

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670692

研究課題名(和文) 消化管因子による精子・卵子膜融合調節：新しい男性不妊症治療ストラテジーへの萌芽

研究課題名(英文) Binding of sperm and oocyte induced by gut factor: Novel strategy for treatment of male infertility

研究代表者

山田 祐一郎 (Yamada, Yuichiro)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60283610

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)：十二指腸など上部消化管に発現するK細胞から分泌される消化管ホルモンGIPは、膵細胞からのインスリン分泌を促進するのみならず、様々な膵外作用を有している。本研究は、GIP受容体が特異的に発現する精巣に着目し、GIP受容体が精細管の特定のステージに発現していること、これを欠損すると受精能が低下すること、これを欠損する精巣で特異的に発現が低下している因子が存在し、この発現は転写因子CREMによって調節されていること、高脂肪食を摂食させると発現が低下することなどを示し、環境因子と男性不妊症を繋ぐ一因子を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：GIP, which is secreted from endocrine K cells of small intestine, not only stimulates insulin secretion from pancreatic beta-cells but also exerts various extra-pancreatic effects. We have shown that GIP receptors are highly expressed in testis, knockout of GIP receptor leads to decreased artificial fertilization, and expression of factor X is decreased in testis of GIP receptor KO mice and high fat-fed mice, that factor X may be involved in binding of sperm and oocytes. These results suggests that GIP signaling and factor X are participated in male infertility induced by high fat or over-eating.

研究分野：臨床医学、内科学、糖尿病学、内分泌学

キーワード：インクレチン 不妊

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 不妊症は約 1 割のカップルに認められ、その原因の半数は男性不妊症である。男性不妊症の殆どは精子数の減少あるいは精子の受精能の低下などであり、現在これらに対する治療として体外受精や顕微授精などの生殖補助技術が施行されている。しかし、これらの生殖補助技術の身体的・経済的負担は大きく、かつ、それぞれの治療周期に期待できる挙児の確立は患者女性の年齢によって異なるが 20%程度であり(2009 日本産婦人科学会生殖補助技術登録による) 男性不妊症の病態や分子機構について説明はほとんど進展していない。

(2) 精子が透明帯を通過し卵子と結合・膜融合することで、受精が成立する。精子に発現する因子としては Izumo が、卵子に発現する因子としては CD9 が精子と卵子の膜融合に必須であることが報告されているが、その詳細な分子機構は十分に説明されていない。

(3) インクレチンは膵細胞からのインスリン分泌を促進する消化管因子の総称である。その一つである GIP は、食事摂取によりダイナミックに分泌され、食後のインスリン分泌を制御することで糖代謝の恒常性を担っている。研究代表者はこのような GIP の膵作用を示すのみならず(Proc Natl Acad Sci USA 1999 など)、GIP が脂肪細胞では LPL (lipoprotein lipase) 活性の調節に働き、GIP シグナルが低下すると、脂肪細胞への栄養素の取り込みが減少し、脂肪蓄積が減少すること(Nat Med 2002 など)や、骨芽細胞に働きカルシウムの骨への沈着に関与すること(Mol Endocrinol 2006 など)を示してきた。

(4) 本邦では年間約 20 万件の体外受精、顕微授精がおこなわれている。その約半数は男性不妊症であり造精機能、精子機能低下に対する有効な薬物療法が存在しない現在多くの症例に顕微授精法が行われている。顕微授精法は普及した技術であるが、精子を直接注入するこの技術は生理的には不自然な技術であり本法施行後誕生した児にわずかではあるが、染色体異常や胎児奇形などの増加があることが未だ懸念されている。さらに、高度の乏精子症例に関しては外科的な精巣内精子採取もおこなわれているが、本技術の患者への肉体的、精神的負担はきわめて大きい。しかるに、精子機能を向上させる新しい方策は現在も強く求められている。

## 2. 研究の目的

(1) GIP 受容体が精巣に発現していること、ならびに容体欠損マウスの精巣で著明に発現が低下している因子 X に着目し、食事に応じて分泌される消化管因子 GIP が、精子の細胞膜に発現する因子介して、卵子との結合・膜融合を調節しているとの仮説を着想した。

(2) 因子 X の受精における意義を明確にし、既報の Izumo や CD9 に加えて受精の分子機構の解明に寄与することを目的としている。

(3) 因子 X の男性不妊症例における発現とそ

の患者の糖代謝指標との関連調査や肥満・糖代謝異常不妊男性に対する治療的介入により GIP シグナルの活性化によりファクター X の発現を回復させる治療戦略が開発されることによって、見かけ上の精液パラメータは不変であるが、個々の精子の受精能は向上し、患者カップルが負担の大きい生殖補助技術などを施行せずとも自然に妊娠が成立するような好ましい状況がより多く成立することが期待でき、本挑戦によって、男性不妊症に対する患者にやさしい、革新的な全身的な治療戦略が萌芽してゆくことが期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 因子 X を介した精子と卵子の膜融合、ならびに GIP による因子 X の発現調節の 2 つの課題で構成されている。

(2) 因子 X を介した精子と卵子の膜融合に関しては主に以下の研究を行う。

排卵誘発して採取した野生型マウスの卵子、あるいはさらに透明帯を人工的に除去した卵子を用い、GIP 受容体欠損マウスの精子と体外受精させる

因子 X に対する抗体を作製し、免疫染色法で局在を明らかにする。

(3) GIP による因子 X の発現調節については主に以下の研究を行う。

高血糖低インスリン非肥満モデル動物として Akita マウス、高血糖高インスリン肥満モデル動物として ob/ob マウスや高脂肪食誘発肥満マウスを用いる。これらのモデル動物の精巣において因子 X の遺伝子発現を realtime PCR 法で検索する。

