

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659726

研究課題名(和文)精子運動を亢進し受精率を改善する薬剤開発を目指したトランスレーショナル・リサーチ

研究課題名(英文)Translational research aiming at drug development to enhance sperm motility, and to improve the fertility rate.

研究代表者

杉原 一廣(Sugihara, Kazuhiro)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：GWRQは、野生型マウス精子を活性化したが、ノックアウト・マウスの精子は活性化しなかった。次にEBGを用いて、インフォームドコンセントを得て採取したヒト精子を処理すると、c-AMPおよびカルシウム流入を増加させ、精子の運動能を亢進できることが判明した。また、質量分析で、精子に関連するポリラクタサミンが硫酸化されフコシル化されていることを明らかにした。さらに、EBG処理前後の精巣上体の免疫組織化学でポリラクタサミンが上皮細胞から精液へ分泌されることも確認した。現在、精子運動を活性化することにより受精率を改善する方法がない。本研究で明らかになった成果は、IVF-ETに活用でき臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：GWRQ enhanced motility of spermatozoa from wild type but not trophinin null mice. CASA showed that GWRQ enhanced both progressive motility and rapid motility in wild type mouse sperm. FGF and their receptors are expressed in a variety of mammalian tissues, playing a role in development and cell proliferation. While analyzing human sperm motility, we found that sperm treated with EBG, which specifically polyLacs, enhanced motility. Mass spectrometry analysis revealed that sperm-associated polyLacs are heavily fucosylated, consistent with Lewis Y antigen. Immunohistochemistry of epididymis using an anti-Lewis Y antibody before and after EBG treatment suggested that polyLacs carrying the Lewis Y epitope are synthesized in epididymal epithelia and secreted to seminal fluid. EBG-treated sperm elevated cAMP levels and calcium influx, indicating activation of fibroblast growth factor signaling. Seminal fluid polyLacs bound to FGFs in vitro, and impaired FGF-mediated signaling in HEK293T cells.

研究分野：生殖医療、婦人科腫瘍

キーワード：生殖医学 トランスレーショナル・リサーチ

1. 研究開始当初の背景

不妊症の患者数は230万人以上とされ、少子・高齢化の背景から生殖医療にも様々な対応が求められている。これまでに、精子活性化剤として、金属キレート剤や抗酸化剤等が他者から報告され、一部臨床にも利用されているが、メカニズムを明確に解明した上での活性化剤ではなく、単に添加した結果にすぎないことから、受精率向上に期する効果は定かではないと言わざるを得ない。しかしながら、挙児希望の夫婦にとっては、光明と映るほど新たな薬剤が望まれている。精子運動不全に依る不妊治療の一貫として行なわれる人工受精では、様々な精子運動促進剤が用いられているが、その作用機序や臨床効果が不明であることから、受精向上率は数%にも満たず、未だに受精率向上に有効な方法が存在しないのが実状である。そのため精子運動を向上させるメカニズムの解明と有効な方法が求められているという重大な背景が存在していた。

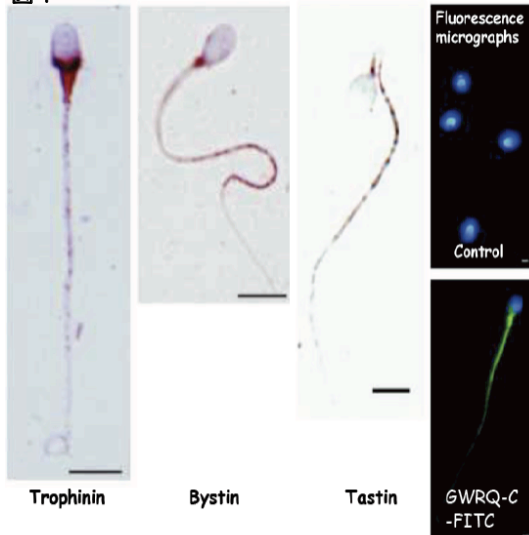
2. 研究の目的

本研究の目的はヒト精子の運動能を高めて人工受精の効率をあげる安全な方法を検討することである。

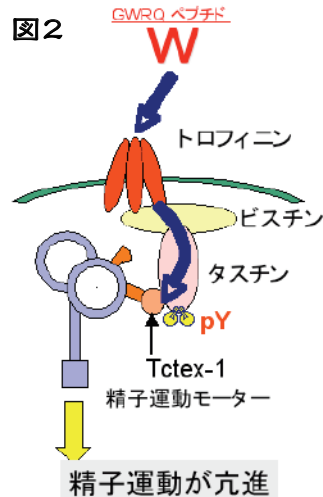
(1)

