認してゆく。臨床応用できそうな優れた抗体については、ELISA測定キット化を検討する。

(4)ゲノムシーケンス解析

蛋白欠損患者について、同意のとれた患者からはゲノム DNA を血液から採取し、PCR で増幅後、ダイレクトシーケンス法でシーケンス解析し、ゲノムの欠失か、発現異常かを確定する。

4. 研究成果

(1)ヒト精子細胞特異的タンパク質に対するポリクローナル抗体作成

精子細胞特異的に発現するタンパク質をコードする遺伝子について、新たに 4 蛋白 7 抗体 (抗 MCA 抗体、抗 Gsg1 抗体、抗 Delta-20 抗体、抗 Smp-1 抗体 c/v1~v3) を自ら作成し、5 抗体 (抗 Septin4 抗体、抗 Septin7 抗体、抗 C21ORF51 抗体、抗 CXCL10 抗体、抗 MT-1H 抗体) を購入し、以下の精巣、精液におけるそれぞれの蛋白発現の確認実験に使用した。

(2)男性不妊患者の精液ならびに精巣生検精巣生検サンプルとして 50 例、精液サンプルとして 200 例以上の検体を収集した。

(3)ウエスタンブロットによる抗体検定作成・購入した抗体から順次、抗体の性能をウエスタンブロットで検定した。これまでの 17 の抗体がそれぞれのヒトタンパクに交差反応することを確認したが、特に抗 MCA 抗体が抗体価に優れていることが判明した。抗 MCA 抗体使用し精巣における MCA タンパク質検出と顕微鏡下精巣内精子採取術による精子採取成績を検討し、精子採取の予測に関して特異度 50%、感度 80%であることを確認した。また免疫染色を採取精子に対して行い、特異度が低い原因として MD-TESE 時の採取精子の形態による判定基準が関与していることが判明した。精液中の微量蛋白の検出は多

くの抗体で不可能・不安定であり、診断に利用することは不可能であったが、抗 CXCL10 抗体については不妊群の精液中タンパク発現量が変化していることを発見した。しかし、精巣内精子の有無との関連性は見いだせなかった。

(4) ゲノムシーケンス解析

MCA タンパクがウエスタンブロットにて認めない不妊患者について、ゲノムシーケンスでは塩基配列に異常を認めなかったが、MCA をはじめ3種類の遺伝子について、男性不妊特異的遺伝子変異をみいだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Irie S, Tsujimura A, Miyagawa Y, Ueda T, Matsuoka Y, Matsui Y, Okuyama A, Nishimune Y, Tanaka H. Single Nucleotide Polymorphisms in PRDM9 (MEISETZ) in Patients with Nonobstructive Azoospermia. **J Androl**. In press, 2009, 査読有
2. Tokuhiko K, Miyagawa Y, Tanaka H. Characterizing mouse male germ cell-specific actin capping protein alpha3 (CPalpha3): dynamic patterns of expression in testicular and epididymal sperm. **Asian J Androl**. 10, 711-8, 2008, 査読有
3. Tokuhiko K, Hirose M, Miyagawa Y, Tsujimura A, Irie S, Isotani A, Okabe M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Takeda K, Oshio S, Tainaka H, Tsuchida J, Okuyama A, Nishimune Y, Tanaka H. Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis. **J Biol Chem**. 283, 19039-48, 2008, 査読有
4. Komori K, Tsujimura A, Okamoto Y, Matsuoka Y, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Nonomura N, Okuyama A. Relationship between substances in seminal plasma and Acrobeads Test results. **Fertil Steril**. 91, 179-84, 2008, 査読有
5. Matsuoka Y, Miyagawa Y, Tokuhiko K, Kitamura K, Iguchi N, Maekawa M, Takahashi T, Tsujimura A, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y, Tanaka H. Isolation and characterization of the spermatid-specific Smrp1 gene encoding a novel manchette protein. **Mol Reprod Dev**. 75, 967-75, 2008, 査読有
6. Takada S, Tsujimura A, Ueda T, Matsuoka Y, Takao T, Miyagawa Y, Koga M, Takeyama M, Okamoto Y, Matsumiya K, Fujioka H, Nonomura N, Okuyama A. Androgen decline in patients with nonobstructive azoospermia after microdissection testicular sperm extraction. **Urology**. 72, 114-8, 2008, 査読有
7. 宮川 康, 辻村 晃, 高尾徹也, 岡本吉夫, 奥山明彦. 男性不妊症に対するマイクロサージェリー、顕微鏡下精巣内精子採取術. **臨床泌尿器科**. 91, 575-580, 2008, 査読無
8. 宮川 康, 辻村 晃, 奥山明彦. 男性不妊症と染色体異常: Klinefelter症候群・ロバートソン型転座. **Urology View**. 10, 72-76, 2008, 査読無
9. 辻村 晃, 宮川 康, 奥山明彦. 精子をめぐる最近の進歩 ARTにおける microdissection TESE. **産婦人科治療**. 96, 400-405, 2008, 査読無
10. 辻村 晃, 宮川 康. 男性不妊症に対する非内分泌療法. **Modern Physician**. 28, 584, 2008, 査読無
11. 辻村 晃, 松岡庸洋. Klinefelter症候群の妊孕性について. **Modern Physician**. 10, 939, 2008, 査読無
12. 辻村 晃. 生殖補助医療をめぐる諸問題 ARTにおける精子の評価. **産科と婦人科**. 75, 1236-1240, 2008, 査読無
13. Tokuhiko K, Miyagawa Y, Yamada S, Hirose M, Ohta H, Nishimune Y, Tanaka H. The 193-base pair Gsg2 (haspin) promoter region regulates germ cell-specific expression bidirectionally and synchronously. **Biol Reprod**. 76, 407-14, 2007, 査読有
14. Koga M, Tsujimura A, Takeyama M, Kiuchi H, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Fujioka H, Okamoto Y, Nonomura N, Okuyama A. Clinical comparison of successful and failed microdissection testicular sperm extraction in patients with nonmosaic Klinefelter syndrome. **Urology**. 70, 341-5, 2007, 査読有
15. Kita K, Watanabe T, Ohsaka K, Hayashi H, Kubota Y, Nagashima Y, Aoki I, Taniguchi H, Noce T, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Tanaka H, Ogura A, Ogawa T.

