

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462544

研究課題名(和文) 遺伝子診断にもとづいた治療薬の開発

研究課題名(英文) Effective compounds for male infertility patients with reference data for a noninvasive genetic diagnosis

研究代表者

田中 宏光 (Tanaka, Hiromitsu)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：10263310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)雄性不妊症疾患モデルマウスを用いて、体外受精率を上げる新規化合物のスクリーニングを行い、2)甘草を用い、受精率を上げる体外受精の系の開発を進めた。その結果、不妊症マウスの人工授精率を上げる化合物を同定した。また、甘草の成分の内、イソリクイリチゲニンとホルモノネチンが、マウスの体外受精において有効成分であることを明らかにした。甘草の体外受精培地への添加は、胚発生および個体の正常な発生を害さず、さらに、甘草が牛の体外受精において胚発生に有効であることが明らかにした。これらの研究成果によって、男性不妊症遺伝子診断にもとづき、不妊症に効果的な化合物が提供できることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：Our diagnostic approach enabled us to identify genetic factors in ~10% of male infertility patients. Furthermore, we found that licorice, which is used as an herbal medicine, increased fertility in mice. In this study, we screened novel chemical substances for in vitro fertilization (IVF) effects using an animal model of male infertility with a specific haploid germ cell gene deficiency. We also analyzed the mechanism underlying the effect of licorice. As a result, we identified a novel peptide that restored fertilization by IVF in male infertile mice (manuscript in preparation). Isoliquiritigenin and formononetin were isolated from licorice as active compounds for IVF. These compounds did not introduce abnormalities in embryogenesis, and both were effective in embryogenesis after IVF in a cow. Our findings demonstrate that effective compounds can be offered to male infertility patients based on the results of a noninvasive genetic diagnosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アンドロロジー 男性不妊症 精子形成 精薬 人工授精 遺伝子 生薬 生殖細胞

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年、自然界の様々な生物の性の異常や生殖能力の低下が報告され、ヒトにおいても精液中の精子数が減少している。また、先進国では**5組のカップルに1組以上が不妊症と報告されている**。不妊症の約半数が男性側の要因であり、男性不妊症の約半数が原因不明の男性不妊症である。

近年では晩婚化が進行し、年齢を考慮すると不妊治療は迅速に施されることが望まれており、不妊症患者の病因の詳細な検討の時間は少なく、多くが治療の第一に顕微授精 (ISCI) を選択している。

私たちはこれまで、

(1) マウス精子細胞特異的に発現する遺伝子群のクローニングとその機能解析を行い、(2) これら遺伝子群のほとんどがヒトにも保存されていることから、それらをクローニングし、各タンパク質の発現と機能解析を行うと共にゲノム構造の解析を行ってきた。(3) 男性不妊症患者、妊孕性確認男性からの血液及び精液 DNA サンプルを収集し、それら特異的遺伝子の染色体上の一次構造解析を行い、男性不妊症原因遺伝子変異や single nucleotide polymorphisms (SNPs) を明らかにしてきた。(4) 精液中にこれら遺伝子の転写物 (mRNA) やタンパク質が存在することを明らかにし、mRNA やタンパク質を男性不妊症患者と妊孕性の確認された男性で比較検討できることを示した。

これらの結果をもとに、私たちが作成してきたマイクロアレイ、SNPs 診断プローブ、特異的抗体を用い、**原因不明の男性不妊症患者の精液に含まれる染色体 DNA、mRNA、タンパク質に関して組織を用いることなく非侵襲的に解析できる系を確立した。**

その結果、男性不妊症の 10% 以上の患者の原因と考えられる遺伝子の変異と single nucleotide polymorphisms (SNPs) を同定し、容易に原因遺伝子の同定が可能になった。男性不妊症の原因遺伝子として Y 染色体の異常が指摘され、患者の染色体の検査が行われているが、ほとんどの患者は検査では異常は見られず、それ以外の原因が考えられる。私達の成果は、男性不妊症患者の 10% 以上の原因遺伝子突き止められることから、染色体検査に加えることによって、患者に原因情報の提供が可能になった。高度生殖補助医療を受ける患者さんは、治療での経済的、精神的負担の程度についてより正確に予測するため、

また、治療後の子供に対する不安という両面から、不妊症の原因についての情報に興味を持っている。不妊症原因の検査は患者のためにも、今後の不妊症治療の発展のためにも重要である。一方、私たちは、マウスの体外受精の実験系で、生薬の甘草の成分が受精率を上昇されることを明らかにした。