我々は細胞接着分子“トロフィニン”の研究を進めてきたが、そのなかでトロフィニンに結合するペプチド GWRQ を同定するに至った。さらにヒト精子の尾部分にトロフィニンとその関連分子であるビスチン、タスチンが発現することをそれぞれの抗体を用いて示した。また、GWRQ ペプチドが精子に接着することは Fluorescence micrograph にて検出した(図1 *Hatakeyama S, Sugihara K, et al. *J Urol.*, 180, 767-771, 2008.)。

図1



また、GWRQ ペプチドが精子表面に発現するトロフィニンと結合すると、細胞内のビスチン、タスチンと複合体を形成し、タスチンが ATPase の構成分子であるダイニンと結合し、精子運動能を亢進させる事実をも見いだした(図2)。本研究では GWRQ ペプチドを精子に添加し、活性化された精子に関して検討する。



(2)

以前の研究で、ヒト精子尾部が多量の多糖 (glycans) で覆われ、糖鎖が尾部表面に発現する分子 (トロフィニン) に対する抗体の結合を妨げていたため、糖を加水分解する酵素を添加して分子の局在を示し報告している(*)。研究期間中に糖質ポリラクタミンを加水分解する酵素 Endo- β -galactosidase (EBG) を精液に添加し処理することにより、糖鎖を基部より切断し、精子の運動能に対する作用についても検討する。

3. 研究の方法

(1)

マウスの精子に GWRQ を加え運動能を CASA (computer assisted sperm analyzer) を用いて詳細に分析する。

(2)

EBG を添加して、ヒト精子尾部の糖鎖を除く事により、精子運動能の変化については、細胞内情報伝達系の解析を含め、詳細に検討する。

4. 研究成果

(1)に関する結果

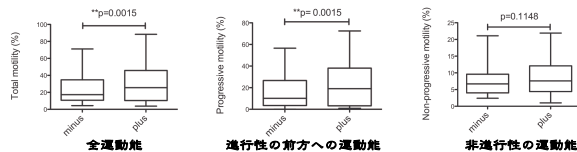
「GWRQペプチドが精子表面に発現したトロフィニンを介して効果を発揮し、運動能を亢進する」という仮説を我々が作成したトロフィニン・ノックアウトマウスより採取したトロフィニン欠損精子を用いて検証した。GWRQペプチドを野生型マウスとトロフィニン・ノックアウトマウスから採取した精子にそれぞれ加えて、CASA (computer assisted sperm analyzer) で運動率を詳細に測定したところ、野生型ではGWRQペプチドにより運動率が亢進したが、トロフィニン欠損マウスの精子では変化がなかった。よって、GWRQペプチドの効果がトロフィニンに依存性である事を確認できた。(Park SK, Sugihara K, et al., *Reprod Biol Endocrin.* 101(10): 1-7 29)

(2)に関する結果

新規に、エンド- β ガラクトシダーゼ (糖鎖ポリラクタミンを加水分解する酵素) を用いて、インフォームドコンセントを得て採取したヒト精子を処理すると、“サイクリックAMPレベル”および“カルシ

