

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09665

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた雄性不妊症発症の分子細胞学的解明と臨床への応用

研究課題名(英文) Molecular cytological clarification of pathogenesis of male infertility by analyzing genetically modified animals and its clinical application

研究代表者

伊藤 千鶴 (Ito, Chizuru)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80347054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では遺伝子改変マウスを作製解析することによって、中心体関連分子ODF2をコードするOdf2遺伝子を欠損した雄マウスは、ハプロ不全により精子頭部離断が生じることによって雄性不妊となるが、その離断頭部は生存しており顕微受精によって治療できることを明らかにし論文発表した(Ito et al, Sci.Rep.,2019)。Odf4遺伝子欠損マウスの精子は、余剰細胞質を除去することができないために屈曲変形し、そのために運動障害が起こり卵子と受精できずに雄性不妊が起こることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭部離断精子(DDS)は死滅と診断され治療に使われないが、Odf2遺伝子のハプロ不全が原因のDDSは、精子頭部-中間部間で断裂する新しく発見したタイプのDDSであり顕微受精によって治療できる。ヒトにおいてOdf2-DDSが診断できれば、離断した精子を使うことで治療の道が開けることを明らかにした。Odf4遺伝子欠損マウスの精子は、不妊患者でもよく観察される尾部の屈曲変形(ヘアピン鞭毛)を示す。現在、屈曲変形の生じる詳細なメカニズムを解析中であり、その情報は生殖補助医療に活用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Odf2 haploinsufficiency induces sperm neck-midpiece separation, a new type of decapitated and decaudated spermatozoa (DDS). DDS is untreatable in reproductive medicine. The headnecks of ODF2-DDS spermatozoa are, however, alive and capable of producing offspring by intracytoplasmic headneck sperm injection (ICSI). ICSI in humans, using headneck sperm cells, is viable and could be an alternative for infertile patients suffering from Odf2-DDS (Ito et al, Sci. Rep.,2019). Odf4 knockout male mice are infertile. Their spermatozoa progress backward and fail to ascend in the uterus owing to bent (hairpin) flagellum caused by failure to remove huge residual cytoplasmic droplets. Bent flagellum is one of the most common disorders in sperm shaping and movement in male infertile patients. Our further study will open a new window to understanding the mechanism of bent flagellum and its medical treatment.

研究分野：生殖生物学

キーワード：男性不妊症 遺伝子改変マウス 遺伝子欠損雄性不妊モデルマウス 中心体関連タンパク質 ODF2 DDS
-頭部離断精子 ODF4 ヘアピン鞭毛精子

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不妊症の約半分は男性に起因するため、正確な精子機能検査は不妊症の診断と治療に必須である。私たちはヒト精子タンパク質をコードする遺伝子改変マウス、特に遺伝子欠損 (KO) 不妊症モデルマウスを用いて、(1)精子卵子膜接着/融合経路には既知の Izumo1 経路以外に EQUATORIN (エクアトリン) 経路があることを論文発表 (Ito *et al.*, *Reproduction* 2018) し、(2)中心体関連分子としても知られている精子外側粗大線維に局在するタンパク質 ODF2 が欠損すると、精子頸部と中間部の離断 (従来の報告は精子頸部と頸部の離断) により不妊が起こることを発見している。さらに、(3)ODF4 が欠損すると、精子鞭毛変形により直進運動障害が起こり不妊になることを発見し、これらの KO マウスの不妊発症のメカニズムと関連分子群を分子細胞学的に早急に解明する必要性が生まれた。研究で用いる全ての遺伝子改変マウスは独自に作製したものであり、研究から得られた新しい情報は精子と生殖現象に関する基礎データを提供するだけでなく、生殖医療の臨床応用へと発展する可能性があると考えた。また、電子顕微鏡解析や遺伝子改変動物作製の技術を用いて学内外の研究を支援することが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、中心体関連タンパク質 ODF2 および鞭毛運動と形態に関与するタンパク質 ODF4 の詳細な性状と関連分子との相互作用を明らかにし、受精に必要な分子機構を解明することを目的とした。具体的には、【1】生化学的手法や蛍光抗体法、電子顕微鏡的解析により Odf2-KO 精子の詳細な解析を行い ODF2 の機能を解明し、【2】Odf4-KO 精子の詳細な解析と Odf4-EGFP transgenic (Tg) mouse を作製して Odf4 の局在解明と rescue mouse を作製し、ODF4 の受精における役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

