

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09391

研究課題名(和文) 分子病理学的アプローチに基づく男性不妊症に関わるミトコンドリア電子伝達系制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of mitochondrial electron transport system involved in male infertility based on a molecular pathology approach.

研究代表者

栗原 靖之 (Kurihara, Yasuyuki)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80202050

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)：本研究課題では男性不妊症患者から採取した精子のミトコンドリアタンパク質の発現や精子内の局在と精液評価をSMASシステムとMiOXSYSを使って解析した。さらに、これらの結果を患者ごとの不妊治療効果と対応させ、段階的男性不妊症治療の新規の予後指標を確立することを目的にした。COXFA4L3タンパク質は、精液サンプルの体細胞由来成分には含まれないので、精液中の精子のミトコンドリアタンパク質のみを検出することができる。そこで、抗COXFA4L3モノクローナル抗体で発現量と局在を解析した。また、COXFA4L3タンパク質発現量は精子細胞特異的解糖系タンパク質GAPDSの発現量との相対比で求めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、新たにミトコンドリア電子伝達系複合体4のサブユニットタンパク質が男性不妊症患者の精子先体にも異所的に発現していることを明らかにした。また、この異所的発現している精子を異常精子と判定すると、正常精子が精液試料中に26%以上持つ男性では自然妊娠や人工授精で妊娠が成立することがわかった。この評価法を使うと、不妊症外来に訪れた患者さんに対し、人工授精法と体外受精法や顕微授精法の診療方法の切り分けに有効である事が示唆される。これにより、より体への負担が少なく、安価で短期間に妊娠転帰できる可能性を示唆するものとして社会的意義が深い。

研究成果の概要(英文)：In this research project, the expression of mitochondrial proteins and their localisation in sperm from male infertility patients were analysed using monoclonal antibodies. The semen evaluation of the patients was also assessed using the SMAS system and MiOXSYS. Furthermore, we aimed to establish novel prognostic indicators for staged male infertility treatment by correlating these results with the efficacy of infertility treatment in each patient. COXFA4L3 is not expressed in somatic cell-derived components of semen samples, so only the mitochondrial proteins of sperm in semen can be detected. Therefore, expression level and localisation by using an anti-human COXFA4L3 monoclonal antibody were performed. And the COXFA4L3 protein expression level was determined relative to the expression level of the sperm cell-specific glycolytic system protein GAPDS.

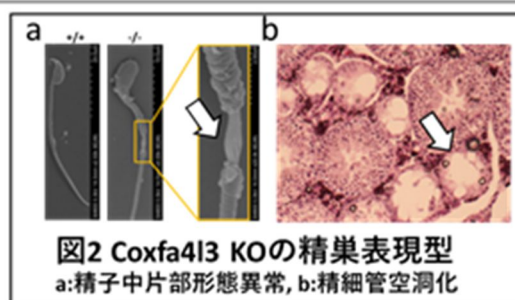
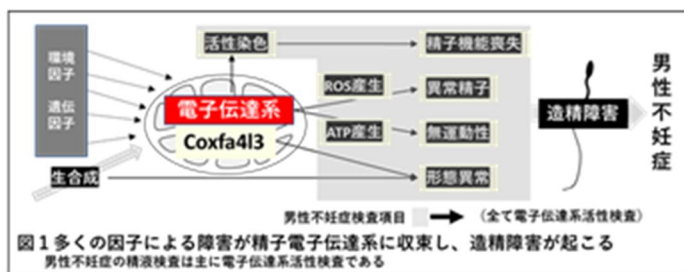
研究分野：泌尿器科学

キーワード：男性不妊症 精子 ミトコンドリア 治療法

1. 研究開始当初の背景

我が国では通常のカップルのうち約 15%が不妊症で、その半数が男性側に原因がある。男性不妊症の治療には生活習慣の改善、ホルモン療法、漢方薬やビタミンなどの薬物投与と精索静脈瘤などの外科的手術、人工授精などが実施されているが、必ずしも期待される効果が得られていない。不妊治療は男性側にも女性側にも大きなコストやストレスがかかるので社会問題として注目を浴びている。