2. 研究の目的

少子化社会対策基本法により、不妊治療に対する地方自治体等による支援制度（治療費補助等）が施行されており、不妊症検査の対象となる患者数の増加が予想される。また、不妊メカニズムの研究や不妊治療に対する支援が法に盛り込まれたことから、今後一層不妊症への社会的関心が高まると考えられる。生殖機能の評価・試験系は、不妊治療薬や避妊薬の開発、男性生殖機能の賦活化を効能とするトクホ、健康食品、サプリメントの開発など、製薬企業や食品メーカーにおける研究開発目的の利用が拡大する可能性が高い。現在のところ、不妊症治療に関する効果的な薬剤は他に無く、これらの研究の進展は、生殖細胞の基礎研究に貢献するだけでなく、臨床の現場に世界的に大きなインパクトになると考えられる。そこで、現在までの遺伝子診断で得られたデータと甘草の不妊症改善効果の関係を明らかにするとともに、男性不妊症治療薬として提供できるように研究を進める。

3. 研究の方法

私たちは、甘草に含まれる成分が試験管内で受精能を向上されることを明らかにし、成分の同定に成功した。これらの事実に関して特許の申請を行った。甘草から試供品レベルの活性画分を調整し、画分から活性物質を同定する。マウスなどの実験動物の体外受精の現場において体外受精が非常に困難なラインの保存時に、活性画分を使用し効果を検討する。同時に私たちがこれまで得た雄性不妊症遺伝子破壊マウスの体外受精に効果を検討する。畜産農家に試供品を提供し、牛などの人工受精時に使用していただき（適時）さらには、現在用いられている甘草経口投与を不妊患者に対して使用していただき、妊孕性回復効果を調べる。活性成分が同定できしだい同様に雄性不妊症に与え効果を調べ、分子生物学の手法を用いて作用メカニズムを解析する。

甘草から、受精率を向上させる生理活性

物質を大量に調整する。

私たちは佐賀県で栽培された高品質の甘草を用い研究を進めてきた。他の品種で当該物質の含有量は不明であるが、少なくとも我が国の佐賀県産の甘草から抽出可能である。当該物質は、甘草の主要な生薬成分であるグリチルリチン酸とは別の画分に分画される。このことから、グリチルリチン酸を抽出した後、廃棄されてきた甘草の画分から大量に抽出可能であり、容易に当該物質を得ることができる。グリチルリチン酸は甘草の地下茎から得られるため、地上茎は刈り取られ廃棄されている。廃棄される地上茎からの当該物質の精製も試みたい。

体外受精において、甘草に含まれるエチルアセテート抽出画分のうち Fr.2 及び Fr.4 に含まれるフラボノイドを添加することで受精率は著しく向上することがわかった。そこで、物質の同定を行う。

体外受精率を上げる生理活性物質を、不妊症マウスに投与し、不妊症が治癒することを明らかにする。

私は、男性生殖細胞の分化について基礎研究を進めてきた。すでに私は6つの遺伝子男性不妊症疾患モデル遺伝子破壊マウスを作製し、その詳細について報告してきた。これらのマウスに当該物質および甘草を経口投与して、その効果を観察し、根拠に基づいた医療(EBM:evidence-based medicine)を実践し、その作用について解析を進め報告する。

私たちが樹立してきた雄性不妊症の遺伝子破壊マウスは、様々な不妊形質を示す。これらの形質はヒト不妊症でも報告されている。これらの各形質を示すマウス精子を用いて体外受精を行い、甘草成分の受精率に対する効果を調べる。

また、私達が所有しない雄性不妊症疾患モデルマウスも手に入れ、甘草の効果を調べ、ヒト男性不妊症の形質と対応を調べる。解析結果をもとに、ヒト不妊症外来で甘草を試験的に処方していただき臨床データを得る(に対応)。

畜産農家に試供品を提供し、人工受精時に雌牛の膈内に妊孕性の向上についてのデータを得る。

試供品が抽出できしだい、畜産農家に出向き、人工受精時に甘草エキスをいれ受精率の向上が見られるか調べる。もしくは体外受精時に使用して受精卵を子宮に戻していただく。ある畜産農家では、人工受精前に餌に甘草を与える習慣がある。このような農家に赴き、活性画分を用いていただく。

