

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09815

研究課題名(和文)セロトニンによる新たな男性不妊治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel treatment for male infertility by using Serotonin

研究代表者

柴原 浩章 (Shibahara, Hiroaki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80206143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト凍結精子を融解しswim-up法の精子を用い、100mM濃度で5-HT (5-hydroxytryptamine, セロトニン)を添加した。経時的に精子を回収し精子運動解析装置システム運動率などを測定した。いずれのパラメータにおいても有意な変化は見られなかった。次に5HT受容体に着目し、蛍光抗体法にて局在を調べ3種のレセプターが精子に存在することが明らかになった。5HT受容体のインヒビター添加実験により5HT2A、5HT4、5HT6がヒト精子の運動率を低下させることが明らかになった。5HTの添加により運動率の上昇等の変化は認められなかったが、インヒビターの添加により抑制作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

5-HT(5-hydroxytryptamine, セロトニン)は、必須アミノ酸であるトリプトファンから合成され、脳内の神経伝達物質としてよく知られている。5-HTはヒトの精子において受容体を介して作用し、精子運動解析装置システムでの観察研究により、精子運動性への影響があるという結果を得た。今後、男性不妊治療の1つとして5-HTに関係する治療に有用となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Human frozen sperm were thawed, and highly motile sperm were used by the swim-up method, and 5-HT was added at a concentration of 100 mM. Sperm were collected over time and parameters such as motility were measured using a sperm motility analyzer system. No significant changes were observed in any of the parameters. Next, we focused on 5HT receptors and examined their localization by fluorescent antibody method, and found that three types of receptors exist in sperm. 5HT2A, 5HT4, and 5HT6 were found to decrease the motility rate of human sperm by adding 5HT receptor inhibitors. No increase in motility or other changes were observed, but inhibitory effects were observed with the addition of the inhibitor.

研究分野：不妊症

キーワード：生殖医療 男性不妊 精子 セロトニン 受精 SMAS 精子パラメーター

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精子は受精する能力を獲得したあとに卵と受精する。射出された精子は、受精する能力を持っておらず射出後から精子の鞭毛運動様式を変える変化(超活性化)や先体反応によって受精能力を持ち、これらは卵管内の物質により制御される。

卵管内に 5-HT(5-hydroxytryptamine, セロトニン)が存在することが知られている。5-HT は主に神経伝脱物質として、脳機能や腸管運動に関わっている。5-HT は受容体を介して作用し、約 14 種類の受容体があると報告されている。生殖系では 5-HT が精子運動速度に影響を及ぼすことが報告され、どの 5-HT 受容体に関わっているのか、5-HT の濃度をかえて添加すると精子にどのように影響していくのかを精子運動などの精子運動解析装置システムによるパラメータで数値化して調べ、どのように作用するのかを検討する。シリアンハムスターの精子における超活性化と先体反応は、共に 5-HT により 5-HT₂ 受容体と 5-HT₄ 受容体を介して調節されることが報告されている。ヒトの精子においては、5-HT₁ 受容体、5-HT₂ 受容体、および 5-HT₃ 受容体があり、5-HT の添加によっていずれかの受容体を介して精子の運動速度が上昇することが報告されている。既に我々は、マウス精子において、超活性化の促進には 5-HT₂、5-HT₃、5-HT₄、5-HT₇ 受容体に関わっているという成果を得ている。

従って 5-HT は超活性化をも含む精子の運動性を調節すると考えられるが、その調節機構はこれまで詳細に解明されてはいない。

2. 研究の目的

本研究では、5-HT によるヒト精子の超活性化の調節機構につき手動もしくは CASA (computer-aided sperm analysis) を使用して検討し、男性不妊治療の 1 つとしてセロトニンが有用となればと考えている。さらに、5-HT のヒト精子(凍結精子および新鮮精子を含む)運動性に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)【研究対象者の選定方針】

