

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14972

研究課題名（和文）PAR2を標的とした新規男性不妊治療の開発

研究課題名（英文）Development of a novel male infertility treatment targeting PAR2

研究代表者

梶 健二郎 (kaji, kenjiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：60884252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は精子のPAR2活性化が精子の運動性に与える影響を解明し、精子の運動性低下に起因する男性不妊に対する新たな不妊治療法の構築を目的とする。マウス精子に発現するPAR2の活性化は精子の運動能を増強する傾向があること、またPAR2欠損マウスの雄と交配すると着床痕が減少することを明らかにした。しかし、PAR2刺激を行ったマウス精子とマウス卵子を用いた体外受精ではPAR2処置した精子を用いると受精卵が増加する傾向は認められたが有意差は認められなかった。以上の事からPAR2の活性化により精子運動が増強される可能性が示唆されたが、PAR2活性化が受精率を向上させるかについてはさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により精子PAR2の活性化が精子運動を増強する可能性が見出された。不妊のうち、男性不妊の割合は約50%程度と半数を占めており、その多くは精子の運動性低下に起因している。そのため、男性不妊においてPAR2が新たな治療標的として利用できる可能性が示唆された。また、この結果はヒトだけではなく畜産領域においても応用可能である。牛の種付けは主に凍結精子を用いて行われるが、凍結を経た精子は運動性が低下するという問題点がある。そのため、人工授精の際にPAR2刺激によって精子の運動能を活性化させることで高い受胎率を期待できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the effects of sperm PAR2 activation on sperm motility and to develop a new fertility treatment for male infertility caused by decreased sperm motility. We found that activation of PAR2 expressed in mouse sperm tends to enhance sperm motility and that implantation scars are reduced when mice are mated with male PAR2-deficient mice. However, in vitro fertilization using PAR2-stimulated mouse sperm and mouse oocytes showed a trend toward increased fertilized eggs when PAR2-treated sperm were used, but the difference was not significant. These findings suggest that PAR2 activation may enhance sperm motility, but further studies are needed to determine whether PAR2 activation improves fertilization rates.

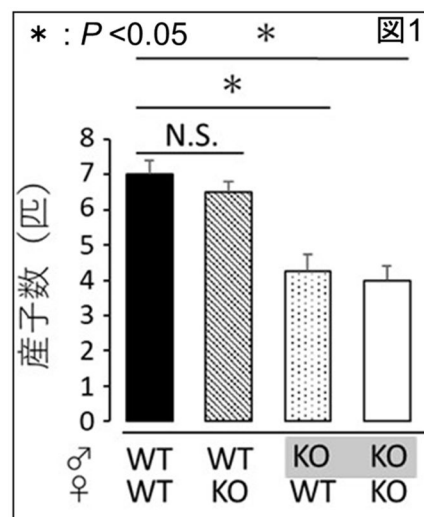
研究分野：獣医学

キーワード：PAR2 男性不妊 精子運動 受精能 肥満細胞

### 1. 研究開始当初の背景

受精において精子の活発な運動性獲得は必須であり、この運動性の低下は男性不妊の主な原因となる。精子運動にはカルシウムイオンの存在が重要であり、運動性獲得は雌性生殖路内で起こるとされているが、その具体的な分子メカニズムについては依然として不明な点が多い。プロテアーゼ活性化型受容体 2 (PAR2) は肥満細胞のトリプターゼや膵臓のトリプシン、また血液凝固因子などのプロテアーゼにより活性化される Gq/11 共役型 7 回膜貫通型受容体であり、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に寄与する。PAR2 の生殖器における役割に関しては、雌性生殖器

についていくつかの研究が存在している一方、雄性生殖器での PAR2 の役割に関する研究は非常に限られている。ヒトにおいて精子の先体部と中片部に PAR2 の発現が認められることが明らかとなっているが、その役割やリガンドの存在に関しては依然として不明な点が多い。申請者はこれまでにプロテアーゼ活性化型受容体 2 (PAR2) の遺伝的欠損マウス (PAR2 KO) において、雄の PAR2 KO と雌の野生型マウス (WT) を掛け合わせた際の産子数が有意に減少することを見出した (図1)。また、雌性生殖路である子宮の内膜には PAR2 のリガンドであるトリプターゼを産生する肥満細胞が豊富に存在していることが知られている。以上のことから、このトリプターゼ / PAR2 シグナルがカルシウムイオンを介して精子の運動性を亢進させることで受精能に関与している可能性が考えられるが、科学的根拠は存在しない。よって、本研究の学術的「問い」は「精子の PAR2 を介した精子内カルシウムイオンの上昇は運動能を亢進させることで受精を促進するか」である。



このトリプターゼ / PAR2 シグナルがカルシウムイオンを介して精子の運動性を亢進させることで受精能に関与している可能性が考えられるが、科学的根拠は存在しない。よって、本研究の学術的「問い」は「精子の PAR2 を介した精子内カルシウムイオンの上昇は運動能を亢進させることで受精を促進するか」である。

