

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06582

研究課題名(和文) 終末糖化産物を標的とした新しい男性不妊療法の開発

研究課題名(英文) Effects of AGE-inhibitory DNA aptamer on male infertility

研究代表者

森 雄作 (Mori, Yusaku)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：90595919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生活・食習慣の欧米化やそれに伴う糖尿病やメタボリックシンドロームなどの生活習慣病の蔓延が、男性不妊症のリスクになりうることを示唆されてきている。本研究は、糖尿病、生活・食習慣の歪み、加齢によって促進的に形成・蓄積される終末糖化産物AGEsに着目した。肥満糖尿病モデルマウスでは精巣にAGEsが蓄積し、精巣の炎症および精子の質的・量的な異常が生じた。このマウスに我々が独自に開発したAGEを中和するDNAアプタマーを投与することで一連の異常が是正されることがわかった。本研究により、AGEsは男性不妊症と生活習慣病をつなぐ共通の分子標的であり、男性不妊症に対する新しい治療目標となりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未曾有の少子高齢化社会を迎えつつある我が国において、増加し続けている不妊症への対策は喫緊に取り組まなければならない課題の一つといえる。不妊症の約半数は男性に起因しており、生活・食習慣の欧米化やそれに伴う生活習慣病の蔓延が、男性不妊症のリスクになりうることを示唆されてきているが、その分子基盤は不明であった。本研究により、AGEsは男性不妊症と生活習慣病をつなぐ共通の分子標的であることが明らかにされ、DNAアプタマーという新たな治療手段が提示されることになり、その学問的かつ臨床的意義と価値は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Although type 2 diabetes (T2DM) can be associated with sperm abnormality in male, the underlying molecular mechanisms remain unclear. Advanced glycation end products (AGEs) are pathogenic molecules of diabetic complications. Here, we investigated the effects of AGE-inhibitory DNA aptamer (AGE-Apt) on the testes and spermatozoa in a mouse model of T2DM. We found that AGEs were accumulated in the testes of diabetic mice, which were accompanied with testicular inflammation and impaired sperm quality and quantity. The administration of AGE-inhibitory DNA aptamer attenuated all of these changes. Our findings suggest that AGEs may cause sperm abnormality via testicular inflammation, and AGEs-Apt may be a potential therapeutic option against sperm abnormality in men with T2DM.

研究分野：糖尿病

キーワード：終末糖化産物 男性不妊 糖尿病 DNAアプタマー

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国は未曾有の高齢化社会を迎えている。人口の「自然増減数」は年マイナス 50 万人を超え、合計特殊出生率は 2.0 を大きく下回り 1.20 前後であることから、少子化対策は国を挙げて喫緊に取り組まなければならない課題の一つだと言える。生活・食習慣の欧米化やそれに伴う糖尿病や肥満、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病の蔓延が、不妊症のリスクになりうることを示唆されてきている。不妊症の約半数は男性に起因しており、女性不妊症に対しては生殖補助療法があるが、男性不妊症に対しては有効な治療手段が開発されていない。また、男性不妊症では、テストステロンの分泌不全や酸化ストレス、慢性炎症による造精機能の低下が主因と考えられているものの、どのような分子機構を介して糖尿病や食生活の歪みが男性不妊にかかわっているかは明らかでない。

AGEs は、加齢や糖尿病で促進的に形成されるのみならず、食習慣の歪みを反映して体外からも摂取され、様々な生活習慣病のリスクに関わることが知られている。我々は、これまでに、AGEs がその受容体 RAGE を介して認識され、酸化ストレスや炎症反応を惹起することで、大小血管障害、癌の増殖・転移、骨粗鬆症、アルツハイマー病等の多くの生活習慣病に関わるとともに、インスリン抵抗性を介してテストステロンを低下させることで加齢男性性腺機能低下 (LOH) 症候群にも関わることを明らかにしてきた (Nature 2000;404:787-90, J Clin Invest 2001;108:261-8, FASEB J 2002;19:28-30, Kidney Int 2003;63:464-73, J Invest Dermatol 2004;122:461-7, J Biol Chem 2006;281:20213-20, Diabetologia 2006;49:3094-99.)。以上の事実は、(1) 糖尿病が AGEs を介して男性不妊を引き起こしうること、(2) AGEs を阻害することで男性不妊に対する新たな治療手段を提供できる可能性があることを示唆している。

