

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19569

研究課題名（和文）精巣上体のプロテアーゼを標的にした男性用避妊薬の開発

研究課題名（英文）Development of male contraceptives that target proteases in the epididymis

研究代表者

宮田 治彦（Miyata, Haruhiko）

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：50604732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：精巣で作られたばかりの精子は受精能を持たない。精子は精巣上体を移行する過程で、精子の運動能や雌の生殖路移行能、卵子透明帯（卵子の周りにある細胞外マトリックス）への結合能を獲得し、受精が可能になる（精子成熟過程）。本研究では、精子成熟過程に関与するタンパク質の阻害剤を雄マウスに投与すると、精子運動能や卵子透明帯への結合能が低下し、雄マウスが可逆的に不妊になることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では年間約20万件もの人工妊娠中絶が行われており、その理由の1つとして望まない妊娠が挙げられる。米国でも約50%が予定外の妊娠とされ、約半数で人工妊娠中絶が行われている。この状況を改善するには、効果的な避妊法の開発や普及が急務である。しかし、女性用避妊薬が存在する一方、男性用避妊薬の開発は成功していない。本研究では、精子成熟過程に関与するタンパク質を標的にすれば、短期間で効果があり、かつ可逆的な男性用避妊薬の開発につながることを示せた。

研究成果の概要（英文）：Spermatozoa generated in the testis are not capable of fertilizing eggs. During the process of migration through the epididymis, spermatozoa acquire motility, the ability to migrate through the female reproductive tract, and the ability to bind to the zona pellucida (extracellular matrix surrounding eggs), and fertilization becomes possible (sperm maturation process). In this study, we found that treatment of male mice with an inhibitor of a protein involved in the sperm maturation process reduced sperm motility and binding ability to the zona pellucida, resulting in a reversible decrease in male fertility.

研究分野：生殖生理

キーワード：男性用避妊薬 精巣上体 プロテアーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では年間約 20 万件もの人工妊娠中絶が行われており、その理由の 1 つとして望まない妊娠が挙げられる。米国でも約 50%が予定外の妊娠とされ、約半数で人工妊娠中絶が行われている。この状況を改善するには、効果的な避妊法の開発や普及が急務である。現在、最も普及している避妊法はコンドームであるが、装着を怠るケースや破損により、数%の確率で妊娠するリスクがある。また女性用避妊薬（ピル）が存在する一方、男性用避妊薬の開発は成功していない。男性の場合、精管結紮術（パイプカット）という選択肢があるが、外科的手術が必要である。避妊を女性だけに頼るのは男女平等の観点からも望ましくなく、男性が自身で生殖能力をコントロールできる男性用避妊薬の開発が望まれている。

綿実に含まれるゴシポールは、古くから男性用避妊薬の候補とされてきたが、服用を中止しても生殖能力が回復しないことがあるため、実用化には至っていない。近年、JQ1 という化合物が可逆的な避妊薬の候補として報告されているが（文献 ）、JQ1 は精子形成を阻害するため精巣が萎縮してしまう。また約 5 週間かかる精子形成過程を標的にしているため、効果が現れるまでに時間がかかる。

そのような状況の中、申請者は精子特異的に局在する脱リン酸化酵素（精子カルシニューリン）の解析から、精巣の精子形成過程ではなく、精巣上体での精子成熟過程が男性用避妊薬の標的として有望であること明らかにした（文献 ）。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A (CsA) や FK506 は、臓器移植後の免疫抑制剤として広く用いられているが、これらの薬剤を投与すると 2 週間で雄マウスは不妊になり、さらに投薬を中止すると 1 週間で生殖能力が回復した。CsA や FK506 は精子成熟過程（約 1 週間）を標的にしているため短期間で効果があり、JQ1 で認められた精巣萎縮も起こらない。しかし、精子カルシニューリンは体細胞で発現するカルシニューリンと相同性が高く、体細胞型を阻害すると免疫機能を抑制してしまう問題点があった。そのため、男性用避妊薬の標的として、精子成熟過程に必須な新たな分子の解明が期待されていた。

そこに登場したのが、精巣上体特異的に発現し、精子成熟に必須なプロテアーゼ（OVCH2:ovochymase 2）である（文献 ）。

2. 研究の目的

短期間で効果があり、かつ可逆的な男性用避妊薬の開発に向けて、精巣上体の精子成熟過程を阻害する化合物を探索する。

3. 研究の方法

DEC-Tec (DNA-Encoded Chemistry Technology) (文献) と呼ばれる手法を用いて、OVCH2 など精子成熟過程に関与する分子の阻害剤を探索する。DEC-Tec では、異なる DNA 配列で標識した (DNA コード) 小分子化合物を準備し、標的タンパク質に結合した化合物を DNA 配列のシーケンスによって特定する。阻害剤の候補化合物が見つかった場合は、化合物を雄マウスに投与し、生殖能力への影響を調べる。

4. 研究成果

精子成熟過程を阻害する新たな小分子化合物を見つけることはできなかった。一方で、OVCH2

の上流に存在するタンパク質の阻害剤（阻害剤 A）を用いると、精子成熟過程を可逆的に阻害できることが分かった。

(A) 生殖能力

阻害剤 A を野生型の雄マウスに投与したところ、投与開始後 2 週間で生殖能力が低下し、投与開始後 3 週間で雄マウスは不妊になった。体外受精を行ったところ、阻害剤を 3 週間投与したマウスの精子では卵子透明帯への結合能が失われていた。さらに、阻害剤を投与したマウスでは精子運動性が低下していた。これらの結果は、阻害剤投与により精子成熟過程が阻害されていることを示唆している。また、阻害剤の投与を中止したところ、投与中止後 2 週間で生殖能力が一部回復し、投与中止後 3 週間で生殖能力が完全に回復した。