【1】Odf2-KO 精子の解析

(1) Odf2-KO 精子の尾部に局在する主要タンパク質を見る

① 6% Urea または RIPA buffer を用いてタンパク質を抽出し泳動後、ODF1, Speriolin, Tektin4, AK-1, Septin7, PHGpX, に対する抗体を用いて western blot を行った。

② Odf2-KO 精子を 0.1% TritonX-100 処理後に、抗 Speriolin 抗体や γ Tubulin 抗体を用いて蛍光顕微鏡にて観察し、精子中心体の局在を確認した。

(2) Odf2-KO 精子の生存の確認

① 死細胞を染色する Propidium iodide (PI) と Hoechst 33258 で処理した後、蛍光顕微鏡で死細胞と生細胞の数を数えて割合を求めた。

② 離断頭部の先体反応の確認

CO₂ インキュベーターで培養後、抗エクアトリン抗体を用いて先体反応の経過を観察した。

③ 離断尾部の capacitation の確認

CO₂ インキュベーターで培養した精子を SDS サンプルバッファーで溶解し泳動後、抗 Phosphotyrosin 抗体を用いて western blot を行った。

④ 離断頭部と離断尾部の詳細な性状観察

Cryo-STEM (scanning transmission electron microscope) を用いて Odf2-KO 精子頭部の頸部と尾部に見られる突起部の詳細構造を解析した。

⑤ Odf2-KO 精子頭部の妊孕性の確認

Odf2-KO 精子頭部を野生型卵に ICSI により受精させ産仔が得られるか確認した。

【2】Odf4-KO 精子の解析

(1) Odf4-EGFP Tg マウスを用いた ODF4 解析

① Odf4-EGFP Tg マウスの作製及び ODF4 局在解析

カルメジンプロモーターを持つ Odf4-EGFP ベクターを作製し、B6 系のマウス卵にインジェクションして Odf4-EGFP Tg マウスを作製した。精巢上体尾部より採取した精子を無処理で蛍光顕微鏡にて ODF4 の局在を解析した。さらに、抗 GFP 抗体を用いて免疫電顕的解析を行った。また、Odf4-EGFP-Odf2-mCherry ダブル Tg マウスを作製し、ODF4 と ODF2 の局在の違いを蛍光顕微鏡にて解析した。

② Odf4-KO (Eqtn-EGFP) ダブル Tg マウス (先体が光るため子宮壁や卵管壁の外側から精子の位置が観察できる) を作製し、野生型雌マウスと交尾させた後、子宮から卵管へと移動する精子を *in vivo* で蛍光顕微鏡にて撮影し運動能力を解析した。

(2) Odf4-KO 精子を用いた ODF4 解析

① Odf4-KO 精子の尾部に局在する主要タンパク質を見るために、6% Urea または RIPA buffer を用いてタンパク質を抽出し泳動後、ODF1, 2, TEKTN4, SEPTIN4, 7, SLC22A14, GAODHS 等に対する抗体を用いて western blot を行った。

② 尾部形態異常がいつ生じるのかを確認するために、Odf4-KO 精子を精巢上体頭, 体, 尾から 3 個体以上かつ 200 匹以上ずつ回収してその形態を野生型精子と比較解析した。また、余剰細胞質

除去不全の原因を解析するために、精子尾部に局在するアクアポリン4と8をwestern blotにて野性型精子と比較した。

③ Odf4-KO精子の屈曲と培地の浸透圧の関係を解析するために、3個体以上の精子を150(血漿の半分の浸透圧)、310(血漿の浸透圧に近似)、380(子宮内の浸透圧)、440 mOsm/kgH₂OのTYH培地に入れてそれぞれ200匹以上を野性型精子の形態と比較解析した。

(3) Odf4-KOレスキューマウスの作製とその解析

Odf4-KO雌マウスとOdf4-EGFP Tg雄マウスを交配させてOdf4-KOレスキューマウスを作製した。レスキューマウスを用いて運動性と形態、妊孕性等の解析を行った。

4. 研究成果

【1】Odf2-KO精子の解析

(1) ①Odf2-KOヘテロ精子では、ODF2タンパク質が野生型の6割程度に減少していた。一方、精子尾部に局在する主要なタンパク質は野生型と異ならなかった。②精子中心体は、離断した頭部側の突起部に局在することがわかった。これは通常の離断精子が尾部側に中心体が局在することと異なった。(2) ①離断頭部の75%はPI陰性かつHoechst陰性であり細胞膜が保たれていることが判った。TYH培地培養にて②離断頭部は先体反応を起こし、③離断頭部はcapacitationを起こすことが判った。④Z-stack画像により離断頭部の頸部離断部の細胞質は完全に保たれていることが判った。⑤Odf2-KO雄はICSIにより産仔が得られることが証明できた。