我々は、これまでに AGEs に特異的に結合する DNA アプタマーや RAGE に対して阻害的に作用する DNA アプタマーの開発に世界で初めて成功し、それぞれのアプタマーの投与により、糖尿病モデル動物の腎症、ヌードマウスにおけるメラノーマの増殖・転移、バルーン障害後の血管リモデリングなどが抑えられることを見出してきた (Diabetes 2013;62:3241-50, Int J Cardiol 2014;171:443-6, Lab Invest 2014;94:422-9, Diabetes 2017;66:1683-95, Mol Med 2017;23:295-306.)。しかしながら、男性不妊症の動物モデルにおいて、AGEs-RAGE 系の阻害が造精機能障害やテストステロン低下を改善させ、当該動物の妊孕能を向上させることができるかどうかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、インスリン抵抗性を生じた肥満糖尿病マウスモデルにおいて、アプタマーにより AGEs-RAGE 系を抑えることで造精機能を改善させるかどうか、つまり、アプタマーによる AGEs-RAGE 系の阻害が男性不妊に対する新しい治療手段となりうるかどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では肥満糖尿病モデルマウスとして KK-Ay マウスを、野生型コントロールとして C57BL6/J マウスを用いた。生後 3 週齢のオスのマウスを日本クレア社より購入して実験に用いた。生後 7 週齢の時点で、KK-Ay マウスは AGEs アプタマー群もしくはコントロールアプタマー群に、C57BL6/J マウスはコントロールアプタマー群に振り分けた。アプタマーは薬液徐放作用のある浸透圧ポンプ (Alzet1004) を背部皮下に植え込み、10 pmol/g 体重/日となるように持続

皮下投与した。アプタマーの投与開始から経時的に食餌摂取量と体重を測定した。アプタマーの投与開始から6週後に血圧を測定し、血液、精子、精巢を採取した。精子は精巢上体からM2培地を用いてswim-out法で採取した。採取した血液は血糖、HbA1c、インスリン、テストステロン、総コレステロール、中性脂肪の測定に用いた。採取した精子は精子濃度(血球盤を使用)、正常運動率(顕微鏡下で直線運動する精子をカウント)、生存率(ニグロシンエオシン染色を使用)の測定に用いた。採取した精巢はHE染色による構造解析、免疫染色法によるタンパク発現レベルの評価、real-time RT-PCR法による遺伝子発現レベルの評価に用いた。

次に、アプタマー投与前の状態を調べるため、生後4週齢と7週齢のKK-AyマウスとC57BL6/Jマウスから精子と精巢を採取し、上記と同様の測定に用いた。

最後に、精子に対する炎症性サイトカインの直接的な作用を調べるため、C57BL6/Jマウスから採取した精子をTNF(100 ng/mL)で24時間インキュベートし、正常運動率と生存率に及ぼす作用を評価した。

4. 研究成果

生後4週齢の時点でオスのKK-Ayマウスの体重と血糖値は、C57BL6/Jマウスよりも有意に高値であったが、HbA1cはどちらも測定感度以下(4.0%未満)であった。生後7週齢の時点では、KK-AyマウスとC57BL6/Jマウスの体重と血糖値の差はさらに顕著となり、HbA1cについてもKK-Ayマウスで有意に高値であった($4.7 \pm 0.3\%$ vs. $7.0 \pm 0.9\%$)。このことから、アプタマー投与時においてKK-Ayマウスは肥満による高血糖を呈していることが確認された。

アプタマー投与開始から6週間後である生後13週齢においては、コントロールアプタマーを投与されたC57BL6/Jマウス(Non-DM CTR-Apt)と比較して、コントロールアプタマーを投与されたKK-Ayマウス(DM CTR-Apt)は体重、血糖値、インスリン値、テストステロン値、総コレステロール値、中性脂肪値が有意に高値であった。しかしながら、AGEアプタマーを投与されたKK-Ayマウス(DM AGE-Apt)とDM CTR-Aptの間には、体重、血糖値、インスリン値、テストステロン値、総コレステロール値、中性脂肪値について有意な差を認めなかった。このことからAGEアプタマーは代謝因子に直接的な影響を及ぼさなかったことが示された。