男性不妊症のうち約 8 割が乏精子症、無精子症、精子無力症などの造精障害である。男性不妊症は多因子性疾患だが、ほとんどの場合、異常精子及び精子細胞の活性酸素(ROS)レベルが高いという共通の特徴がみられ、ETC と男性不妊症の関連が示唆されている (Amaral et al, 2013)。そのため、生活習慣や遺伝要因など多因子性の障害カスケードが、精子細胞の Mt の ETC に収束し、その機能不全が造精機能を障害していると考えられるが (図 1) その分子病理学的知見はほとんどない。この解明を阻んでいるのは分子病理学的解析に必要な精子特異的な ETC マーカーや疾患モデル動物がないことである。申請者は精子形成過程の減数分裂後に特異的に発現する Mt-ETC 複合体の新しいサブユニットタンパク質 Coxfa4l3 を報告した(文献 13)。このヒトホモログ COXFA4L3 はヒトで唯一の精子細胞・精子特異的な ETC サブユニットタンパク質である。この KO マウスで精子形態異常や空洞化した精細管がみられたことから (図 2) Mt 機能不全による造精障害の良い疾患モデルになると考えた。



2. 研究の目的

本課題の目的は、COXFA4L3 をツールにして、KO マウスと正常マウスで精子および減数分裂後の精子細胞の Mt-ETC のサブユニット構成とその活性、ATP と ROS 生産能を比較して、精子形成期の ETC の特殊性を明らかにすることである。さらにその知見をもとに男性不妊症のバイオマーカーとして COXFA4L3 が有用かどうかを検証する

3. 研究の方法

(1) 精巣生殖細胞の分化段階ごとの安定的分画方法の確立

精巣生殖細胞を核特異的蛍光色素 Hoechst333342 で染色し、フローサイトメーターで分画分取する (図 4 左上) これを安定に分取して Mt タンパク質を精製するプロトコルを完成する。

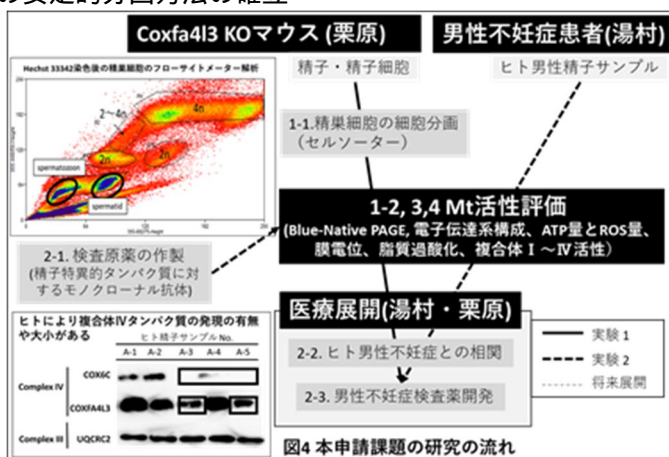
(2) Blue-Native PAGE による ETC 複合体の超複合体と活性解析

ETC の複合体 ~ は複合体同士で結合して超複合体を形成し、その構成の違いで ETC 活性を制御している。そこで、野生型マウスと KO マウスで超複合体の構成と活性の違いを Blue-Native PAGE と、そのゲル上での活性染色を行い、複合体活性の違いを比較する。

(3) ヒト男性不妊症検査薬作製に向けたモノクローナル抗体作製と評価

予備実験として、申請者が樹立した COXFA4L3 などの ETC タンパク質に対するモノクローナル抗体を使ってウエスタンブロット法で精子での発現量解析を行ったところ、人により大きな差があることがわかった (図 4 左下)。この発現量の差と病態との関連はまだ明らかではないが、検査薬に適応可能な ETC タンパク質や精子量標準化用のモノクローナル抗体の作製に着手する。

(4) Coxfa4l3 KO マウスの精子と精子細胞の Mt 活性の評価



Coxfa4l3 KO マウスによる Mt 活性障害 (ATP 量と ROS 量、膜電位、複合体 ~ 活性、脂質過酸化等) を、精子とフローサイトメーターで分画した精子細胞で調べ、野生型マウスと比較する。