- ・精液はインフォームドコンセントを得て提供に承諾した成人男性から提供を受ける。
- ・提供試料は患者(無精子症でない男性不妊症)、成人男性の精液とする。

(2)【方法・手順】

(2) - .【サンプル調整】

・提供された精液は室温(23~25℃)で60分間液化し、グリセロールとヒト血清アルブミン(HSA)と Arctic Sperm Cryopreservation Medium を 3:1 で混合し、液体窒素中で -196℃ に凍結保存する。凍結精子を 37℃ のインキュベーターで解凍または新鮮精子を使用し、Multipurpose Handling Medium-Complete (MHM-C) を用いて室温でサンプルを調製する。

(2) - .【免疫染色法】

- ・精液サンプルに 6 mL の MHM-C を加え、遠心分離を行い、精漿を除く。
- ・この精子を MHM-C 中で 60 分間泳動処理する。
- ・泳動処理した精子を回収し、さらに遠心分離を行う。
- ・上清を捨て、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し、ボルテックスで 10 秒間攪拌する。スライドを EzBlock Chemi 液で 1 時間ブロッキングし、非特異反応を減少させる。
- ・PBS で異なる濃度に希釈した以下の一次抗体とともに、4℃ の加湿ボックス内で 24 時間インキュベートする。
- ・一次抗体には抗トリプトファンヒドロキシラーゼポリクローナル羊 IgG、抗 5-HT_{1B} ポリクローナルウサギ IgG、抗 5-HT_{2A} ポリクローナルウサギ IgG、抗 5-HT_{3A} ポリクローナルウサギ IgG、抗 5-HT₄ ポリクローナルウサギ IgG、抗 5-HT_{5A} ポリクローナルウサギ IgG、抗 5-HT₆ ポリクローナルウサギ IgG、抗 5-HT₇ ポリクローナルウサギ IgG を使用する。
- ・スライドを PBS で 5 分間 3 回洗浄し、EzBlock Chemi 溶液で希釈したフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識二次抗体(Alexa Fluor)とともに室温で 1 時間インキュベーションを行う。核は 4',6'-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)で染色する。
- ・精子を蛍光顕微鏡 BX53 下で観察する。

(2) - .【5-HT, 5-HT 受容体作動薬, 5-HT 受容体拮抗薬などの試薬添加による影響を CASA で計測】

- ・調整したサンプルの精子の懸濁液に試薬を添加する。
- ・試薬は 100 μM の濃度で用いる。
- ・Sperm Motility Analysis System (CASA) を用いて記録する。
- ・試薬は 5-HT 塩酸塩、5-HT 受容体作動薬・拮抗薬、5-HT_{1B} 受容体作動薬・拮抗薬、5-HT_{2A} 受

容体作動薬・拮抗薬、5-HT3 受容体作動薬・拮抗薬、5-HT4 受容体作動薬・拮抗薬、5-HT6 受容体作動薬・拮抗薬および5-HT7 受容体作動薬・拮抗薬を使用する。

・溶媒には蒸留水およびジメチルスルホキシドを使用する。

(3).【統計解析の方法】

・得られた情報を excel に入力し、ノンパラメトリック検定の Kruskal-wallis 法,post-hoc で Steel-Dwass 検定などを用いて EZR 統計解析をする。

(4).【主要評価項目・副次的評価項目及び評価方法】

・主要評価項目：精子運動率、超活性化率（直線速度、曲線速度、平均速度）

・CASA による測定：WHO 基準の各種パラメータのうち 8 項目

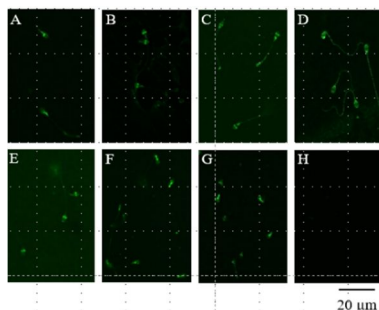
（精子運動率、直線速度、曲線速度、平均速度、直進性、直線性、頭部振幅、頭部振動数）