アプタマー投与開始から6週間後の解析では、DM CTR-AptはNon-DM CTR-Aptと比較し

て、精子の濃度(図1A)、正常運動率(図1B)、生存率(図1C)が有意に低下しており、精巢では内腔の増大を伴う精細管の拡張が見られた(図1D-1F)。さらに、DM CTR-Aptの精巢の間質にはAGEsが蓄積しており(図2A)、間質の酸化ストレスレベル(図2B)とマクロファージ浸潤(図2C)の増加、炎症性サイトカインの遺伝子発現レベル(図2D、2E)の上昇を伴っていた。DM AGE-Aptにおいては、DM CTR-Aptと比較して、精子の濃度(図1A)、正常運動率(図1B)、生存率(図1C)の改善が見られ(図1A-1C)、精細管拡張が抑制された(図1D-1F)。さらに、精巢において

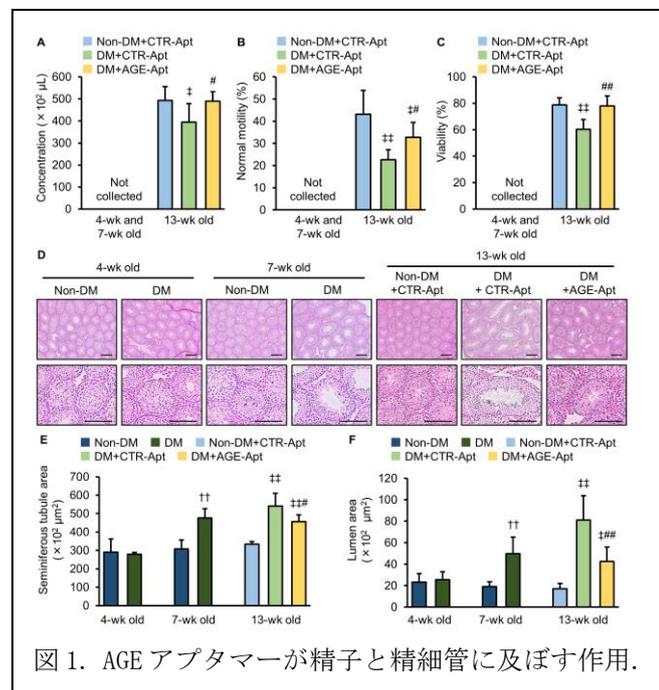


図1. AGEアプタマーが精子と精細管に及ぼす作用。

AGEs 蓄積は変化させなかったが(図 2A)、酸化ストレス、マクロファージ浸潤、炎症性サイトカイン発現が改善した(図 2B-2E)。AGEs 阻害アプタマーは AGEs と結合して、AGEs-AGE 受容体シグナルを抑制するため、AGE アプタマーが AGEs の蓄積自体には影響しなかったことは、その作用に矛盾しないものと考えられた。これらの結果から、AGE アプタマーは直接的な作用として、精子の異常を改善させ、精巣の炎症を抑制することが明らかとなった。

生後 4 週齢と 7 週齢のマウスを用いた検討では、いずれの週齢においても精子は採取されなかった。しかしながら、生後 4 週齢の時点で、KK-Ay マウスの精巣では間質への AGEs 形成が生じており、マクロファージ浸潤を促進

する MCP-1 の遺伝子発現レベルが上昇していた。そして、生後 7 週齢の時点で、KK-Ay マウスの精巣では精細管の拡張が見られ、炎症性サイトカインである TNF の遺伝子発現レベルが増加していた。これらの結果から、KK-Ay マウスにおいて、精子の異常に先立って精巣の炎症が生じていることが明らかになった。

精子に対する直接的作用の検討では、TNF(100 ng/mL)による正常運動率と生存率の低下が認められた。このことから、精巣における炎症が精子の異常に関わる可能性が示唆された。

