

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07015

研究課題名(和文) 未活性型精子を標的とした新規不妊治療法の開発

研究課題名(英文) New strategy of infertility treatment by regulating sperm functions

研究代表者

竹尾 透 (Takeo, Toru)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：10517014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精子と卵子が出会う受精過程における障害(受精阻害因子)の解析を行うことで、受精阻害因子の解明と受精機能を高める新規技術の開発に取り組んだ。その結果、受精阻害因子のin vitroにおける機能解析を行い、安定して受精阻害が生じる条件を決定した。また、マイクロ流体デバイスを用いて精子を選別することで、受精率が高まることも明らかにした。さらに、卵管内において受精しやすい時期(受精適期)があり、精子と卵子が遭遇する時期を同調させることで受精効率が高まることを明らかにした。さらに、リン脂質指向型の環状オリゴ糖が体外受精における受精率の向上に有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、受精効率を高める精子の選別技術の開発、生体内における受精効率の改善、体外受精における受精率を高める新規化合物を発見し、生殖科学の進展に資する知見が得られた。また、本研究の知見を応用することで、生殖医療、家畜や産業動物の繁殖、絶滅危惧動物の保護に有用な基礎的知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The research aims to elucidate the fertilization inhibitory factors and develop new technology to enhance fertilization function. We found that sperm sorting using a microfluidic device enhances the fertilization rate. Furthermore, analysis of the in vivo fertilization environment revealed that there is an optimal time for fertilization in the fallopian tubes, and that fertilization efficiency is increased by synchronizing the time when sperm and egg encounter each other. This year, we demonstrated that the removal of phospholipids is effective in improving sperm fertilization efficiency, and that phospholipid-directed cyclic oligosaccharides (cyclodextrins) are effective in improving the fertilization rate in IVF. In summary, we developed a sperm sorting technique to improve fertilization efficiency, improved in vivo fertilization efficiency, and discovered new compounds that increase the fertilization rate in in vitro fertilization.

研究分野：薬学、生殖工学、実験動物学

キーワード：不妊症 受精阻害因子 マイクロ流体デバイス 精子選別 体外受精 受精適期 リン脂質 シクロデキストリン

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。

## 1. 研究開始当初の背景

不妊症は、妊娠を望むカップルが1年以上の不妊期間がある状態と定義され、急速な人口減少が課題となる本邦において解決すべき重要な疾患の一つである。これまでに私たちは、受精能を向上させる各種化合物を発見しており、受精率を高める体外受精技術を開発している。受精技術の更なる向上には、生殖科学を推進し、不妊の原因となる生殖過程の解明や課題を克服する技術開発が必要である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、生殖科学研究において最も使用されているマウスの精子および卵子を実験に供し、精子と卵子が会う受精過程における障害(受精阻害因子)の解析により、受精阻害因子の解明と受精機能を高める新規生殖工学技術を開発することで、不妊治療に資する基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

精子集団における受精能の違いを明らかにするために、マイクロ流体デバイスを用いて先体反応を起こしている精子を分取し、体外受精により受精率を評価した。先体反応は、精子前培養液中で培養し、培養後の精子を蛍光色素が結合したPNAにより染色することで評価した。

次に、卵管内における受精しやすい時期を明らかにするために、排卵時期を調べ、排卵と交配のタイミングが生体内における受精率に及ぼす影響を調べた。過剰排卵誘起では、ウマ柔毛性性腺刺激ホルモンとインヒピン抗血清の合剤を雌マウスに投与し、48時間後にヒト柔毛性性腺刺激ホルモンを投与した。ヒト柔毛性性腺刺激ホルモン投与後、経時的に排卵を確認することで、排卵時間を決定した。

さらに、精子の受精阻害因子となる可能性がある生体膜成分を化合物により除去することで、体外受精における受精率を改善できるか検討した。本実験では、コレステロールを除去する物質としてメチル-β-シクロデキストリン、ウシ血清アルブミン、リン脂質を除去する物質としてジメチル-β-シクロデキストリンを使用した。

## 4. 研究成果

マイクロ流体デバイスを用いて先体反応を起こした精子を選別することで、体外受精における受精率が高まることも明らかにした。これまで運動性を維持したままマウス精子を蛍光蛍光標識して分取することが困難であったが、本技術を応用することで先体反応を起こした精子以外についても、分取および解析が可能となった(図1)。

