

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860039

研究課題名（和文）受精促進作用を示す環状オリゴ糖を用いた新規不妊治療法の開発

研究課題名（英文）Research on fertility improvement using cyclodextrins

研究代表者

竹尾 透 (Takeo, Toru)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・講師

研究者番号：10517014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、多くの先進国では、晩婚化に伴う生殖環境の悪化により、不妊治療を必要とする患者数が急激に増加している。しかしながら、生殖機能改善に関する研究は、十分に進んでおらず、不妊治療法の開発が遅れている。そこで本研究では、不妊治療へのシクロデキストリンの応用を目指して有用性や作用機序を評価した結果、シクロデキストリンが精子の脂質環境を変化させることによって受精機能を向上することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The number of subfertile and infertile patients is increasing in advanced countries. However, there is no innovative solution to improve their fertility. In this study, we examined the effect of cyclodextrins on the functions of mouse sperm. Methyl-beta-cyclodextrin enhanced fertility and promoted acrosome reaction and hyperactivation by enhancing membrane fluidity with the reduction of cholesterol in sperm membrane. Dimethyl-alpha-cyclodextrin also increased fertility of sperm by induction of lipids efflux from sperm membrane. These results suggest that cyclodextrins is applicable as fertility activator in the in vitro fertilization.

研究分野：生物系薬学、発生生物学、生殖工学

キーワード：不妊 シクロデキストリン 精子 受精能獲得 コレステロール リン脂質 生体膜 体外受精

### 1. 研究開始当初の背景

近年、多くの先進国では、晩婚化に伴う生殖環境の悪化により、不妊治療を必要とする患者数が急激に増加している。しかしながら、生殖機能改善に関する研究は、十分に進んでおらず、不妊治療法の開発が遅れている。

これまでに研究代表者は、生殖機能改善に関する研究を行い、シクロデキストリンが、精子の受精機能を向上させることを明らかにしている。シクロデキストリンとは、グルコースが環状に連なった構造を有する水溶性の化合物である。一方、シクロデキストリンは、分子内に疎水空洞を有するホスト分子であり、空洞内に疎水性化合物を包接することで、安定な複合体を形成することが知られている。シクロデキストリンの超分子的性質は、医薬品、食品および化粧品分野で利用されており、生殖分野においても応用できる可能性がある。

しかしながら、シクロデキストリンによる受精能改善作用に関する詳細なメカニズムは明らかになっておらず、新規不妊治療法として応用するには、生殖細胞への作用機序に関する基礎的情報の収集が必要であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、シクロデキストリンを用いた生殖機能改善法の開発に有用な基礎的知見の収集を目的として、シクロデキストリンが精子の受精能に及ぼす影響や受精機能改善における作用機序の解明を行った。

### 3. 研究の方法

(1)本研究では、精子および卵子を採取するために、C57BL/6 マウスを実験に使用した。マウスを安楽死させた後に、精巣上体尾部を採取し、短期間冷蔵保存した精巣上体尾部から精子を回収して、低受精能精子を調製した。低受精能精子に対して、メチル-β-シクロデキストリン(MBCD)あるいはウシ血清アルブミン(BSA)を処理し、受精能、先体反応誘起率、運動能、生体膜中コレステロール量、生体膜流動性について評価した。

(2)本研究では、精子および卵子を採取するために、C57BL/6 マウスを実験に使用した。安楽死させたマウスから精子を採取し、MBCD、ジメチル-α-シクロデキストリン(DMACD)あるいはBSAを処理して、コレステロール漏出量、リン脂質漏出量、受精能、先体反応誘起率、リピッドラフトの局在変化、各種阻害剤を用いて活性化経路を検討した。

### 4. 研究成果

(1)MBCD は、低受精能精子を用いた体外受精において、受精率を向上させた。MBCD による受精率改善効果は、BSA より高かった。また、MBCD は、受精能獲得時に生じる精子頭部における原形質膜の崩壊現象である先体反応を起こした精子の割合を増加させた。さらに、MBCD 処理精子では、精子頭部の振幅が増加し

ていることが、精子運動能解析装置を用いた解析により明らかになった。MBCD は、精子の頭部、中篇部および尾部のコレステロール量を低下させた。さらに、MBCD 生体膜流動性の増加が生じた。以上の結果から、MBCD は、生体膜中コレステロールの除去による生体膜流動性の上昇を引き起こし、先体反応の誘起や運動機能を向上することで、低受精能精子の受精機能を改善することが示された。本知見は、体外受精技術における MBCD の有用性を示すものであり、マウス以外の動物種への有用性を確認することで、生殖医療や畜産技術への技術応用が期待できる。