ウム流入”を増加させ、精子の運動能を充進できることを見いだした(図3)。

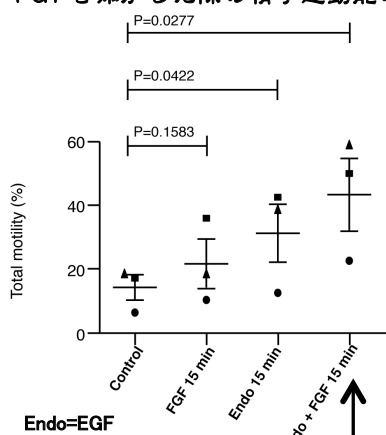
図3 精子にEBGを添加し最適なリコンビナントEBGをスクリーニングする



また、質量分析の解析で、精子に関するポリラクトサミンが硫酸化(sulfated)されフコシル化(fucosylated)されていることを明らかにした。さらに、エンド-βガラクトシダーゼ処理前後の精巣上体の免疫組織化学では、ポリラクトサミンが、精巣上体の上皮細胞によって合成され、精液へ分泌されることも確認した。ポリラクトサミン受容体の候補は、FGFR2を発現するHEK293T細胞を用いた実験により、FGFR2であることが判明した。また、HEK293T細胞と結合するFGF、およびFGFによるFGFR2のチロシンリン酸化は、外因性の精液ポリラクトサミンによって抑制された。以上より、エンド-βガラクトシダーゼとFGFを組み合わせ、精子を処理することで、多糖類に覆われた精子尾部のFGFR2が露出され、EGFの結合により精子の直進運動性が充進することが判明した(図4)。(Sugihara K, et al., *FEBS Lett.* 587: 3195-3201.)

EBG、FGFを添加した際の精子運動能の変化

図4



EBGとFGFを添加すると精子運動率が最も高くなる

臨床現場では、運動率の低い精子を活性化することにより受精率向上を可能とする有効な方法が、未だにないのが現状である。本研究で明らかになった基礎研究の成果は、体外受精・胚移植(IVF-ET)に活用でき、臨床応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

1. Fdukuda MN, Sugihara K: Trophinin in cell adhesion and signal transduction. *Front Biosci* (Elite Ed) 4:342-350. 2012.
2. Fdukuda MN, Sugihara K: Cell adhesion molecules in human embryo implantation. *Sheng Li Xue Bao* 25;64(3):247-258. 2012.

3. Fdukuda MN, Shingo Hatakeyama, Sugihara K: Frontier in tumor glycobiology. Carbohydrate mimetic peptides as research reagent and therapeutic. *Biol. Pharm. Bull* 35(10) 1626-1632. 2012.
4. Kato M, Itoh H, Nagahashi K, Izima M, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Kanayama N: Reduction in Levels of Maternal Complements during Delivery by Cesarean Section. *J Obstet Gynaecol Res* 38(1):165-71. 2012.
5. Suzukin K, Itoh H, Muramatsu K, Yamazaki K, Nagahashi K, Furuta N, Tamura N, Uchida T, Sugihara K, Sumimoto K, Kanayama N: Transient ligation of umbilical vessels elevates placental tissue oxygen index(TOI) values measured by near-infrared spectroscopy (NIRS) in clawn miniature pig animal model. *Clin Exp Obstet Gyn* 39 (3):293-298. 2012.
6. Furuta N, Yaguchi C, Itoh H, Morishima Y, Tamura N, Kato M, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Kawabata Y, Suzuki N, Sasaki T, Horiuchi K, Kanayama N: Immunohistochemical Detection of Meconium in the Fetal Membrane, Placenta and Unbilical Cord. *Placenta* 33(1):24-30. 2012.
7. Horikosi Y, Itoh H, Kikuchi S, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Kanayama N, Mori A, Uemoto S: Successful living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure that manifested immediately after cesarean delivery. *ASAIO JOURNAL* 58(2): 174-176. 2012.
8. Shibata TK, Matsumura F, Wang P, Yu S, Chou CC, Khoo KH, Kitayama K, Akama TO, Sugihara K, Kanayama N, Kojima-Aikawa K, Seeberger PH, Fukuda M, Suzuki A, Aoki D, Fukuda MN: Identification of mono- and di-sulfated N-acetyl-lactosaminyl oligosaccharide structures as epitopes specifically recognized by humanized monoclonal antibody HMOCC-1 raised against ovarian cancer. *J Biol Chem* 287(9):6592-6602. 2012.
9. Park SK, Yoon J, Wang L, Shibata TK, Motamedchaboki K, Shim KJ, Chang MS, Lee SH, Tamura N, Hatakeyama S, Nadano D, Sugihara K, Fukuda MN: Enhancement of mouse sperm tail motility by trophinin-binding peptide. *Reprod Biol Endocrin* 101(10): 1-7 29 2012.

