

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09438

研究課題名（和文）ミトコンドリア代謝を指標とした、新規ヒト精子品質評価技術の確立と品質維持への試み

研究課題名（英文）Establishment of a New Human Sperm Quality Assessment Technique Using Mitochondrial Metabolism as an Indicator and an Attempt to Maintain Quality

研究代表者

谷口 久哲（TANIGUCHI, Hisanori）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90460815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により解析プレートのコーティング基剤、および解析培地組成の最適化についての知見を得ることでヒト精子ミトコンドリアの細胞外フラックス測定系の構築に成功した。実臨床における精子品質評価において、次に課題となったのが、精液全体の環境であった。そこで、「濃精液症」とそれ以外の精液中のマイクロバイームについて新たな検討を行った。ナノポアシーケンシングを用いた精液マイクロバイーム解析に適した手法の確立を行った。Pilot studyの結果から、濃精液症マイクロバイームにおいてはStreptococcus属以外の菌が独自のマイクロバイームを形成していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、精子のミトコンドリア代謝機構の測定系を新たに確立した事で、少子化社会における本邦の男性不妊診療の発展に貢献できる可能性がある。さらに、近年注目されている微生物環境研究の男性不妊分野の草分けとして、濃精液症のマイクロバイーム解析に着手することが出来た。

研究成果の概要（英文）：This study successfully established a system for measuring extracellular flux of human sperm mitochondria by gaining knowledge on the optimization of the coating substrate of the analysis plate and the composition of the analysis medium. The next issue in the evaluation of sperm quality in actual clinical practice was the overall semen environment. Therefore, we conducted a new study on the microbiome in pyospermia. We established a suitable method for semen microbiome analysis using nanopore sequencing, and the results of the pilot study suggested that bacteria other than Streptococcus spp. form their own microbiome in the pyospermia.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：精子 細胞外フラックス 濃精液症

1. 研究開始当初の背景

不妊症の約半数は男性側に問題がある「男性不妊症」であるが、原因の多くは精子の運動能など「精子の品質」に異常があるとされている。近年、実臨床における不妊治療の過程においては、単に精液所見を評価するだけでは無く、精液採取における時間（精子採取からラボ持参までの時間）・精液保管温度（搬送時の温度）と受精・妊娠率との関係についての議論が盛んになってきている。そのため、様々な条件下における精子の品質評価と品質管理への取り組みが重要視されるようになってきた。細胞内エネルギー代謝は生体の機能と密接に結びついており、広範な研究領域において細胞内代謝経路が注目を集めている。ヒト精子においては精子中片部にあるミトコンドリアが精子運動のエネルギーを産生する。本研究では従来の品質評価基準である運動率・生存率等の機能検査指標に加え、ヒト精子のミトコンドリアにおける酸素代謝を指標とした新たな定量的かつ客観的評価手法を確立することを考案した。不妊治療に対する男性因子の病態解明と治療戦略の構築は、少子化社会である本邦にとって社会的急務である。

2. 研究の目的

「ヒト精子のミトコンドリアにおける酸素代謝を指標とした、新たな精子品質評価技術を確立する事」、さらに「品質別にみた精子ミトコンドリアの形態的特徴を検討し、精子の品質管理を目的とした添加物の有用性を検証する事」である。研究内容として（1）細胞外フラックスアナライザーを用いた、ヒト精子運動能の主要なエネルギー代謝経路であるミトコンドリアにおける酸化的リン酸化および解糖系活性の測定。（2）精液採取からの時間および精液保管温度が、ヒト精子のエネルギー代謝機構ならびに精子運動能・生存率におよぼす影響の検討。ならびに（3）透過型電子顕微鏡を用いて、ヒト精子の品質別にみたミトコンドリアの形態学的変化の特徴を明らかにし、（4）ミトコンドリアのエネルギー産生に関わる物質が精子運動能/ミトコンドリアの形態維持に与える効果を検証する。これらの検討により、最適な精液採取法と精子品質管理についての知見を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の3つの段階で研究をすすめる事とした。まず、（1）これまで本学での実績経験を有する細胞外フラックス解析技術をヒト精子に応用し、ヒト精子ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化および解糖系活性の測定系を確立する。（2）実臨床における不妊治療の過程に即して、精液採取からの時間および保管温度が、ヒト精子のエネルギー代謝機構ならびに精子運動率・生存率におよぼす影響を検討する。（3）さらには透過型電子顕微鏡を用いて、精子の品質別にみたミトコンドリアの形態学的変化の解明し、抗酸化剤やミトコンドリアのエネルギー産生に関わる物質が精子運動能/形態の維持に与える効果を検討する。