(2) MBCD、DMACD および BSA 処理精子は、体外受精における受精率が上昇した。受精率の上昇に要する時間は、MBCD<BSA<DMACD であった。先体反応誘起率は、全ての化合物で上昇した。MBCD および BSA は、コレステロールの漏出量を増加させたのに対して、DMACD はコレステロールの漏出量に変化は認められなかった。一方で、リン脂質の漏出量は、全ての化合物で増加し、特に BSA 及び DMACD において顕著な増加が認められた。阻害剤を用いた検討により、MBCD による受精機能の向上には、Protein kinase A (PKA) 及び Dynamin が関与し、DMACD では PKA、Inositol triphosphate (IP3) 及び Dynamin、BSA では PKA 及び IP3 が関与することが示された。以上の結果から、精子の受精能賦活剤として DMACD の有用性が明らかになり、リン脂質の漏出を介した新たな精子の受精能獲得経路の存在が示唆された。これらの知見は、シクロデキストリンによる受精機能改善の作用機構を明らかにすると共に、シクロデキストリンを活用した不妊治療法に有用な基礎的資料を提供するものである。

### 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 5 件)

Hidetaka Yoshimoto, Toru Takeo, Tetsumi Irie, Naomi Nakagata

Fertility of cold-stored mouse sperm is recovered by promoting acrosome reaction and hyperactivation after cholesterol efflux by methyl-β-cyclodextrin, *Biology of Reproduction*, 査読有, 96, 2017, 446-455

DOI:https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142901

Toru Takeo, Yuka Horikoshi, Satohiro Nakao, Kazuhito Sakoh, Yuta Ishizuka, Aki Tsutsumi, Kiyoko Fukumoto, Tomoko Kondo, Yukie Haruguchi, Yumi Takeshita, Yuko Nakamuta, Shuuji Tsuchiyama, Naomi Nakagata

Cysteine Analogs with a Free Thiol Group Promote Fertilization by Reducing

Disulfide Bonds in the Zona Pellucida of Mice, *Biology of Reproduction*, 査読有, 92, 2016, 1-7.

DOI:

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125443>

**Toru Takeo** and Naomi Nakagata  
Superovulation Using the Combined Administration of Inhibin Antiserum and Equine Chorionic Gonadotropin Increases the Number of Ovulated Oocytes in C57BL/6 Female Mice, *PLoS One*, 査読有, 2015, 10(5)

DOI:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128330>

**Toru Takeo** and Naomi Nakagata  
Application of Cryotechnology to Establish Efficient Research Infrastructure for Genetically Engineered Mice, *Cryobiology and Cryotechnology*, 61, 2015, 査読有, 19-26.

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009959809>

**Toru Takeo**, Naomi Nakagata

El método CARD se consolida como el mejor protocolo de tecnología de la reproducción de ratón, *Animales De Laboratorio*, 65, 査読有, 2015, 17-22.

[https://www.researchgate.net/publication/279848722\\_El\\_metodo\\_CARD\\_se\\_consolida\\_como\\_el\\_mejor\\_protocolo\\_de\\_tecnologia\\_de\\_la\\_reproduccion\\_de\\_raton](https://www.researchgate.net/publication/279848722_El_metodo_CARD_se_consolida_como_el_mejor_protocolo_de_tecnologia_de_la_reproduccion_de_raton)

〔学会発表〕(計 24 件)

**竹尾 透**, 野田雅文, 中潟直己  
生体膜コレステロール量がマウス凍結精子の耐凍能に及ぼす影響, 第 64 回日本実験動物学会, ビッグパレットふくしま, 郡山, 2017 年 5 月 25 日

吉本英高, **竹尾 透**, 桐木平小春, 入江徹美, 中潟直己

メチル- $\beta$ -シクロデキストリンによる生体膜脂質環境の変化がマウス冷蔵精子の超活性化を誘起する, 第 64 回日本実験動物学会, ビッグパレットふくしま, 郡山, 2017 年 5 月 25 日

竹本賢司, 中尾聡宏, 吉本英高, 入江徹美, **竹尾 透**, 中潟直己

受精促進作用を示す環状オリゴ糖を用いた新規不妊治療法の開発, 日本薬学会第 137 年会, 東北大学, 仙台, 2017 年 3 月 26 日

竹本賢司, 中尾聡宏, 吉本英高, 入江徹美, **竹尾 透**, 中潟直己

シクロデキストリン誘導性受精能獲得効果を利用した新規不妊治療の開発, 第 39 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 横浜, 2016 年 12 月 2 日

Masafumi Noda, Yumiko Hirose, Yuta Ishizuka, **Toru Takeo**, Naomi Nakagata  
The amount of membrane cholesterol

determines the cryotolerance of sperm among mouse strains, 7th AFLAS Congress, シンガポール (シンガポール), 2016 年 11 月 8 日

吉本英高, 桐木平小春, **竹尾 透**, 入江徹美, 中潟直己

マウス冷蔵精子の超活性化がメチル- $\beta$ -シクロデキストリンによって誘起される, 第 7 回シクロデキストリンワークショップ, 熊本大学薬学部, 熊本, 2016 年 9 月 18 日

竹本賢司, 中尾聡宏, 吉本英高, 入江徹美, **竹尾 透**, 中潟直己

精子におけるシクロデキストリン誘導性受精能獲得効果の解明, 第 7 回シクロデキストリンワークショップ, 熊本大学薬学部, 熊本, 2016 年 9 月 18 日