10. Ozawa H, Asahina T, Murakami H, Yaguchi C, Kohmura Y, Kohno E, Hirano T, Horiuchi K, Tamura N, Sugihara K, Ooi H, Kanayama N:
Zinc Coproporphyrin I derived from meconium has an antitumor effect associated with singlet oxygen generation.
Fetal Digan Ther 33(2):90-97. 2013.
11. Yamazaki K, Suzuki K, Itoh H, Muaramatsu K, Nagahashi K, Tamura N, Uchida T, Sugihara K, Maeda H, Kanayama N:
Cerebral oxygen saturation evaluated by near-infrared timeresolved spectroscopy (TRS) in pregnant women during cesarean section –A promising new method of maternal monitoring -
Clin Physiol Funct I 33(2):109-116 2013.
12. Kohmura YK, Kanayama N, Muramatsu K, Tamura N, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Aoe S, Sasaki T, Suganami T, Ogawa Y, Itoh H:
Association between body weight at weaning and remodeling in the subcutaneous adipose tissue of obese adult mice with undernourishment *in utero*.
Reprod Sci 20(7):813-27. 2013.
13. Suzuki-Anekoji M, Suzuki A, Wu SW, Angata K, Murai KK, Sugihara K, Akama TO, Khoo KH, Nakayama J, Fukuda MN, Fukuda M. :
Regulation of steroid hormones by HNK-1 Chst10 *in vivo* in the mouse.
J Biol Chem 288(7): 5007-5016 2013.
14. Kubota K, Itoh H, Tasaka M, Naito H, Fukuoka Y, Muramatsu K, Kohmura KY, Sugihara K, Kanayama N:
Changes of maternal dietary intake, body weight and fetal growth through pregnancy in pregnant Japanese women.
J Obstet Gynaecol Res 39(9):1383-1390 2013.
15. Sugihara K, Shibata TK, Takata K, Kimura T, Kanayama N, Williams R, Hatakeyama S, Akama TO, Kuo CW, Khoo KH, Fukuda MN:
Regulation of human sperm motility by poly lactosamines derived from seminal fluid.
FEBS Lett 587(2013): 3195-3201. 2013.
16. Hatakeyama S, Shibata TK, Tobisawa Y, Ohyama C, Sugihara K, Fukuda MN.: Tumor targeting by a carbohydrate ligand-mimicking Peptide.
Methods Mol Biol 1022:369-86. 2013.
17. Muramatsu-Kato K, Itoh, H, Kohmura Y, Murakami H, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Kanayama N: A Comparison between Placental Gene Expression of 11 β Hydroxysteroid Dehydrogenases and Infantile Growth during at Ten Months.
J Obstet Gynaecol Re 40(2):465-72. 2014.
18. Tamura N, Kimura S, Farhana M, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, toh H, Ikeda T, Kanayama N:
C1 esterase inhibitor activity in amniotic fluid embolism
CRIT CARE MED 42(6):1392-6. 2014.
19. Sugihara K, Kobayashi Y, Suzuki A, Tamura N, Motamedchaboki K, Huang C-T, Akama TO, Pecotte J, Frost P, Bauer C, Jimenez JB, Nakayama J, Aoki D, Fukuda MN:
Development of pro-apoptotic peptides as potential therapy for peritoneal endometriosis.
Nature commun 22;5:4478(:1-9) 2014.
- [学会発表] (計 22 件)
1. Misa Suzuki-Anekoji, Toshiaki K. Shibata, Jun Nakayama, Tomoya O. Akama, Kazuhiro Sugihara, Minoru Fukuda and Michiko N. Fukuda
Targeted drug delivery to tumor vasculature by the IF7 peptide in mouse glioma model.
Joint meeting of the Society for Glycobiology and the American Society for Matrix Biology. 2012年11月11日～2012年11月14日 San Diego, CA. USA
2. 杉原一廣
糖鎖を模倣するペプチド“IF7”による腫瘍血管を標的とする癌治療薬
BioJapan 2012. World Business Forum. 2012年10月10日～2012年10月12日 Pacifico Yokohama, 横浜、神奈川
3. 杉原一廣
糖鎖をmimicするペプチドを用い腫瘍血管内皮細胞を標的とするドラッグデリバリーシステム
第16回日本がん分子標的治療学会学術会 2012年06月27日～2012年06月29日 西日本総合展示場, 北九州, 福岡
4. 杉原一廣
糖鎖をmimicするペプチドを用い腫瘍血管内皮細胞を標的とするドラッグデリバリーシステム
2012年独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センターセミナー (招待講演)
2012年12月07日 つくば, 茨城
5. 杉原一廣