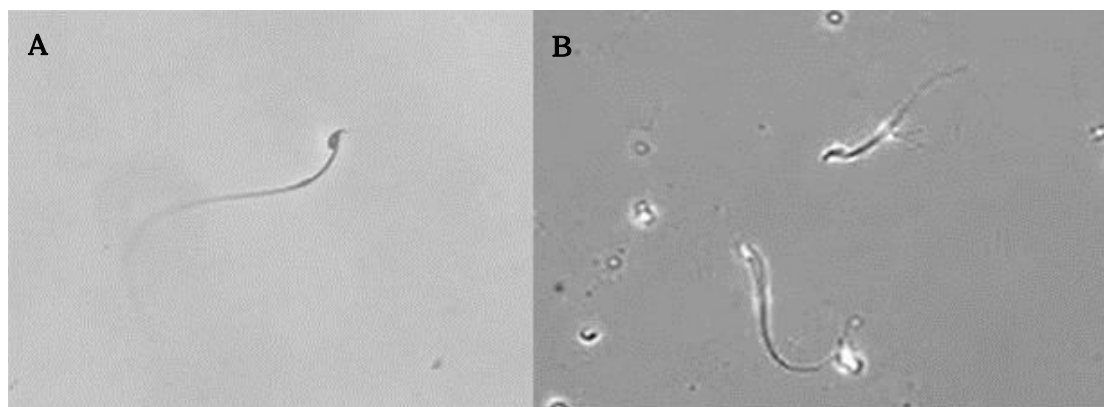
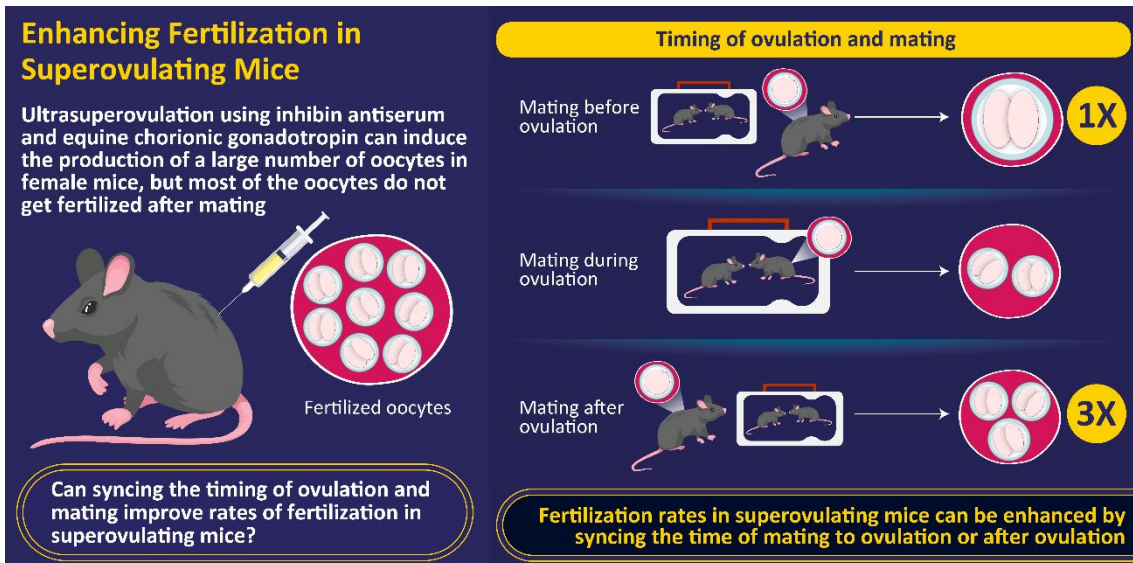


図1 従来のセルソーター(A)、マイクロ流体デバイスで分取した精子(B)

本研究成果は、Scientific Reportsに掲載された(Nakao et al, Sci Rep. 2020, 1;10(1):8862. doi: 10.1038/s41598-020-65931-z.) また、本成果については、熊本大学のプレスリリースとして発表した(『体外受精の成功率を高める精子の選別技術を開発』、<https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20200602>)。