- Production of functional spermatids from mouse germline stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules. **Biol Reprod.** 76, 211-7, 2007, 査読有
16. Tsujimura A. Microdissection testicular sperm extraction: prediction, outcome, and complications. **Int J Urol.** 14, 883-9, 2007, 査読有
 17. Tanaka H, Hirose M, Tokuhiko K, Matsuoka Y, Miyagawa Y, Tsujimura A, Okuyama A, Nishimune Y. Single nucleotide polymorphisms: discovery of the genetic causes of male infertility. **Soc Reprod Fertil Suppl.** 65, 531-4, 2007, 査読無
 18. Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Okuyama A. Molecular biological features of male germ cell differentiation. **Reprod Med Biol.** 6, 1-9, 2007, 査読有
 19. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue S, Yonekawa H, Hayashi J. Mitochondria-related male infertility. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103, 15148-53, 2006, 査読有
 20. Tanaka H, Matsuoka Y, Onishi M, Kitamura K, Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A, Okuyama A, Nishimune Y. Expression profiles and single-nucleotide polymorphism analysis of human HANP1/H1T2 encoding a histone H1-like protein. **Int J Androl.** 29, 353-9, 2006, 査読有
 21. Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, Takada S, Nonomura N, Okuyama A. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. **Cancer Res.** 66, 11166-71, 2006, 査読有
 22. Tsujimura A, Miyagawa Y, Takao T, Takada S, Koga M, Takeyama M, Matsumiya K, Fujioka H, Okuyama A. Salvage microdissection testicular sperm extraction after failed conventional testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia. **J Urol.** 175, 15148-53, 2006, 査読有
 23. Nishimune Y, Tanaka H. Infertility caused by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes. **J Androl.** 27, 326-34, 2006, 査読有
 24. Tsujimura A, Fujita K, Komori K, Tanjapatkul P, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Sada M, Katsuyama Y, Ota M, Okuyama A. Associations of homologous RNA-binding motif gene on the X chromosome (RBMX) and its like sequence on chromosome 9 (RBMXL9) with non-obstructive azoospermia. **Asian J Androl.** 8, 213-8, 2006, 査読有
 25. Fraisl P, Tanaka H, Forss-Petter S, Lassmann H, Nishimune Y, Berger J. A novel mammalian bubblegum-related acyl-CoA synthetase restricted to testes and possibly involved in spermatogenesis. **Arch Biochem Biophys.** 451, 23-33, 2006, 査読有
 26. Tsuneoka M, Nishimune Y, Ohta K, Teye K, Tanaka H, Soejima M, Iida H, Inokuchi T, Kimura H, Koda Y. Expression of Mina53, a product of a Myc target gene in mouse testis. **Int J Androl.** 29, 323-30, 2006, 査読有
- [学会発表](計16件)
1. 宮川 康. シンポジウム: 加齢と生殖機能 男加齢の男性生殖機能への影響. 第53回日本生殖医学会総会・学術講演会, 2008年10月24日, 神戸市
 2. 辻村 晃, 宮川 康, 奥山明彦. 閉塞性無精子症を疑わせる非閉塞性無精子症に対するMD-TESEの検討. 第53回日本生殖医学会総会・学術講演会, 2008年10月23日, 神戸市
 3. 辻村 晃. 特別講演 非閉塞性無精子症に対する取り組み - 基礎と臨床 -. 第50回日本生殖医学会北海道地方部会学術講演会, 2008年10月23日, 神戸市
 4. 宮川 康. シンポジウム 男性不妊症患者における精巢生殖細胞特異的遺伝子SNP解析とその臨床応用. 第27回日本アンドロロジー学会, 2008年7月5日, 京都市
 5. 田中宏光. 精子細胞核Kinase Haspinのpromoterは排卵後の卵でタンパク質発現を誘導する. 文部科学省 科学研究補助金 特定領域研究「生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティクス」公開シンポジウム, 2007年12月15~16日, 東京都
 6. 辻村 晃. TESEを300例以上行った私の

