

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03067

研究課題名（和文）精巣特異的な代謝状態の全貌解明に基づく男性不妊症の新規治療基盤の構築

研究課題名（英文）Establishment of a new therapeutic platform for male infertility based on a complete picture of testis-specific metabolic states.

研究代表者

福原 慎一郎（FUKUHARA, Shinichiro）

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20609870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：男性不妊の原因はまだほとんど解明されていない。クレアチンはエネルギー緩衝剤として体内に貯蔵されるが、精巣は筋肉に次いで多い臓器であり、精巣内のクレアチンが男性不妊症患者で減少していることは古くから知られているが、その役割は不明であった。本研究では、クレアチン合成酵素GamtとクレアチントランスポーターSlc6a8に着目し、精巣におけるクレアチンの役割を検討した。結論として、我々はクレアチンが精巣のタイトジャンクションの維持に必要であり、造精機能の維持に関わっていることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、GamtおよびSlc6a8ノックアウトが精巣のクレアチンレベルに及ぼす影響を調べることにより、本研究は、クレアチンが男性の生殖生物学に関与するというこれまで未解明であった側面を明らかにした。さらにクレアチンが精巣のタイトジャンクションの維持に必要であること、そしてクレアチンの欠乏を改善することでこの機能を回復できることを見出した。クレアチンは、病態生理学に基づいた治療法のない男性不妊症治療の分野において、新たな治療標的となりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The causes of male infertility are still largely unknown. Creatine is stored in the body as an energy buffer, and the testes are the second most abundant organ after muscle. Furthermore, creatine in the testes has long been known to be decreased in male infertile patients, but its role is unknown. In this study, we investigated the role of creatine in the testis, focusing on creatine synthesizing enzyme Gamt and creatine transporter Slc6a8. Slc6a8 knockout mice showed no abnormalities in spermatogenesis. On the other hand, Gamt knockout mice formed spermatozoa but had a reduced sperm count and decreased sperm motility. In addition, creatine in the testes of Gamt knockout mice was significantly decreased, resulting in disruption of tight junction, and creatine supplementation in Gamt knockout mice improved sperm count. In conclusion, we identified creatine as being required for the maintenance of the tight junction in the testis.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：精巣 クレアチン 男性不妊

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の背景とアンメットニーズの存在

少子高齢化が進む我が国において少子化対策は喫緊の課題となっている。2020年9月発足の菅内閣発足の目玉事業として不妊治療を保険診療の対象に含めることが挙げられたように不妊治療への世間のニーズは非常に高まっている。当然のように不妊治療は女性だけが対象となるのではなく、男性も同様に検査や治療対象となる。生殖補助医療が全盛となった現在、男性は精子さえあればそれで終わりといった風潮の時代もあったが、男性側に対しても適切な検査治療を受けることが生殖補助医療の成績向上につながることも再認識されている。しかしながら、今の時代においても男性不妊症の病態の多くは未解明であり病態の全貌解明が求められている。

クレアチン代謝と男性不妊症との関連について

限られた病態理解のため病態に基づく検査治療も限られており、新たな検査法、治療法は常に求められている。近年、体内の代謝状態を画像検査結果として表示できる撮像法としてMR-spectroscopy等が精巣機能評価手法としても検討され、造精機能の低下した精巣内のクレアチン濃度が低下していることがわかってきている。

Cr-CEST MRIによる精巣内クレアチン濃度評価法の開発

大阪大学循環器内科との共同研究で、MR-spectroscopyよりもさらに空間分解能に優れたCEST-MRIというMRIの撮像法を用い骨格筋内のクレアチン代謝状態の評価および精巣への応用を行っている。動物モデルにおいて骨格筋内のクレアチン評価が可能であることは既に報告した。精巣においては様々な造精機能障害モデルの検討を行い、Cr-CEST-MRIを用いて評価した精巣内クレアチン濃度が精巣虚血、放射線照射モデル、抗がん剤投与モデルいずれにおいても精巣内の状態を反映することを見出した。現在Cr-CEST-MRIを用いたヒトでの造精機能評価法の確立に向けて、特許申請を行っており、かつAMEDの支援を受け実際に臨床応用を目指した研究を開始している。精巣内クレアチンが造精機能の評価できることは分かったが、精巣内クレアチンの病態意義については全くわかっていない。