### 2. 研究の目的

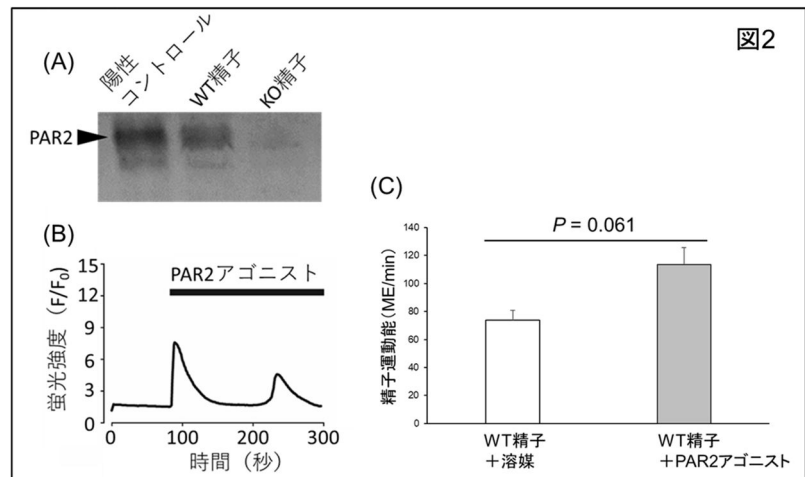
本研究はマウスの精子における PAR2 活性化が精子の運動性および受精能に与える影響を解明し、精子の運動性低下に起因する男性不妊に対する新たな不妊治療法の構築を目的とする。具体的には マウスの精子における PAR2 発現の検討およびその活性化が鞭毛運動に与える影響、PAR2 が受精および妊娠に及ぼす影響、肥満細胞トリプターゼが産子数におよぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

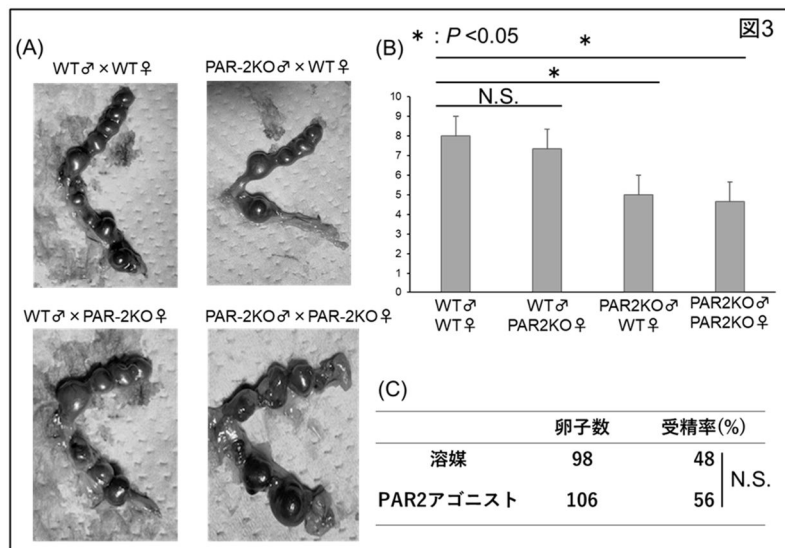
WT マウスおよび PAR2 KO マウスの精巢上体尾部より精子を採材し、タンパク質を抽出した後、ウェスタンブロット (WB) を用いてマウス精子の PAR2 発現を確認した。また、採取した精子を精子前培養培地で処置した後に、カルシウムイメージングを用いて PAR2 アゴニスを添加した際の精子内カルシウム濃度の測定を行った。さらに、採取した精子に PAR2 アゴニストを添加した際の運動精子の変化を光川法を用いて評価した。PAR2KO マウスおよび WT マウスを掛け合わせた際の着床痕数を評価することで着床におよぼす影響を検討した。また、PAR2 アゴニストを添加した WT マウスの精子と過剰排卵処置により得た WT マウス卵子を共培養し、第 2 極体を放出した卵子を受精卵としてその個数を計測することで PAR2 の活性化が体外受精におよぼす影響を検討した。雌の WT マウスの子宮における肥満細胞の局在を CAE 染色を用いて評価した。また肥満細胞トリプターゼ欠損マウスと WT マウスを交配した際の産子数の変化を評価した。

#### 4. 研究成果

マウスの精子に対して抗 PAR2 抗体を用いた WB を実施したところ、WT マウス由来精子における PAR2 発現および PAR2KO マウス由来精子での PAR2 発現消失が確認された (図 2A)。また、Fluo-3 を用いてカルシウムイメージングにより精子内のカルシウムイオン濃度の変化を評価したところ、PAR2 アゴニスト添加により精子内カルシウムイオン濃度が増加することが明らかとなった (図 2B)。さらに、血球計算盤上で一辺を通過する精子数を測定することで運動能を評価する光川法で精子運動を評価したところ、PAR2 アゴニスト添加により精子運動が増強される傾向が認められた (図 2C)。