・副次評価項目：精漿中のセロトニン濃度、精子の受容体タイプ別免疫蛍光染色局在、精子セロトニン産生機構

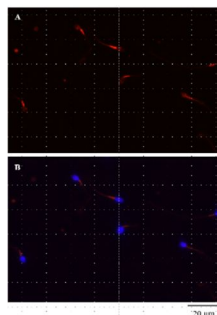
4. 研究成果

2021 年の卵子学会、受精着床学会総会でヒト精子において様々な部位の複数の 5-HT レセプターが免疫蛍光染色法で検出されたことを発表した。ヒト精子におけるヒト精子の頸部領域では 5-HT1B(A)、5-HT4(D)、5-HT6(F)、5-HT7(G)に、赤道領域では 5-HT2A(B)、5-HT3A(C)、5-HT5A(E)に免疫蛍光染色法で陽性染色が見られた。従来の研究ではヒト精子における受容体の同定は 5-HT1,5-HT2,5-HT3 であり、我々は 5-HT 受容体のうち 7 種類を免疫蛍光染色法で同定した(図 1:(H)はコントロール)。また、5-HT 産生にはトリプトファン水酸化酵素(TPH)が関わる。2022 年関西アンドロロジー学会で抗 TPH1 抗体は主に middle piece 領域に免疫蛍光染色法で陽性反応したことを発表した。これはヒト精子にセロトニン産生機構が存在する可能性を示唆しており今後さらなる検討を要する(図 2:A に示す。B は DAPI とのマージ画像)。次に、精子運動に対する 5-HT 受容体拮抗薬の効果について検討したところ、5-HT2A 拮抗薬は、精子に添加してから 1 時間および 2 時間で精子運動率を著しく低下させた(図 3:n = 9; 精子運動一元配置分散分析:P = 0.0347 [< 0.05], Steel.Dwass.)、5-HT2A: P = 0.1768, 5-HT6: P = 0.2910)。これらの結果から、ヒト精子に 5-HT 受容体の複数のレセプターの発現を認め、その精子上の局在は異なることを示した。CASA での解析では 5-HT 受容体拮抗薬の添加において精子運動率の低下が観察された。今後、5-HT 塩酸塩での添加や 5-HT 受容体作動薬の各サブタイプでの運動性に及ぼす影響と精子セロトニン産生機構の可能性を検討する必要がある。

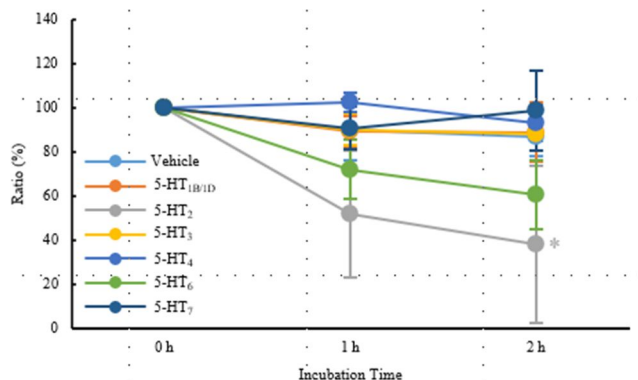
(図 1)



(図 2)



(図 3)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 表摩耶, 長谷川昭子, 赤田日向子, 杉山由希子, 脇本裕, 藤ノ木政勝, 柴原浩章 |
| 2. 発表標題 ヒト精子におけるセロトニン(5-HT)レセプターの発現について |
| 3. 学会等名 第62回日本卵子学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 表摩耶, 長谷川昭子, 赤田日向子, 杉山由希子, 脇本裕, 藤ノ木政勝, 柴原浩章 |
| 2. 発表標題 ヒト精子におけるセロトニン(5-HT)の作用について |
| 3. 学会等名 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 表摩耶, 長谷川昭子, 赤田日向子, 杉山由希子, 脇本裕, 藤ノ木政勝, 柴原浩章 |
| 2. 発表標題 ヒト精子の運動に対するセロトニン(5-HT)の影響 |
| 3. 学会等名 第10回関西生殖集談会・第54回関西アンドロロジーカンファレンス合同研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 | 杉山 由希子 (Sugiyama Yukiko) (70847384) | 兵庫医科大学・医学部・非常勤講師 (34519) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|