糖鎖をmimicするペプチド「IF7」による腫瘍血管を標的とする癌治療と診断
第42回 Medical Photonics Seminar
(招待講演)
2012年09月07日 浜松, 静岡

6. 杉原一麿, 高田佳世子, 柴田俊章, 伊東宏晃, 金山尚裕
精子運動の活性化と受精率・胚発育率の向上を目指したトランスレーショナル・リサーチ
2012年04月13日～2012年04月15日 神戸ポートピアホテル, 神戸
7. 杉原一麿, 畠山真吾, 柴田俊章, 福田道子
糖鎖をmimicするペプチドIF7を用い腫瘍血管内皮細胞を標的とするドラッグデリバリーシステム
第28回日本DDS学会 2012年07月04日～2012年07月05日 札幌コンベンションセンター, 札幌, 北海道
8. 柴田俊章, 杉原一麿, 福田道子, 鈴木淳, 鈴木直, 金山尚裕, 青木大輔
ヒト型モノクローナル抗体HMOCC-1により特異的に認識されるモノまたはジ硫酸化N-アセチルラクトサミンオリゴ糖構造の同定
婦人科がん分子標的研究会学術集会
2012年06月22日～2012年06月23日 日光市, 栃木県
9. 柴田俊章, 杉原一麿, 福田道子, 鈴木淳, 鈴木直, 金山尚裕, 青木大輔
ヒト型モノクローナル抗体HMOCC-1により特異的に認識されるオリゴ糖構造の同定
第50回癌治療学会学術集会 2012年10月25日～2012年10月27日 パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川県
10. 田村直顕, 木村 聡, 杉原 一麿, 伊東 宏晃, 池田 智明, 金山 尚裕
臨床的羊水塞栓症における C1 インヒビター活性の検討
第65回日本産科婦人科学会学術講演会
2013年05月10日～2013年05月12日 ロイトン札幌他, 北海道
11. Shibata TK, Sugihara K, Fukuda MN, Suzuki A, Kanayama N, Aoki D
Identification of sulfated N-acetyl-lactosaminyl oligosaccharide structures as epitopes recognized by humanized monoclonal antibody HMOCC-1 raised against ovarian cancer.
第65回日本産科婦人科学会学術講演会
2013年05月10日～2013年05月12日 ロイトン札幌他, 北海道
12. 柴田俊章, 杉原一麿, 木村たか子, 高田佳世子, 中村友紀, 俵史子, 金山尚裕

精液へ分泌される糖鎖ポリラクトサミンによる精子運動の調節機構
第31回日本受精着床学会総会・学術講演会
2013年08月08日～2013年08月09日 別府国際コンベンションセンター, 大分