次に、生体内の受精環境を解析した結果、卵管内において受精しやすい時期(受精適期)があり、精子と卵子が遭遇する時期を同調させることで受精効率が高まることを明らかにした。これまで、卵子に到達する精子数が少なく、生体内において受精可能な卵子数に限界があると考えられてきたが、受精適期においては受精可能な卵子数が増大することが示された(図2)。



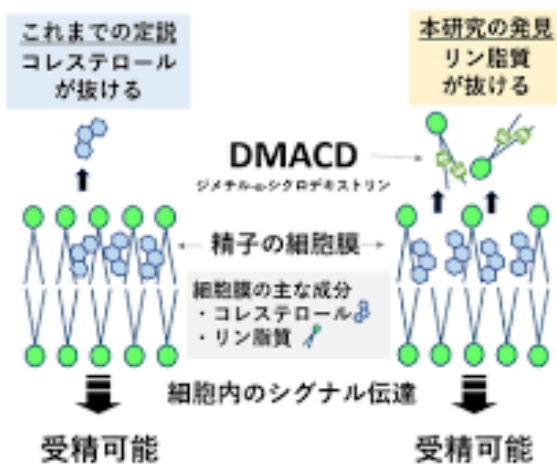
Synchronization of the ovulation and copulation timings increased the number of *in vivo* fertilized oocytes in superovulated female mice  
 Nakao et al. (2023) | *PLoS ONE* | DOI: 10.1371/journal.pone.0281330



図2 排卵と交配時期の同期化による受精率の向上

本研究成果は、*PLoS One* に掲載された ( Nakao et al, *PLoS One*. 2023 Feb 6;18(2):e0281330. doi: 10.1371/journal.pone.0281330. ) また、本成果については、熊本大学のプレスリリースとしても発表した ( "Synchronizing Ovulation with Mating Improves Fertilization in "Ultrasuperovulated" Mice", <https://ewww.kumamoto-u.ac.jp/en/news/610/> )

新規体外受精技術の開発では、精子の受精能に関してリン脂質の除去が有効であることを明かにし、リン脂質指向型の環状オリゴ糖 (ジメチル-β-シクロデキストリン、DMACD) が体外受精における受精率の向上に有効であることを示した (図3)。体外受精では、受精能獲得を誘起することが重要である。受精能獲得は、生体膜中コレステロールの減少により起こると考えられてきたが、本研究によりコレステロール以外にもリン脂質の減少が受精能獲得を引き起こすことを明かにした。



Nakao et al, *Biol Reprod*, 2023.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioad013>

図3 DMACDによる新たな精子の受精能獲得機構の解明

本研究成果は、*Biology of Reproduction* に掲載された ( Nakao et al, *Biol Reprod*. 2023 11;108(4):671-681. doi: 10.1093/biolre/ioad013. ) また、本成果については、熊本大学のプレスリリースとしても発表した ( 『精子の受精能を向上させる新規物質を発見』、<https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20230210> )。本成果に関する内容が、朝日新聞デジタルの記事にも取り上げられており、社会的関心の高い研究成果が得られた ( <https://www.asahi.com/articles/ASR2W6RY8R2KTLVB00M.html> )