因子 X のプロモータ領域をルシフェラーゼプラスミドに結合し、cAMP に応答して因子 X が増加する分子機構を検索する。

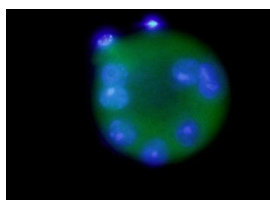
## 4. 研究成果

(1) 因子 X を介した精子と卵子の膜融合に関しては以下の成果が得られた。

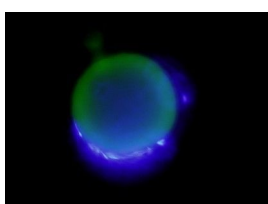
精巣中において GIP 受容体が発現する細胞を同定する目的で、In situ hybridization を行なった。すると、精母細胞～精子細胞に特異的な発色が確認され、GIP 受容体を有する細胞であると考えられた。全ての精子細胞・精母細胞に発現しているのではないことから、精母細胞・精子細胞の分化段階における特定の時期に発現しているのではないかと考え、連続切片にて PAS 染色、HE 染色を追加し、GIP 受容体の発現している精母細胞・精子細胞の分化段階を検討したところ、周期表の VI～VII において特異的に発現していることがわかった。

in vitro での受精実験を行った。透明帯存在下の卵と GIP 受容体欠損マウスの精子の受精率は野生型マウスの精子との受精率よりも有意に低かった。この結果は GIP 受容体欠損マウス精子が透明帯を通過しづらいのか、卵とのフュージョンに問題があるのかを

調べる為に、透明帯除去下において受精実験を行った。透明帯除去下においても同様に、GIP 受容体欠損マウスの精子は野生型精子と比較し、多精子受精は少なく受精率が低下していた(図)。このことは、GIP 受容体欠損マウス精子の受精率が低下する原因は透明帯との結合やその通過の問題ではなく、卵とのフュージョンもしくはそれ以降に問題があるものと考えられた。

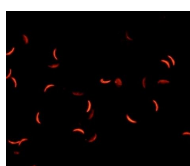


野生型マウス

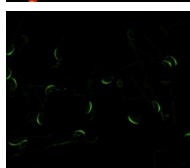


GIP 受容体欠損マウス

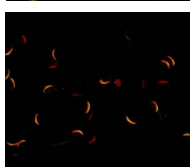
因子 X に対するポリクローナル抗体を作製した。本抗体は因子 X をヘテロログスに発現させた細胞株から抽出した蛋白を用いたウエスタン法で特異的なバンドが検出された。次に、精巣上体から単離した精子を用いて免疫染色法で因子 X の発現する局在を確認したところ、精子頭部に発現していた(図)。アクロゾーム反応後にもその局在が確認された。



抗 Izumo1 抗体



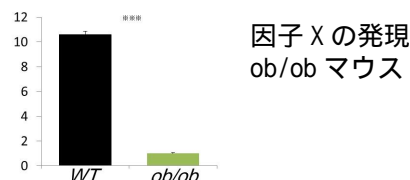
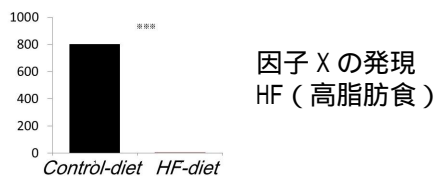
抗因子 X 抗体



マージ

(2) GIP による因子 X の発現調節に関しては以下の成果が得られた。

GIP 受容体ならびに因子 X (図) の遺伝子発現は、高脂肪食負荷マウスや遺伝性の過食モデルであるレプチン欠損 (ob/ob) マウスにおいて著明に低下していた。



因子 X のプロモータ領域を luciferase 発現プラスミドに接続し、因子 X の転写に関わる因子を検索したところ、精子の分化に関する転写因子 CREM によって発現が増強することを明らかにした。

(3) 以上の結果から、精子に発現する因子 X が卵子と結合する重要な因子であることを明らかにするとともに、過栄養が GIP シグナルや因子 X のダウンレギュレーションによって生殖率の低下に繋がることを示すことができた。

#### 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 8 件)

Mikada A, Narita T, Yokoyama H, Yamashita R, Horikawa Y, Tsukiyama K, Yamada Y: Effects of miglitol, sitagliptin, and initial combination therapy with both on plasma incretins' responses to a mixed meal and visceral fat in over-weight Japanese patients with type 2 diabetes. "The MASTER randomized, controlled trial". *Diabetes Res Clin Pract* 106(3) : 538-547, 2014. doi: 10.1016/j.diabres.2014.09.040.

Itoh K, Moriguchi R, Yamada Y, Fujita M, Yamato T, Oumi M, Holst JJ, Seino Y. High saturated fatty acid intake induces insulin secretion by elevating gastric inhibitory polypeptide levels in healthy individuals. *Nutr Res* 34(8):653-660, 2014. doi: 10.1016/j.nutres.2014.07.013.

Miyachi A, Murase T, Yamada Y, Osonoi T, Harada KI. A quantitative analytical method for determining the levels of gastric inhibitory polypeptides GIP1-42 and GIP3-42 in human plasma using LC-MS/MS. *J Proteome Res.* 12(6):2690-99, 2013. doi:

10.1021/pr400069f.

〔学会発表〕(計1件)

清水辰徳、月山克史、佐藤雄大、藤田浩樹、  
成田琢磨、寺田幸弘、山田祐一郎 精巣にお  
ける GIP シグナルの低下は肥満・糖尿病にお  
ける男性不妊をおこす 2014年4月24～26日  
福岡国際会議場(福岡県福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~rounen/incretin.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 祐一郎 (YAMADA YUICHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60283610

### (2) 研究分担者

寺田 幸弘 (TERADA YUKIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10260431