13. 杉原一麿
糖鎖をmimicするペプチドを用い腫瘍血管内皮細胞を標的とするドラッグデリバリーシステム
第11回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013年08月29日～2013年08月31日 仙台国際センター, 東北大学百周年記念会館川内萩ホール, 宮城
14. 杉原一麿
子宮内膜症に対するペプチド治療薬
BioJapan 2013 World Business Forum 2013年10月09日～2013年10月11日 パシフィコ横浜, 神奈川県
15. 杉原一麿
腫瘍血管表面特異マーカーアネキシン1を標的とするIF7を用いた抗腫瘍薬
BioJapan 2013 World Business Forum (招待講演) 2013年10月09日～2013年10月11日 パシフィコ横浜, 神奈川県
16. 杉原一麿
ペプチド創薬
第5回 Japan Endometriosis Forum (招待講演) 2013年11月02日～2013年11月02日 ハイアットリージェンシー大阪, 大阪
17. Misa Suzuki-Anekoji, Jiunn-Chern Yeh, Motohiro Nonaka, Toshiaki K. Shibata, Jun Nakayama, Tomoya O. Akama, Kazuhiro Sugihara, Minoru Fukuda, Michiko N. Fukuda
Targeted drug delivery to brain tumor vasculature by carbohydrate mimetic peptide in mouse glioma model.
The 2013 Annual Conference of the Society for Glycobiology 2013年11月17日～2013年11月20日
18. Shingo Hatakeyama, Toshiaki K. Shibata, Yuki Tobisawa, Chikara Ohyama, Kazuhiro Sugihara, and Michiko N. Fukuda
Humana Press, Inc. Molecular Biology Research Materials. 2012. St. Petersburg Florida, USA
19. Sugihara K, Shibata TK, Akama TO, Kuo C-W, Khoo K-H, Fukuda MN
Attenuation of fibroblast growth factor signaling by poly-N-acetyl-lactosamine type glycans implicated to human sperm motility.

The 2013 Annual Conference of the Society for Glycobiology 2013年11月17日～2013年11月20日 St.Petersburg Florida, USA

20. 柴田俊章, 杉原一廣, 高田佳世子, 中村友紀, 伊東宏晃, 金山尚裕
精液へ分泌される糖鎖ポリラクトサミンによる精子運動の調節機構
日本産科婦人科学会第66回学術講演会
2014年4月18日～2014年4月20日、東京
21. 柴田俊章, 杉原一廣, 田村直顕, 金山尚裕
精液へ分泌される糖鎖ポリラクトサミンによる精子運動の調節機構
第59回日本生殖医学学会学術講演会 2014年12月4日～2014年12月5日、東京
22. Shibata T, Sugihara K, Kanayama N
Attenuation of fibroblast growth factor signaling by poly- N- acetylactosamine type glycans implicated to human sperm motility.
62nd Annual Meeting of the Society for Reproductive Investigation (SRI). 2015年3月25日～2015年3月28日 San Francisco, California. USA

〔図書〕(計4件)

1. Shingo Hatakeyama, Toshiaki K. Shibata, Yuki Tobisawa, Chikara Ohyama, Kazuhiro Sugihara, and Michiko N. Fukuda
Humana Press, Inc. Molecular Biology Research Materials. 2012
2. 杉原一廣
金原出版 産婦人科の実際 181-187 2012.
3. 畠山真吾, 柴田俊章, 田村直顕, 飛澤悠葵, 米山徹, 杉原一廣, 大山力, 福田道子
医学図書出版 泌尿器外科 2013.
4. FukudaMN, Sugihara K, Akama TO
SpringerReference. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. 2014.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 発明名称:精子活性化剤およびそれを用いた活性化方法

発明者: 杉原一廣, 福田道子

権利者: 浜松医科大学

種類: 特許

番号: 2012-206711

出願年月日:

平成24年9月20日

国内外の別:

日本

平成26年度 各国移行中

〔その他〕

ホームページ等

1. 浜松医科大学 教員総覧 杉原一廣
http://www.hama-med.ac.jp/uni_introduction_report_souran_07161504.html
2. 「バイオビジネスアワード」受賞について(知財活用推進本部)
http://www.hama-med.ac.jp/uni_topics_2013022.html
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
杉原一廣 (SUGIHARA, KAZUHIRO)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号:00265878
- (2) 研究分担者
金山尚裕 (KANAYAMA, NAOHIRO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号:70204550