以上、本研究により、受精効率を高める精子の選別技術の開発、生体内における受精効率の改

善、体外受精における受精率を高める新規化合物を発見した。これらの研究を発展させることにより、生殖医療、家畜や産業動物の繁殖、絶滅危惧動物の保護に応用できる可能性があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hsian-Jean Chin, Michael S. Dobbie, Xiang Gao, James E. Hennessy, Ki-Hoan Nam, Je Kyung Seong, Toshihiko Shiroishi, Toru Takeo, Atsushi Yoshiki, Jing Zao, Chi-Kuang Leo Wang	4. 巻 33
2. 論文標題 Asian Mouse Mutagenesis Resource Association (AMMRA): mouse genetics and laboratory animal resources in the Asia Pacific	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 192-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00335-021-09912-1	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 該当する
1. 著者名 Satohiro Nakao, Toru Takeo, Hitomi Watanabe, Gen Kondoh, Naomi Nakagata	4. 巻 10
2. 論文標題 Successful selection of mouse sperm with high viability and fertility using microfluidics chip cell sorter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65931-z	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 Nakao Satohiro, Ito Kotono, Sugahara Chihiro, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Nakagata Naomi, Takeo Toru	4. 巻 18
2. 論文標題 Synchronization of the ovulation and copulation timings increased the number of in vivo fertilized oocytes in superovulated female mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 無し
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0281330	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 Nakao Satohiro, Ito Kotono, Sakoh Kazuhito, Takemoto Kenji, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Irie Tetsumi, Nakagata Naomi, Takeo Toru	4. 巻 108
2. 論文標題 Dimethyl-β-cyclodextrin induces capacitation by removing phospholipids from the plasma membrane of mouse sperm	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 671 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioad013	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 5件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Toru Takeo
2. 発表標題 Application of the optimised protocol of in vitro fertilisation in mouse repository
3. 学会等名 Cryopreservation and Assisted Reproductive Technologies in Genetically Altered Animals Best practice, tips and tools (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Takeo
2. 発表標題 Annual Report of Mouse Resource and Reproductive Technology at CARD
3. 学会等名 2021 AMMRA Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Takeo, Satohiro Nakao, Katsuma Yamaga, Reiri Koga, Yoshino Wakasugi, Yuka Deshimaru, Maki Sakaguchi
2. 発表標題 Use of in-vitro fertilization in developing genetically modified mouse models
3. 学会等名 Workshop on genetically modified mouse models, in-vitro fertilization and therapeutic approaches to genetic diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Takeo
2. 発表標題 Sharing bioresource and reproductive technology of mice
3. 学会等名 Sri Lanka Association for Laboratory Animal Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾聡宏, 伊藤琴乃, 山鹿優真, 酒匂一仁, 竹本賢司, 入江徹美, 渡辺仁美, 近藤 玄, 中瀧直己, 竹尾 透
2. 発表標題 アルブミンおよびシクロデキストリンによる受精能獲得の誘導
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹尾 透
2. 発表標題 生殖工学技術を活用した国際マウスバンクネットワークの構築
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotono Ito, Satohiro Nakao, Chihiro Sugahara, Yoshino Wakasugi, Naomi Nakagata, Toru Takeo
2. 発表標題 Synchronizing ovulation and mating timing achieved triple yield of two-cell embryos in superovulated female mice
3. 学会等名 55th SSR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Takeo, Satohiro Nakao, Katsuma Yamaga, Ryusei Maeda, Ryo Kubota, Kotono Ito, Nobuyuki Mikoda, Naomi Nakagata
2. 発表標題 Recent progress of CARD reproductive technology
3. 学会等名 The 17th Transgenic Technology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹尾 透
2. 発表標題 受精研究で作るイノベーションの仕組み
3. 学会等名 第2回反分野的生物医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satohiro Nakao, Kotono Ito, Chihiro Sugahara, Yoshino Wakasugi, Naomi Nakagata, Toru Takeo
2. 発表標題 Efficient production of in vivo fertilized oocytes from female mice by treating inhibin antiserum and gonadotropins
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (IMGC2023) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Toru Takeo, Satohiro Nakao, Katsuma Yamaga, Ryusei Maeda, Ryo Kubota, Kotono Ito, Nobuyuki Mikoda, Naomi Nakagata
2. 発表標題 Recent challenges of the Center for Animal Resources and Development at Kumamoto University
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (IMGC2023) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 竹尾透、中尾聡宏	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 BIO Clinica 2021年 2月号 不妊診療UPDATE	



1. 著者名 中尾聡宏、中瀧直己、竹尾透	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 Precision Medicine 2021年9月号 妊娠・授乳中の薬剤の安全性について科学する	

1. 著者名 中尾聡宏、山鹿優真、中瀧直己、竹尾透	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニューサイエンス	5. 総ページ数 3
3. 書名 細胞 2023年1月号 生殖細胞を作る	

1. 著者名 中尾聡宏、中瀧直己、竹尾透	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニューサイエンス	5. 総ページ数 3
3. 書名 メディカル・サイエンス・ダイジェット 2023年2月号 不妊症・不育症治療の現在と未来	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野  <a href="http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html">http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html</a>          マウス生殖工学オンラインマニュアル  <a href="http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/index.html">http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/index.html</a>          熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野  <a href="http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html">http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html</a>          Twitter : Toru Takeo  <a href="https://twitter.com/ToruTakeo">https://twitter.com/ToruTakeo</a></p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------