Decapitated and decaudated spermatozoa (DDS)は精子の頭尾離断のために卵子と受精できず男性不妊を起こす原因の一つであり、ヒトやウシ等で報告されている。本研究では先行する研究課題を引き継ぎ、Odf2遺伝子欠損ヘテロ雄マウスを解析し、Odf2ハプロ不全によりDDSが発症することを明らかにした。さらに、Odf2-DDSは頭尾が離断しているにもかかわらず生存しておりかつ頭側に中心子が存在していることを証明し、精子頭部を卵子の細胞質に注入する治療法(ICSI)により産仔が得られることを明らかにした。従来のDDSは臨床的には死んだ精子と見なされるため生殖補助治療には使用されない。Odf2ハプロ不全が原因で起こるDDSの診断がつけられた場合は射出精子により治療ができることから、患者の負担軽減が期待できると考えられる (Sci Rep.9:14249.2019に発表)。

【2】Odf4-KO精子の解析

(1) ①Odf4-EGFP Tgマウスの精子および精巣を用いてOdf4の局在を蛍光顕微鏡、免疫電顕等にて解析した。Odf4-EGFP-Odf2-mCherryダブルTg精子解析により、ODF4は外側粗大線維に局在するODF2よりも広範囲に局在しODF2とは異なった機能を持つことが示唆された。②Odf4-KO精子は子宮腔内を上行できず卵管膨大部まで到達することができないため、不妊を生じることが判った。(2) ①Odf4-KO精子は、ODF4を欠如するがそれ以外の主要な尾部タンパク質は野生型と同様に存在することが判った。②野性型精子では精巣上体内を頭、体、尾と移動するにつれて伸長する精子が増加するのに対して、Odf4-KO精子では屈曲する精子が増えることが判った。その際、余剰細胞質の残存が尾部屈曲異常に関与していることが明らかになった。Odf4-KO精子にはアクアポリンは正常に存在し、Odf4-KO精子の細胞質残余にはアクアポリンは関与しないことが判った。③Odf4-KO精子の屈曲は培地の浸透圧とは無関係であることが判った。(3) Odf4-KOレスキュー精子は運動性、形態、妊孕性等全てにおいて野生型と差異がなく回復が見られた。