- 手技とコツを大公開．男性不妊手術手技
フォーラム，第 52 回日本生殖医学会総
会・学術講演会，2007 年 10 月 27 日，秋
田市
7. 辻村 晃．男性不妊症、生殖医療指導医
認定試験講習．第 52 回日本生殖医学会
総会・学術講演会，2007 年 10 月 27 日，秋
田市
 8. 宮川 康．Sertoli cell only syndrome
に対する顕微鏡下精巣内精子採取術．第
52 回日本生殖医学会総会・学術講演会，
2007 年 10 月 26 日，秋田市
 9. 辻村 晃．シンポジウム 3「胚発生にお
ける精子の関与」精巣内精子を用いた体
外受精 - 胚発生への影響．第 52 回日本
生殖医学会総会・学術講演会，2007 年 10
月 26 日，秋田市
 10. 田中宏光．精子細胞特異的遺伝子群の解
析とその臨床応用．大阪大学 イノベ
ーションセンター 研究シーズ発表，2007
年 10 月 22～23 日，大阪府
 11. 徳弘圭造，宮川 康，辻村 晃，奥山 明彦，
田中宏光．マウス精子形成における
meichroacidin (MCA) の機能解析．日本
アンドロロジー学会第 26 回学術大会，
2007 年 7 月 6 日，千葉県
 12. 辻村 晃．ランチョンセミナー 妊孕性
を考えた性腺補充療法「低ゴナドトロピ
ン性男性性腺機能低下症の治療」．第 80
回日本内分泌学会，2007 年 6 月 14 日，東
京都
 13. Miyagawa Y. THE LEARNING CURVE IN
MICRODISSECTION TESTICULAR SPERM
EXTRACTION AND ITS IMPACT ON SPERM
RETRIEVAL RATE IN 200 CONSECUTIVE
CASES OF NON-OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA.
American Urological Association 102nd
Annual Meeting, 2007 年 5 月 19 日，
Anaheim, California in USA
 14. 宮川 康．顕微鏡下精巣内精子採取術に
おける学習曲線と精子回収率に関する検
討．第 95 回日本泌尿器科学会総会，2007
年 4 月 16 日，神戸市
 15. 宮川 康．ワークショップ「患者さんの
目線に立った生殖医療の最前線」無精子
症に対する MD-TESE: 最近の動向～精子回
収率予測と今後の課題～．第 95 回日本
泌尿器科学会総会，第 95 回日本泌尿器
科学会総会，2007 年 4 月 16 日，神戸市
 16. 辻村 晃．ケーススタディー 3
「Andrology・不妊・性機能」．第 95 回
日本泌尿器科学会総会，2007 年 4 月 16
日，神戸市

〔図書〕(計 2 件)

1. 辻村 晃、奥山明彦、東京大学出版会、
新編 精子学、2006、363 - 78
2. 辻村 晃、奥山明彦、金原出版、生殖医
療ガイドライン 2007、2007、252 - 55

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: ALDOA 遺伝子の SNP 診断及びその治療
法の選択

発明者: 辻村 晃

権利者: 国立大学法人 大阪大学

種類:

番号:

出願年月日: 21 年 1 月 28 日

国内外の別:

名称: PGAM4 遺伝子の SNP 診断及びその治療
法の選択

発明者: 辻村 晃

権利者: 国立大学法人 大阪大学

種類:

番号:

出願年月日: 21 年 1 月 28 日

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 康 (MIYAGAWA YASUSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 70362704

(2) 研究分担者

辻村 晃 (TSIJIMURA AKIRA)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 40294053

奥山 明彦 (OKUYAMA AKIHIKO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 20093388

(3) 連携研究者

田中 宏光 (TANAKA HIROMITU)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号: 10263310