竹本賢司, 中尾聡宏, 吉本英高, **竹尾 透**, 中潟直己

シクロデキストリンによる受精能獲得過程における生体膜脂質環境の変化, 第 109 回日本繁殖生物学会, 麻布大学, 相模原, 2016 年 9 月 12 日

吉本英高, 武氏志保里, 廣瀬優美子, **竹尾 透**, 中潟直己

マウス冷蔵精子における生体膜中コレステロール量の変化が受精能に及ぼす影響, 第 63 回日本実験動物学会, ミューザ川崎, 川崎, 2016 年 5 月 20 日

Hidetaka Yoshimoto, Shiori Takeuji, Yumiko Hirose, **Toru Takeo**, Naomi Nakagata  
Effect of cholesterol efflux from plasma membrane on the fertility of cold-stored mouse sperm, 箱根, The 2016 AMMRA & AMPC meeting, 2016 年 5 月 20 日

**Toru Takeo** and Naomi Nakagata, Efficient production of mouse oocytes using superovulation by immunization against inhibin, 13th Transgenic Technology Meeting, プラハ (チェコ), 2016 年 3 月 22 日

吉本英高, 武氏志保里, 廣瀬優美子, **竹尾 透**, 中潟直己

メチル- $\beta$ -シクロデキストリンがマウス冷蔵精子の受精能および精子生体膜中コレステロール量に及ぼす影響  
第 32 回生殖工学研究会, 実験動物中央研究所, 川崎, 2015 年 12 月 5 日

中尾聡宏, 酒匂一仁, 竹本賢司, 堀越裕佳, 石束祐太, **竹尾 透**, 中潟直己

環状オリゴ糖による生体膜脂質環境の変化と精子受精能の向上, 第 32 回生殖工学研究会, 実験動物中央研究所, 川崎, 2015 年 12 月 5 日

中尾 聡宏, 酒匂 一仁, 竹本 賢司, 吉本英高, 堀越 裕佳, 石束 祐太, **竹尾 透**, 中潟 直己

環状オリゴ糖による生体膜脂質環境の変化が精子の受精能を向上させる, 第 38 回日本分子生物学会, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2015 年 12 月 1 日

**Toru Takeo**, Ayumi Mukunoki, Naomi Nakagata  
Efficient production of genetically engineered mice by ultra-superovulation using inhibin antiserum, The 2nd Oceania Transgenic/Cryopreservation Symposium, タスマニア(オーストラリア), 2015年11月17日

**Toru Takeo**, Naomi Nakagata  
CARD Revolution in Mouse Reproductive Technology, Shanghai Laboratory Animal Science, 上海(中国), 2015年8月13日

#### **竹尾 透**

生殖工学技術を用いた遺伝子改変マウスの兵站術、第8回トランスポーター研究会九州支部会、鹿児島大学、鹿児島、2015年7月18日

中尾聡宏、竹本賢司、**竹尾 透**、笹岡俊邦、中潟直己  
精子生体膜脂質の漏出による精子受精能への影響、新潟日報メディアシップ、新潟、平成27年度日本生化学会関東支部例会、2015年6月20日

**Toru Takeo**, Naomi Nakagata  
Improving the efficiency of mouse reproductive technology for connecting the world, 8th Workshop on Innovative Mouse Models, ライデン(オランダ), 2015年6月12日

Yuka Horikoshi, Kenji Takemoto, Satoshiro Nakao, Kazuhito Sakoh, **Toru Takeo**, Naomi Nakagata

Mechanisms of sperm activation by various cyclodextrins in mice, 8th Asian Cyclodextrin Conference, 熊本県民交流館パレア、熊本、2015年5月14日

②1 Hidetaka Yoshimoto, Shiori Takeuji, **Toru Takeo**, Naomi Nakagata

Methyl- $\alpha$ -cyclodextrin recovered the fertilizing ability of the cold-stored mouse sperm, 8th Asian Cyclodextrin Conference, 熊本県民交流館パレア、熊本、2015年5月14日

②2 **竹尾 透**、中尾聡宏、酒匂一仁、堀越裕佳、中潟直己

環状オリゴ糖による精子の活性化機構の解明、日本薬学会第135年会、神戸サンボホール、神戸、2015年3月28日

②3 中尾 聡宏、**竹尾 透**、中潟 直己  
生殖機能改善薬としてのシクロデキストリンの可能性、第31回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学、福岡、2014年12月6日

#### ②4 **竹尾 透**

生殖工学と薬学が拓く世界、第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、熊本大学薬学部、熊本、2014年11月15日

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：マウス精子の冷蔵保存液及び保存方法  
発明者：竹尾 透、吉本英高、中潟直己  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2016-230757  
出願年月日：平成28年11月29日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学生命資源研究・支援センター 資源 開発 分野：  
[http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive\\_engineer/reproductive\\_engineer.html](http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html)

Nakagata Lab:

<http://nakagata-lab.weebly.com/>

竹尾透 Researchmap:

<http://researchmap.jp/read0126236/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

竹尾 透 (TAKEO, Toru)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・資源開発分野・講師

研究者番号：10517014