不妊症クリニックに試供品とデータを

提供し、常用されている安全性の確保された範囲内で経口投与し、不妊症の治療に関するデータを収集する。

私たちは、日本生殖医学会 日本実験動物学会等で活動を行ってきた。すでに、私たちの物質についての問い合わせがあることから、臨床試験を進めていただける不妊症クリニックを探し、ボランティアの患者さんを募り、データの収集を行った。

4. 研究成果

上記の研究計画に従い、研究を進めることができた。その結果、体外受精において受精卵を得ることができない雄性不妊症疾患モデルマウスの精子を用いて、体外受精の培地に転嫁することにより受精卵を得ることができる新規化合物を同定した(論文投稿準備中)。また、2)甘草の抽出物に含まれる、体外受精に効果のある化学物質を同定し、体外受精に効果的な条件を報告することができた(論文 2. Tung HN, et al., Biochem Biophys Res Commun 467, 447-450, 2015) これらの結果に関しては、特許を取得した。これらの結果から、遺伝子診断によって、男性不妊症の原因を把握し、最適な治療法を提供できることを明らかにした。私たちはすでに男性不妊症の10%以上の原因遺伝子を同定できる系を確立している。さらに不妊症治療に効果がある安全な化学物質を同定し、多くの男性不妊症患者さんに提供できるように研究を進展させたい。

報告書末に治療法のイメージを図で示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14件)

以下の論文は、すべて査読有

1. Tanaka H, et al. SNPs within the Intron-less TAF7 Gene Encoding a General Transcription Factor in Japanese Males. Nagasaki Int Univ Rev 15, 197-201 (2016). doi: in preparation
2. Tung HN, Shoyama Y, Wada M, Tanaka H. Two activators of in vitro fertilization in mice from licorice. Biochem Biophys Res Commun 467, 447-450 (2015). doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.088
3. Fujimoto K, Fujii G, Taguchi K, Yasuda K, Matsuo Y, Hashiyama A, Mutoh M, Tanaka H, Wada M. Involvement of trefoil factor family 2 in the enlargement of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. Biochem Biophys Res Commun 463, 859-863 (2015).

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.025

4. Okuda H, Kiuchi H, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N, Miyata H, Okabe M, Ikawa M, Kawakami K, Goshima N, Wada M, Tanaka H. A novel transcriptional factor Nkapl is a germ cell-specific suppressor of Notch signaling and is indispensable for spermatogenesis. *PLoS One* 10, e0124293 (2015).
doi: 10.1371/journal.pone.0124293

5. Tanaka H, et al. Discovery of a TEKTIN-t/TEKT2 Gene Variant Encoding Sperm Flagellar Protein in Japanese Males. *Nagasaki Int Univ Rev* 15, 167-173 (2015).
<http://library.niu.ac.jp/NiuDA/RNS/PDF/RN15-015.pdf>

6. Matsubara Y, Kato T, Kashimada K, Tanaka H, et al. TALEN-mediated gene disruption on Y Chromosome reveals Critical Role of EIF2S3Y in Mouse Spermatogenesis. *Stem Cells Dev* 24, 1164-1170 (2015).
doi: 10.1089/scd.2014.0466

7. Tanaka H, et al. Genetic Variation in the Testis-Specific Poly(A) Polymerase Beta (PAPOLB) Gene Among Japanese Males. *The Open Reprod Sci J* 7, 1-4 (2015).
DOI: 10.2174/1874255601507010001

8. Miyagawa Y, Soda T, Takezawa K, Fukuhara S, Kiuchi H, Tanaka H, Nonomura N. Male Infertility and Single Nucleotide Polymorphisms of the Novel Sex-linked Testis-specific Retrotransposed PGAM4 Gene. *J Urol* 193:e990-e991 (2015).
doi: 10.1371/journal.pone.0035195

9. Arroteia KF, Barbieri MF, Souza GH, Tanaka H, et al. Albumin is synthesized in epididymis and aggregates in a high molecular mass glycoprotein complex involved in sperm-egg fertilization. *PLoS One* 9:e103566 (2014).
doi: 10.1371/journal.pone.0103566

10. Tung HN, Shoyama Y, Wada M, Tanaka H. Improved in vitro fertilization ability of mouse sperm caused by the addition of licorice extract to the preincubation medium. *The Open Reprod Sci J* 6, 1-7 (2014).
DOI: 10.2174/1874255601406010001

11. Tanaka H, et al. Genetic Variation in the Testis-Specific GSG3/CAPZA3 Gene Encoding for the Actin Regulatory Protein in Infertile Males. *Nagasaki Int Univ Rev* 14, 269-274 (2014).