クレアチンリン酸系について(骨格筋におけるエネルギーリザーバーとしてのクレアチン)

アルギニンとグリシンが腎臓で代謝されグアジニノ酢酸となり、次いで肝臓でグアジニノ酢酸が代謝されクレアチンが産生される。クレアチンはクレアチントランスポーターにより骨格筋、心筋へと運ばれる。体内のクレアチンの90%以上が骨格筋に存在している。筋弛緩時には多くはクレアチンリン酸として存在しており、骨格筋にとって重要なエネルギー貯蔵物質となっている。無酸素的なATPの生成に使用され、クレアチンキナーゼによってリン酸基が外されクレアチンに戻る。この反応は可逆的でATP濃度の調整にも役立っている。

クレアチンはクレアチニンへと代謝され腎臓から排泄される。

精巣内のクレアチン代謝(精巣独自の代謝経路と病態意義の存在)

精巣内では骨格筋などとは異なり、セルトリ細胞内に変換酵素が存在し、セルトリ細胞内でグリシンとアルギニンからクレアチンが産生されることが分かっている。存在様式も骨格筋とは違い、そのほとんどがクレアチンリン酸ではなく、フリーのクレアチンとして存在している。精巣はクレアチンリン酸も合わせたクレアチン含有量が骨格筋に次いで多く、フリーのクレアチンは最も多い臓器である。骨格筋などと全く異なる代謝を持つにもかかわらず、精巣内においてフリーのクレアチンが多い理由や意義については不明のままといった問題が本研究課題の核心をなす学術的「問い」として存在している。

2. 研究の目的

本研究はこの学術的「問い」に答えるため、精巣内特異的なクレアチンの役割および病態意義の解明を目的とする。

臨床面の事象の検討だけでなく、基礎的な病態意義を明らかにすることで、本申請内容の学術的「問い」に答えることは男性不妊症の新規治療基盤の構築となりうるものであり、非常に独創的かつ創造的であると考える。今回明らかにする基礎的検討結果を即座に臨床にフィードバックできる点でも先進性がありかつ独自性が高い。代謝の理解は一見古典的にも見えるが生体内での一つ一つの働きは未知のことも多く、本研究により精巣特異的な代謝の全貌が明らかになれば、精子形成過程、造成機能障害の新たな機序の解明、治療法の発見にもつながることも考えられ、本研究は学術的創造性も大きく得られるところは大きいと考える。

3. 研究の方法

クレアチンは、腎臓のアルギニン：グリシンアミジノトランスフェラーゼ (AGAT) によってアミノ酸のアルギニンとオルニチンから合成され、さらに肝臓のグアニジノ酢酸 N-メチルトランスフェラーゼ (GAMT) によってグアニジノ酢酸 (GAA) がクレアチンに合成される。クレアチンは、クレアチンレセプター SLC6A8 によって臓器から取り込まれる。

精巣にはクレアチン代謝のためのユニークなシステムがあり、クレアチン合成酵素 AGAT と GAMT が精巣にも存在することが知られている。したがって、クレアチンは精巣内で合成され、クレアチンレセプターである SLC6A8 の存在により精巣外から取り込まれることも可能である。本研究では、精巣におけるクレアチンの役割を調べるために、Gamt ノックアウトマウスと Slc6a8 ノックアウトマウスを作製した。

Gamt および Slc6a8 ノックアウトが精巣のクレアチンレベルに及ぼす影響を調べることに より、本研究は、クレアチンが男性の生殖生物学に關与するというこれまで未解明であった側面を明らかにすることを目的とした。

4. 研究成果

今回我々は、精巣内のクレアチンが精巣血液関門となるタイトジャンクションを規定していることを明らかにした。さらに、マウスの精巣におけるクレアチンの維持は主にクレアチン合成酵素である Gamt によって行われていること、クレアチントランスポーターである Slc6a8 のノックアウトは精子形成に影響を与えないことを示した。