初年度はヒト精子細胞レベルでのエネルギー代謝状態の測定を酸素消費速度[OCR : Oxygen Consumption Rate (pmol/min)]、細胞外酸性化速度[ECAR: Extracellular Acidification Rate (mpH/min)]で評価し（1）の検討を行う。次年度は初年度で確立された手法を用いて（2）について検討をする。最終年度は（3）を中心に行う。特に（2）で評価された品質

別のヒト精子ミトコンドリアの形態学的特徴を解析し、さらに 抗酸化剤 (グルタチオン)・カルニチン・コエンザイム Q10 の投与量の違いによる、精子運動能/形態維持に与える効果の検討を行う事とした。

4. 研究成果

初年度において、当初の目的であったヒト精子を用いた細胞外フラックス測定系の構築に成功する事が出来た。

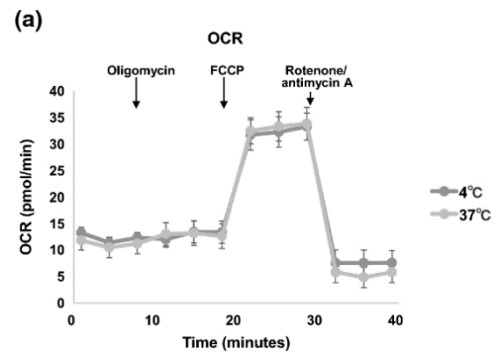
解析プレートのコーティング基剤、および解析培地組成の最適化に対する検討を行い、知見を得る事で、ヒト精子における、精子ミトコンドリアの細胞外フラックス測定系の構築に成功した。(Taniguchi et al. BMC Research Notes 2022)

本研究においては、精液所見正常検体を用いたものであった。精液採取から 4℃2 時間と 37℃2 時間の異なった培養条件下において、4℃で培養した精子は 37℃で培養した精子よりも全体の運動率が低かった

が、精子全体の基礎呼吸、最大呼吸、予備呼吸能力に有意差は認められず、ミトコンドリア代謝能低温培養下での影響を受けなかったことが確かめられた。

実臨床における精子品質評価において、次に課題となったのは、精子を含む精液全体の環境であった。そこで、精液中にある一定量の白血球を含む「膿精液症」とそれ以外の精液中のマイクロバイオーームについて新たな検討を行った。

ナノポアシーケンスを用いたマイクロバイオーーム解析において、精液のマイクロバイオーーム解析に適した手法の確立を行った。Pilot study の結果から、健常精液マイクロバイオーームでは Streptococcus 属 が多く存在し、膿精液症マイクロバイオーームにおいては Streptococcus 属以外の菌が独自のマイクロバイオーームを形成していることが示唆された。今後更なる症例数の検討から、膿精液症のマイクロバイオーームの実態を明らかにしていきたい。



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 Hisanori Taniguchi, Yoshiyuki Matsuo, Kayo Shimoi, Masahiro Yoshimura, Kiichi Hirota & Hidefumi Kinoshita	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of a novel assessment of the quality of human spermatozoa measuring mitochondrial oxygen metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	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） 10.1186/s13104-022-06012-4	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	松尾 禎之 (MATSUO Yoshiyuki) (50447926)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	

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