<http://library.niu.ac.jp/NiuDA/RNS/PDF/RN14-025.pdf>

12. Okuda H, Tsujimura A, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, Takada S, Miyagawa Y, Tanaka H, et al. Standardized diagram improves diagnostic accuracy and variability in the identification of testicular cells prepared for testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Urology* 82:589-594 (2013).
doi: 10.1016/j.urology.2013.05.023

13. Tanaka H, et al. Nucleotide Polymorphism Analysis of Testis-specific CETN1 in Human Male Infertility. *The Open Androl J* 5:1-5 (2013).
DOI: 10.2174/1876827X01305010001

14. Fujimoto K, Fujii G, Mutoh M, Yasunaga M, Tanaka H, Wada M. Suppression of intestinal polyp development in ApcMin/+ mice through inhibition of P-glycoprotein using verapamil. *Eur J Cancer Prev.* 22:8-10 (2013).
doi: 10.1097/CEJ.0b013e328353ede8

〔学会発表〕(計 15件)

1. 男性不妊症遺伝子診断と治療薬の開発 / 田中宏光 / 2013年5月 BIOtech2013 / 東京

2. 腸管腫瘍サイズの決定に関わる遺伝子の同定 / 藤本 京子、松尾 雄太、橋山 愛里、池田 公平、田中 宏光、和田 守正 / 2013年12月 / 第30回 日本薬学会九州支部大会 / 長崎

3. Apc Min/+ マウスにおいて Guca2A と Tff2 は腸管腫瘍サイズの決定に関与している / 藤本 京子、松尾 雄太、橋山 愛里、池田 公平、田中 宏光、和田 守正 / 2013年12月 / 第36回日本分子生物学会 / 神戸

4. アクチン調節蛋白質遺伝子 Gsg3/CAPZA3 の遺伝子多型解析 / 宮川 康、惣田哲次、奥田英伸、竹澤健太郎、木内 寛、高尾徹也、辻村 晃、野々村祝夫、田中宏光、和田守正 / 日本アンドロロジー学会第33回学術大会・第20回精子形成・精巣毒性研究会 / 2014年6月 / 軽井沢

5. In Vitro Fertilization (IVF) の効率を上げる甘草成分の同定 / 田中宏光 / 2014年12月 / 第59回日本生殖医学会学術講演会 / 東京

6. アクチン調節蛋白質CAPZB3 のヒト精子における発現およびその局在 / 惣田哲次、宮川康、竹澤健太郎、奥田英伸、福原慎一郎、藤田和利、木内寛、野々村祝夫、田中宏光 /

2014年12月 / 第59回日本生殖医学会学術講演会 / 東京

7. 精巣特異的アクチンキャッピングプロテイン 3 の発現とその解析 / 惣田哲次、宮川康、竹澤健太郎、奥田英伸、福原慎一郎、木内 寛、野々村祝夫、田中宏光 / 2015年4月 / 第103回日本泌尿器科学会 / 金沢市

8. フロンティアシンポジウム Andrology 研究の最前線 精巣型アクチン調節蛋白質の基礎的・臨床的解析 / 宮川 康、惣田 哲次、竹澤 健太郎、福原 慎一郎、木内 寛、野々村 祝夫、田中 宏光 / 2015年4月 / 第103回日本泌尿器科学会 / 金沢市

9. Discovery of a TEKTIN-t/TEKT2 Gene Variant Encoding Sperm Flagellar Protein in Japanese Males. Soda T, Miyagawa Y, Takezawa K, Fukuhara S, Fujita K, Kiuchi H, Nonomura N, Tsujimura A, Tanaka H / 2105, April / IFFS/JSRM International Meeting 2015 / Yokohama

10. Male infertility and single nucleotide polymorphisms of the novel sex-linked testis-specific retrotransposed PGAM4 gene. Miyagawa Y, Soda T, Takezawa K, Fukuhara S, Kiuchi H, Okuda H, Tanaka H, Nonomura N / 2015, May / 101th AUA Annual Meeting / New Orleans, Louisiana.