クレアチンは ATP リザーバーとして知られ、体内では筋肉に最も多く貯蔵されている。GAA は腎臓の AGAT によってアルギニンとグリシンから合成され、クレアチンは肝臓の GAMT によって GAA から合成される。この経路で合成されたクレアチンおよび食事のクレアチンは、クレアチンレセプターである Slc6a8 を介して臓器に取り込まれる。Slc6a8、GAMT、AGAT の欠損はクレアチン欠乏症の原因となることが知られており、運動発達の遅れや知的障害をもたらす。

クレアチンと精子形成の関係では、不妊患者では精巣内のクレアチンが減少していることが知られており、クレアチンが精子の運動性を活性化することが知られている。マウスでは、Slc6a8 ノックアウトマウスや Gamt ノックアウトマウスが不妊であることが知られている。Slc6a8 ノックアウトマウスの不妊が知的障害によるものなのか、精子形成によるものなのかは明らかではなかった。一方 GAMT ノックアウトマウスの精子形成異常が特徴であることを明らかになっている。しかし、精巣におけるクレアチンの役割については不明な点が多かった。

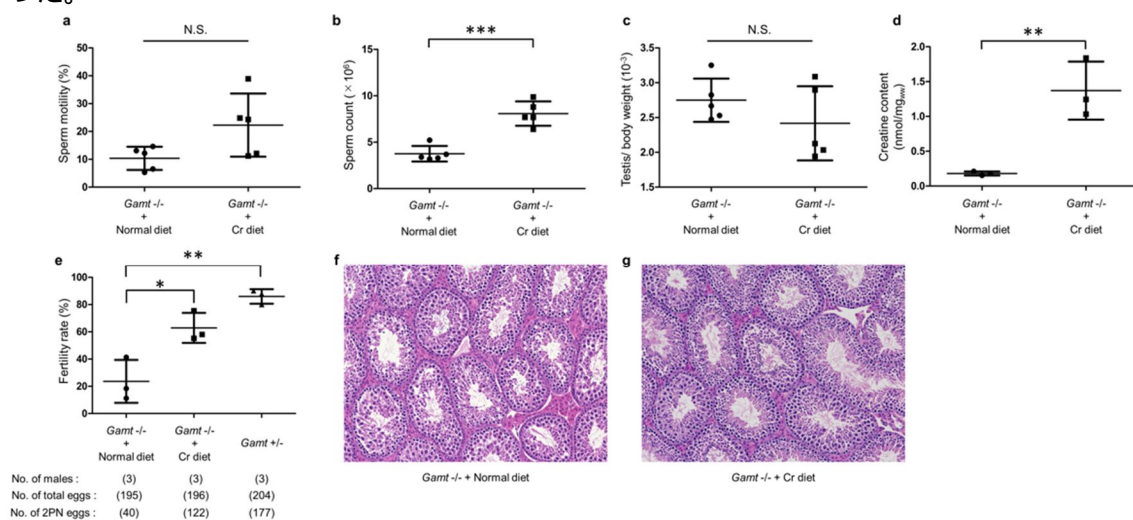


図. *Gamt* KO マウスに対するクレアチン食の影響。

(a) 通常食と Cr 食を与えた *Gamt* KO マウスの精子数、(b) 精子運動率、(c) 精巣/体重 (各群 n=5)、(d) 正常食および Cr 食を与えた *Gamt* KO マウスのクレアチン含量 (各群 n=3)、(e) 通常食および Cr 食の *Gamt* ht マウスおよび *Gamt* KO マウスの受精率 (n=3/群)。 (f) 正常食および Cr 食の *Gamt* KO マウスの精巣のヘマトキシリン・エオジン染色 (g)。

本研究では、Slc6a8 ノックアウトマウスにおいて精巣内のクレアチンが減少していないこと、精巣内の精子形成や精子の運動性に異常がないことを証明した。さらに、*Gamt* ノックアウトマウスにクレアチンを補充すると、精子形成と受精率が改善することを示した。