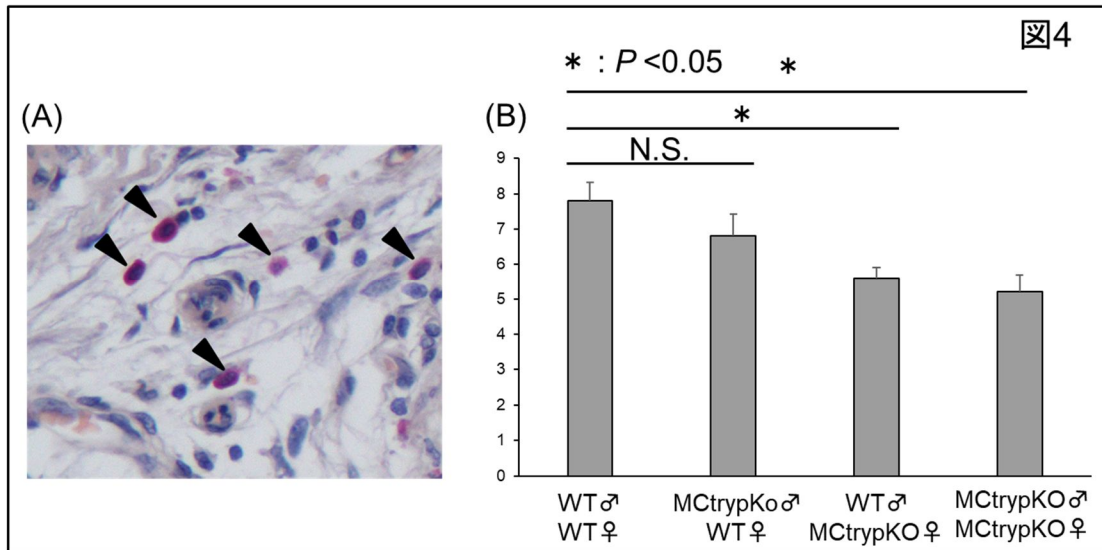


PAR2KO による産子数減少が胚発生の異常に基づくものである可能性も考えられたため、WT マウスと PAR2KO マウスを交配した際の着床痕を評価することで受精後の着床数減少が起こっているか評価した。膣栓確認後 5 日目に Evans blue を静脈内投与し着床痕数を測定したところ、PAR2KO マウスの雄を用いた場合に着床痕数の減少が認められた (図 3A, B)。PAR2 が精子運動の増強を介して受精能の向上に参与しているか検討するために、前培養した WT マウスの精子に PAR2 アゴニストを添加した後に過排卵処理により得た WT マウスの卵子と共培養し、洗浄後に第二極体を放出し雌性前核および雄性前核を内包している卵子を受精卵とした場合の受精率を算出した。その結果、PAR2 アゴニストを添加した



場合に受精率が向上する傾向が認められたが、有意差は認められなかった (図 3C)。

精子運動の獲得は雌性生殖路内で起こることから、精子運動を増強させる PAR2 のリガンドは雌由来である可能性が考えられる。そこで、PAR2 のリガンドであるトリプターゼを産生する肥満細胞の雌性生殖器での局在を CAE 染色を用いて検討したところ、子宮内膜の粘膜固有層において肥満細胞が存在していることが確認された (図 4A)。肥満細胞由来トリプターゼが実際に PAR2 のリガンドとして産子数に影響を与えているか検討するために肥満細胞特異的トリプターゼ欠損マウス (MCtryp KO) を WT マウスと交配した際の産子数を評価したところ、MCtryp KO の雌を用いた場合に産子数が減少することが明らかとなった (図 4B)。



本研究において、雄マウスの PAR2 欠損が産子数および着床数を減少させることを明らかにした。精子に PAR2 が発現していることから、受精から着床までの過程において PAR2 が重要な役割を担っている可能性が示唆される。精子 PAR2 の活性化は活発な鞭毛運動に必要なカルシウムイオンの増加を引き起こしていたこと、また実際に精子の運動能が増強される傾向が認められたことから、精子の PAR2 活性化は精子運動を促進させることで受精能を向上させている可能性が示唆された。しかし、体外受精実験においては PAR2 活性化が受精率を向上させる傾向は認められたものの有意差が認められなかったことから、精子 PAR2 が実際に受精に関与しているかはさらなる検討が必要である。PAR2 活性化のリガンドとして肥満細胞トリプターゼが考えられるが、子宮内膜に肥満細胞が局在していること、また雌マウスの肥満細胞特異的トリプターゼ欠損により産子数が減少することから、精子 PAR2 は子宮内の肥満細胞由来トリプターゼによって活性化されている可能性が考えられる。これらの知見は男性不妊の治療において PAR2 が新たな治療標的となる可能性を示しており、臨床応用に向けてさらなる検討を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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