(5) マウス体細胞・臓器と精子細胞の ETC 構成と Mt 活性の比較

精子形成期細胞と他の臓器細胞の ATP 生産機構を比較し、精子形成期の特殊環境下での ATP 生産機構の特殊性を明らかにするため、1-2、1-3 と同じ実験を臓器タンパク質で調べ、精子形成期細胞と比較する。

(6) ヒト精子での COXFA4L3 タンパク質の発現と男性不妊症との相関

ヒト精子からタンパク質を抽出し、精子量標準化抗体と抗ヒト ETC タンパク質抗体を使って、精子の ETC タンパク質の発現量をウエスタンブロッティングで比較する。そして、この発現量の差と被験者の医療情報との相関度を求める。

#### 4. 研究成果

この研究プロジェクトでは、男性不妊患者の精子におけるミトコンドリアタンパク質の発現とその局在を、モノクローナル抗体を用いて分析した。また、SMAS システムと MiOXSYS を用いて患者の精液評価を行った。さらに、これらの結果を各患者の不妊治療効果と相関させることで、段階的男性不妊治療の新たな予後指標を確立することを目指した。COXFA4L3 は精液サンプルの体細胞由来成分には発現していないため、精液中の精子のミトコンドリア蛋白質のみを検出することができる。そこで、抗ヒト COXFA4L3 モノクローナル抗体を用いて発現量と局在を調べた。また、COXFA4L3 タンパク質の発現量を精子細胞特異的解糖系タンパク質 GAPDS の発現量との相対値で求めた。

その結果、男性不妊症患者の精子における発現量がサンプル間で大きな違いがあることがわかった。さらに驚くべきことに、本来精子中片部に局在する COXFA4L3 が男性不妊症患者の精子の一部では先体にも異所的に局在することがわかった。この異所的局在を示す精子を異常と考え、異所的局在を示さない正常精子の割合が 26%以上である患者では人工授精により妊娠を成立させることがわかった。これにより、段階的男性不妊治療の開始点を決める場合、COXFA4L3 の先体局在を新たな予後指標として利用すれば、迅速な不妊治療法の選択に役立つ可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Atsumi Sakaguchi, Yoichiro Tanaka, Eiki Shoji, Teppei Takeshima, Rina Sakamaki, Takao Matsuba, and Yasuyuki Kurihara	4. 巻 17
2. 論文標題 Rapid, simple, and effective strategy to produce monoclonal antibodies targeting protein structures using hybridoma technology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biol Eng.	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13036-023-00345-9	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 Yumura Yasushi, Takeshima Teppei, Komeya Mitsuru, Karibe Jurii, Kuroda Shinnosuke, Saito Tomoki	4. 巻 41
2. 論文標題 Long-Term Fertility Function Sequelae in Young Male Cancer Survivors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The World Journal of Men's Health	6. 最初と最後の頁 255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5534/wjmh.220102	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久芳藤乃, 藤澤祐輔, 田中陽一郎, 坂口敦美, 菊池 沙也香, 栗原 靖之
2. 発表標題 医薬・検査薬に適した構造認識モノクローナル抗体の取得方法のさらなる簡略化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 時任怜史, 藤澤祐輔, 吉田 魁斗, 吉見 一人, 小出 剛, 菊池沙也香, 栗原 靖之
2. 発表標題 マウス精子形成期後期ではワールブルグ効果(低酸素適応)とは異なる超低酸素環境のATP生産制御機構が存在する可能性がある
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤澤祐輔, 久芳藤乃, 菊池沙也香, 湯村寧, 上野寛枝, 栗原靖之
2. 発表標題 男性不妊症精子は異常ミトコンドリアによって酸化ストレスを発生する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂口敦美, 田中陽一郎, 酒巻里菜, 松葉隆雄, 栗原靖之
2. 発表標題 高親和性の構造認識モノクローナル抗体を短期間で取得する作製法および構造認識能の簡単な評価法の開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 組換えタンパク質による抗体産生細胞のラベル技術とその応用	発明者 栗原靖之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-174876	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	湯村 寧  (Yumura Yasushi)  (30522023)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授   (22701)	

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