近年、クレアチンに注目した研究が増えており、クレアチンがマクロファージの極性に関与していること、クレアチンが IBD の発症に関与していること、クレアチンと肥満が関連していることなどが明らかになってきている。精巣と同様に管腔外と管腔内のタイトジャンクションを持つ腸管上皮では、クレアチントランスポーターが細胞内のクレアチン維持に重要な役割を果たしている。細胞内クレアチンが腸上皮細胞 (IEC) におけるエネルギー代謝とバリア形成に不可欠であることを見出しているとの報告もある。また、細胞外クレアチンが上皮の機能反応に必要なクレアチンの主要供給源であることも示唆されている。この研究では、CRT の発現とバリア形成の速度との相関、および CRT とバリア機能に関与する特定のタンパク質の発現との関係が示されている。この知見は、クレアチン輸送の減少が、上皮の完全性とバリア機能を損なうことにより、IBD の病因に寄与している可能性を示唆している。精巣では、精子形成においてタイトジャンクションが非常に重要な役割を果たしている。タイトジャンクションの障害は精子形成に障害を与えることが知られており、タイトジャンクションを規定するタンパク質には zo-1、コネキシン 43、クローディン 1129 などがある。さらに、zo-1 やクローディン-11 の分布に異常があると、タイトジャンクションが破壊されることが知られている。本研究では、精巣におけるクレアチンに着目し、クレアチン欠乏によりセルトリ細胞におけるタイトジャンクションの維持に異常が生じることを示した。また、クレアチン欠乏はタイトジャンクションを規定する zo-1 の分布異常を引き起こすことも示した。

クレアチンの補給は、古くからアスリートの筋肉増強に用いられてきたが、近年、様々な疾患における病態生理が明らかになり、その治療可能性が検討されている。脳の領域では、アルツハイマー病モデルマウスにクレアチンを投与すると症状の進行が抑制されることが示されており、メタアナリシスでは、クレアチンサプリメントが特に高齢者の認知機能を改善することが示されている。また、クレアチンはリハビリテーションや運動の分野でも有効であることが示されており、運動と組み合わせたクレアチンの補給が体脂肪の減少につながることで、高齢者の筋肉量の維持に役立つこと、化学療法を受けている患者のリハビリテーションに有用であることなどが報告されている。さらに最近、がん治療の分野でもクレアチンの有効性が示されており、クレアチンが T 細胞免疫を調節し、クレアチンの補充と PD-1 抗体療法によって腫瘍抑制効果が向上することが示されている。本研究では、精巣内のクレアチンが欠乏したマウスにおいて、クレアチンの補充が精子形成を改善することを示した。男性不妊患者では精巣内のクレアチンが減少していることを考慮すると、クレアチンの補充は精子形成を改善する可能性がある。

一方、この研究にはいくつかの限界がある。ひとつは、この研究がマウスで行われたものであり、ヒトでの研究が含まれていないことである。我々はすでに、精巣内のクレアチンを非侵襲的に評価できる Cr-CEST-MRI を開発しており、精巣内の GAMT および SLC6A8 の発現を含め、男性不妊患者におけるクレアチンの重要性を調査する予定である。

結論として、本研究では、クレアチンが精巣のタイトジャンクションの維持に必要なこと、そしてクレアチンの欠乏を改善することでこの機能を回復できることを見出した。クレアチンは、病態生理学に基づいた治療法のない男性不妊症治療の分野において、新たな治療標的となりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuribayashi Sohei, Fukuhara Shinichiro, Tsujimura Go, Imanaka Takahiro, Okada Koichi, Ueda Norichika, Takezawa Kentaro, Kiuchi Hiroshi, Saito Shigeyoshi, Takahashi Yusuke, Kioka Hidetaka, Oura Seiya, Shimada Keisuke, Ikawa Masahito, Nonomura Norio	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of the efficacy of creatine chemical exchange saturation transfer imaging in assessing testicular maturity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12507	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	竹澤 健太郎 (TAKEZAWA kentaro) (90648015)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	木内 寛 (KIUCHI Hiroshi) (70403053)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	

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