今回の研究により、肥満糖尿病モデルマウスにおいて、AGEs が蓄積する部位は精巣の間質であり、間質における酸化ストレスやマクロファージ浸潤が引き起こされ、炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルが増加することを発見した。一方で、精細管の内部には、酸化ストレスの増加やマクロファージ浸潤が見られなかった。また、炎症性サイトカインが精子のこのことから、間質における AGEs の蓄積が精細管における造精機能障害精子を引き起こす分子機序として、炎症性サイトカインが直接的に精子に作用する可能性が考えられた。

しかしながら、炎症性サイトカインが血液精巣関門の障害を介して間接的に精子に作用する可能性も考えられる。今後は、糖尿病モデルマウスの精巣において血液精巣関門が障害されているかどうかを調べるための動物実験を行い、精巣炎症と精子異常を結びつける分子機序を明らかにしていく予定である。

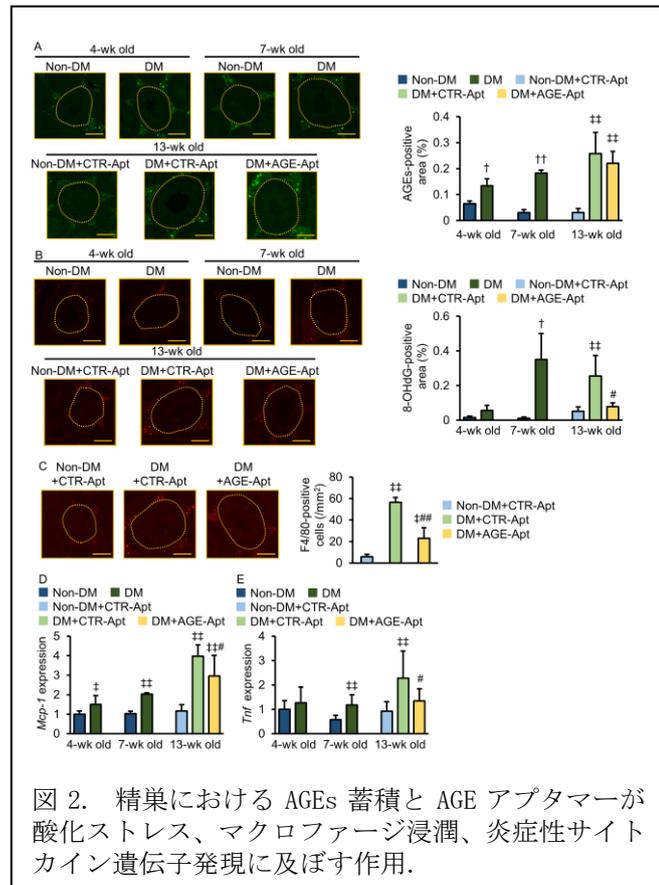


図 2. 精巣における AGEs 蓄積と AGE アプタマーが酸化ストレス、マクロファージ浸潤、炎症性サイトカイン遺伝子発現に及ぼす作用。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 雄作、齋藤 智美、山岸 昌一 |
| 2. 発表標題 糖尿病性男性不妊症に対する終末糖化産物阻害アプタマーの有効性 |
| 3. 学会等名 第11回日本糖尿病協会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 雄作、寺崎 道重、広村 宗範、齋藤 智美、小原 信、福井 智康、山岸 昌一 |
| 2. 発表標題 糖尿病による男性不妊症に対する新しい治療手段の開発：終末糖化産物を標的とした機能性核酸医薬の有効性の検討 |
| 3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 雄作、寺崎 道重、広村 宗範、小原 信、福井 智康、山岸 昌一 |
| 2. 発表標題 肥満糖尿病モデルマウスの精子濃度低下と運動障害に対するエンバグリフロジンの有効性 |
| 3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 雄作、寺崎 道重、広村 宗範、齋藤 智美、大坂 直也、八島 広典、小原 信、福井 智康、山岸 昌一 |
| 2. 発表標題 エンバグリフロジンは糖尿病による精子の濃度低下と運動障害を改善する：肥満糖尿病モデルマウスにおける検討 |
| 3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 |
| 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 | 広村 宗範 (Hiromura Munenori) (00773186) | 昭和大学・医学部・兼任講師 (32622) | |
| 研究 分担者 | 山岸 昌一 (Yamagishi Sho-Ichi) (40281026) | 昭和大学・医学部・教授 (32622) | |

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