本研究により、ODF4欠如によって精子尾部屈曲異常が起こり運動障害により男性不妊を呈することが判った。ODF4と免疫沈降する分子は既に解明しているため引き続き解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Saito T, Terajima M, Taga Y, Hayashi F, Oshima S, Kasamatsu A, Okubo Y, Ito C, Toshimori K, Sunohara M, Tanzawa H, Uzawa K, Yamauchi M	4. 巻 154
2. 論文標題 Decrease of lysyl hydroxylase 2 activity causes abnormal collagen molecular phenotypes, defective mineralization and compromised mechanical properties of bone	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cyto.2021.116242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe E, Akamatsu T, Ohmori M, Kato M, Takeuchi N, Ishiwada N, Nishimura R, Hishiki H, Fujimura L, Ito C, Hatano M	4. 巻 149
2. 論文標題 Recombinant thrombomodulin attenuates hyper-inflammation and glycocalyx damage in a murine model of Streptococcus pneumoniae-induced sepsis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 155723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cyto.2021.155723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okitsu Y, Nagano M, Yamagata T, Ito C, Toshimori K, Dohra H, Fujii W, Yogo K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dlec1 is required for spermatogenesis and male fertility in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75957-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamatoya K, Kousaka M, Ito C, Nakata K, Hatano M, Araki Y, Toshimori K.	4. 巻 102
2. 論文標題 Cleavage of SPACA1 regulates assembly of sperm-egg membrane fusion machinery in mature spermatozoa.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Reprod.	6. 最初と最後の頁 750-757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioz223.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito M, Tatsumi T, Nakasuji T, Ibayashi M, Harada T, Mutoh T, Ito C, Komiya A, Hiraoka K, Kawai K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Successful pregnancy and delivery achieved following intracytoplasmic sperm injection using teratozoospermic sperm exhibiting marked dysplasia of the fibrous sheath: a case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Androl Urol.	6. 最初と最後の頁 800-806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tau.2019.12.14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito C, Akutsu H, Yao R, Yoshida K, Yamatoya K, Mutoh T, Makino T, Aoyama K, Ishikawa H, Kunimoto K, Tsukita S, Noda T, Kikkawa M, Toshimori K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decaudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 14249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50516-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai K, Ito C, Wakabayashi M, Kanzaki S, Ito T, Takada S, Toshimori K, Sekita Y, Kimura T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Usp26 mutation in mice leads to defective spermatogenesis depending on genetic background.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50318-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoh K, Kondoh G, Miyachi H, Sugai M, Kaneko Y, Kitano S, Watanabe H, Maeda R, Imura A, Liu Y, Ito C, Itohara S, Toshimori K, Fujita J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm maturation in vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 eaao7232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aao7232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasamatsu A, Uzawa K, Hayashi F, Kita A, Okubo Y, Saito T, Kimura Y, Miyamoto I, Oka N, Shiiba M, Ito C, Toshimori K, Miki T, Yamauchi M, Tanzawa H.	4. 巻 512
2. 論文標題 Deficiency of lysyl hydroxylase 2 in mice causes systemic endoplasmic reticulum stress leading to early embryonic lethality.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 486-491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toshimori K, Ito C.	4. 巻 36
2. 論文標題 Function of the sperm acrosomal EQUATORIN protein analyzed using genetically modified mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Mamm Ova Res.	6. 最初と最後の頁 71-77
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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ito C, Akutsu H, Yoshida K, Yamatoya K, Mutoh T, Aoyama K, Ishikawa H, Kunimoto K, Tsukita S, Noda T, Kikkawa M, Toshimori K
2. 発表標題 Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice.
3. 学会等名 Proceedings of the 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井皓平、伊藤千鶴、若林美月、神崎理子、伊藤駿瑛、高田修治、年森清隆、関田洋一、木村透
2. 発表標題 Usp26欠損マウスにおける遺伝的背景に依存した精子形成異常
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤千鶴、年森清隆
2. 発表標題 Odf2-DDS (decapitated and decaudated spermatozoa)の原因はOdf2ハプロ不全である
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 年森清隆、伊藤千鶴
2. 発表標題 新しいdecapitated and decaudated spermatozoa (DDS), Odf2の発見
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito C, Toshimori K.
2. 発表標題 Role of the acrosome membrane protein, Equatorin in fertilization.
3. 学会等名 The 19th Congress of the International Federation of Association of Anatomists (IFAA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshimori K, Ito C.
2. 発表標題 EQUATORIN/SPESP1-double knockout mice reduce male fertility with aberrant behavior of IZUM01.
3. 学会等名 The 19th Congress of the International Federation of Association of Anatomists (IFAA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤雅人、辰巳嵩征、中筋貴史、伊林恵美、原田竜也、武藤透、伊藤千鶴、小宮頭、平岡謙一郎、川井清考
2. 発表標題 尾部形態異常精子を使用した顕微授精により分娩に至った一例
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤千鶴、年森清隆
2. 発表標題 抗先体後部鞘抗体MN13を使った新しい精子機能評価法
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 年森清隆、伊藤千鶴、大和屋健二、吉田恵一、藤村理紗、幡野雅彦、宮戸健二
2. 発表標題 抗先体後部鞘抗体EQUATORIN / SPESP1 ダブルノックアウト雄マウスの妊孕能力の減少
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 年森清隆、伊藤千鶴、若山友彦、(内山安男、相磯貞和 監訳)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 1006
3. 書名 Ross組織学 原著第7版 (Histology. A text and atlas, with correlated cell and molecular biology. seventh edition.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学医学研究院 機能形態学HP
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/anat2/>
 千葉大学医学研究院 機能形態学
<https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/anat2/>
 Odf2遺伝子欠損によるマウス不妊症を世界で初めて発見し治療に成功 ヒトでの応用に期待
<http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2019/20191018idenshi.pdf>
 世界初、Odf2遺伝子欠損による不妊症をマウスで発見、治療に成功-千葉大
<http://www.qlifepro.com/news/20191023/odf2-gene-deficiency.html>
 Odf2遺 伝子欠損によるマウス不妊症発見 千葉大など治療、妊娠・出産に成功 Scientific News 科学新聞 2019年11月1日 第3751号

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	武藤 透 (Mutoh Tohru) (30422265)	千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員 (12501)	

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