(B) 精巣上体の形態

化合物 A を野生型の雄マウスに 3 週間投与し、精巣の重量や組織切片を解析したところ、明らかな異常は認められなかった。一方、精巣上体の組織切片では、イニシャルセグメントの上皮の退縮が認められた。これは既に報告されている阻害剤標的分子のノックアウト (KO) マウスと同じ表現型である。また、阻害剤の投与を中止して 3 週間後に精巣上体のイニシャルセグメントを観察したところ、上皮は厚くなり、正常な状態に戻っていた。この結果は、投与中止から 3 週間で雄マウスの妊孕性が回復することと一致している。

(C) 精子成熟過程に關与するタンパク質

ウェスタンブロットを用いて調べたところ、阻害剤 A を 3 週間投与したマウスの精巣上体では、OVCH2 の量が有意に減少していた。一方で、薬剤投与を中止して 3 週間後の精巣上体では OVCH2 の量が回復していた。さらに阻害剤 A を投与したマウスを調べたところ、透明帯結合に關与する精子タンパク質のプロセッシングも異常であった。これらの表現型も阻害剤標的分子の KO マウスと同じであり、阻害剤を投与した雄マウスが不妊になるのは、標的分子が制御する経路が阻害されるためだと考えられる。

本研究課題では、精巣上体の OVCH2 を標的にした男性避妊薬の候補分子を見つけることはできなかった。しかしながら、OVCH2 の上流に存在するタンパク質の阻害剤を 3 週間投与すると、精巣上体イニシャルセグメントの上皮が退縮し、雄マウスが可逆的に不妊になることを明らかにした。阻害剤を投与したマウスでは精巣上体の OVCH2 の量が有意に減少していた。さらに、透明帯への結合不全や精子運動性低下など精子成熟過程が異常になっていた。精巣上体イニシャルセグメントの肥厚に關与する分子や、その下流の分子を特異的に阻害することができれば、短期間で効果があり、かつ可逆的な男性避妊薬の開発につながることを示せた。

<引用文献>

① Matzuk MM, McKeown MR, Filippakopoulos P, Li Q, Ma L, Agno JE, Lemieux ME, Picaud S, Yu RN, Qi J, Knapp S, Bradner JE. Small-molecule inhibition of BRDT for male contraception. *Cell*. 2012;150(4):673-84. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.045.

② Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science*.

2015;350(6259):442-5. doi: 10.1126/science.aad0836.

③ Kiyozumi D, Noda T, Yamaguchi R, Tobita T, Matsumura T, Shimada K, Kodani M, Kohda T, Fujihara Y, Ozawa M, Yu Z, Miklossy G, Bohren KM, Horie M, Okabe M, Matzuk MM, Ikawa M. NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility. *Science*. 2020;368(6495):1132-1135. doi: 10.1126/science.aay5134.

④ Goodnow RA Jr, Dumelin CE, Keefe AD. DNA-encoded chemistry: enabling the deeper sampling of chemical space. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(2):131-147. doi: 10.1038/nrd.2016.213.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Oyama Yuki, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Larasati Tamara, Fujihara Yoshitaka, Ikawa Masahito	4. 巻 21
2. 論文標題 TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12467	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 Kaneda Yuki, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Oyama Yuki, Iida-Norita Rie, Ikawa Masahito	4. 巻 488
2. 論文標題 IRGC1, a testis-enriched immunity related GTPase, is important for fibrous sheath integrity and sperm motility in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 104 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2022.05.011	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 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Tokuhiko Keizo, Iida-Norita Rie, Noda Taichi, Fujihara Yoshitaka, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 Testis-enriched ferlin, FER1L5, is required for Ca ²⁺ -activated acrosome reaction and male fertility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eade7607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade7607	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 Iida Norita Rie, Miyata Haruhiko, Kaneda Yuki, Emori Chihiro, Noda Taichi, Nakagawa Tatsuya, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of humanized LDHC knock in mice as a tool to assess human LDHC targeting contraceptive drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 andr.13359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.13359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaneda Yuki, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Oura Seiya, Ikawa Masahito	4. 巻 -
2. 論文標題 Testis specific proteins, TSNAXIP1 and 1700010114RIK, are important for sperm motility and male fertility in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 andr.13378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyata Haruhiko, Oura Seiya, Morohoshi Akane, Shimada Keisuke, Mashiko Daisuke, Oyama Yuki, Kaneda Yuki, Matsumura Takafumi, Abbasi Ferheen, Ikawa Masahito	4. 巻 118
2. 論文標題 SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2106673118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2106673118	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 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Oyama Yuki, Oura Seiya, Noda Taichi, Ikawa Masahito	4. 巻 148
2. 論文標題 FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199644	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮田治彦、大浦聖矢、諸星茜、嶋田圭祐、増子大輔、大山裕貴、金田侑樹、松村貴史、Abbasi Ferheen、伊川正人
2. 発表標題 SPATA33はカルシニューリンをミトコンドリアに局在させることにより精子運動性を制御する
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 第41回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田治彦、大浦聖矢、諸星茜、嶋田圭祐、増子大輔、大山裕貴、金田侑樹、松村貴史、Abbasi Ferheen、伊川正人
2. 発表標題 SPATA33はカルシニューリンをミトコンドリアに局在させることにより精子運動性を制御する
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学微生物病研究所 遺伝子機能解析分野HP
https://egr.biken.osaka-u.ac.jp/achievement/original_articles

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		
米国	ベイラー医科大学		