11. ヒト精巣における精巣特異的アクチンキャッピングプロテインの発現解析 / 惣田哲次、宮川 康、上田倫央、竹澤健太郎、福原慎一郎、木内 寛、岡本吉夫、田中宏光、野々村祝夫 / 2015年6月 / アンドロロジー学会第34回学術大会 / 福岡市

12. A novel transcription factor NKAPL is a germ cell-specific suppressor of the Notch signaling pathway and is indispensable for spermatogenesis. Okuda H, Kiuchi H, Miyagawa Y, Nonomura N, Lim S, Jamsai D, O' Bryan M, Tanaka H / 2015, Aug. / ESA/SRB/ANZBMS Joint meeting 2015 / Queensland, Australia.

13. マウス精巣における Transmembrane and coiled-coil domains 5 (Tmco5) の局在様式の解明 / 山瀬堅也、山本恭史、谷川葉子、田中宏光、小宮透 / 2015年12月 / 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 / 神戸

14. Male infertility and single nucleotide polymorphisms of the testis-specific succinyl CoA:3-oxoacid CoA transferase (SCOT-T/OXCT2) gene in Japanese. Tanaka H / 2016, Feb / 7th International Sciences

Conference on Applied Sciences and Engineering / Dubai.

15. マウス In vitro fertilisation (IVF) で受精率を上げる生薬成分の同定 / 田中宏光、正山征洋、辻村晃、宮川康 / 2016年4月 / 第73回九州・沖縄生殖医学会 / 福岡

〔招待講演〕

(計3件)

1. 2013年5月

国立成育医療研究センター研究所 招待講演 「男性不妊症の遺伝子診断にもとづいた治療薬の開発」

2. 2015年6月

アンドロロジー学会第34回学術大会 共催第22回 精子形成・精巣毒性研究会/福岡 教育講演 「精子細胞特異的遺伝子の SNP ディスカバリーと臨床応用」

3. 2016年3月

第21回関東アンドロロジーカンファレンス/東京 特別講演 「精子細胞特異的遺伝子の多型解析と IVF に効果のある生薬成分の臨床応用」

〔図書〕(計2件)

Tanaka H. Fertile ground. International INNOVATION 153:60-62 (2014).

Tung HN, Tanaka H, et al. In vitro Fertilization with Mouse Sperm Activated by Components of Licorice Root Extract. Nat Prod Chem Res 4 :21 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計3件)

名称:人工授精用培地及び同人工授精用培地を用いた人工授精方法

発明者:田中宏光 その他2名

権利者:長崎国際大学

種類:特許

番号:特許第5578682号

国内外の別:国内

名称:人工授精用培地及び同人工授精用培地を用いた人工授精方法並びに妊娠促進剤

発明者:田中宏光 その他2名

権利者:長崎国際大学

種類:特許、番号:特許第5804379号

国内外の別:国内

名称:妊孕性診断方法、妊孕性診断キット、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び抗体
発明者:田中宏光 その他5名

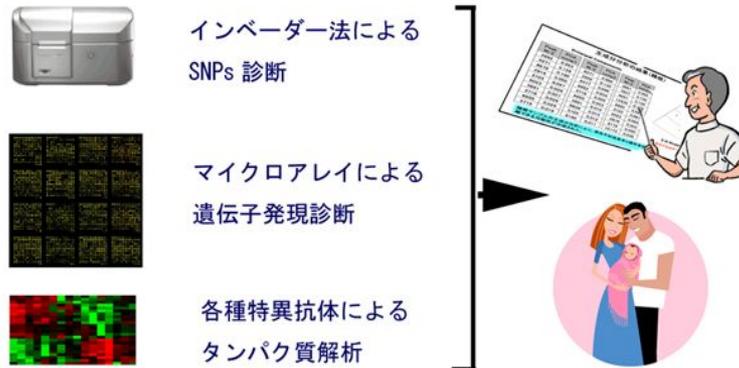
権利者：長崎国際大学 大阪大学 凸版印刷
種類：特許、
番号：特許第 571335 / PCT 出願
PCT/JP2010/001850

(2) 連携研究者
辻村晃 (TSUJIMURA AKIRA)
大阪大学大学院・医学部・准教授
研究者番号：40294053
宮川康 (MIYAGAWA YASUSHI)
大阪大学大学院・医学部・准教授
研究者番号：70362704

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中宏光 (TANAKA HIROMITSU)
長崎国際大・薬学部・准教授
研究者番号：10263310



上：以前までの研究で非侵襲的男性不妊症診断法を確立した。



下：今回の研究において診断に基づいた治療法を開発できた。

