

【3】

氏 名	坂 本 千代織 <small>さか もと ちより</small>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第799号
学位授与の日付	令和3年10月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (産科婦人科学)
学位論文題目	Serotonergic signals enhanced hamster sperm hyperactivation (ハムスター精子超活性化運動を促進させるセロトニンシグナルについて)
論文審査委員	(主査) 教授 釜 井 隆 男 (副査) 教授 麻 生 好 正 教授 鈴 木 圭 輔

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

哺乳類精子は、受精能獲得と呼ばれる質的な変化を経て初めて卵と受精することができる。受精能獲得は*in vivo*では卵管峡部から卵管膨大部に移動する過程で起こり、*in vitro*では培養条件下において数時間かけて起こる。受精能獲得をした精子は、運動性が変化し、これを超活性化という。超活性化運動は精子がintactな状態で確認できるため、*in vitro*で精子が受精能獲得を起こしているかの目安にされる。また最近、超活性化運動を起こす能力と体外受精 (*in vitro* fertilization : IVF) の成績に正の相関があるとされた。

セロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT) は、トリプトファンから産生される神経伝達物質であり、その作用は特異的な受容体を介して起こる。5-HT受容体には、7種類のファミリーが存在し (5-HT₁受容体、5-HT₂受容体、5-HT₃受容体、5-HT₄受容体、5-HT₅受容体、5-HT₆受容体、5-HT₇受容体)、さらに5-HT₁受容体には5つのサブファミリー (5-HT_{1A}受容体、5-HT_{1B}受容体、5-HT_{1D}受容体、5-HT_{1E}受容体、5-HT_{1F}受容体) が、5-HT₂受容体には3つのサブファミリー (5-HT_{2A}受容体、5-HT_{2B}受容体、5-HT_{2C}受容体) が存在する。受容体の下流において以下の様なシグナルが作動する。5-HT₁と5-HT₅受容体においてはcAMPの産生を阻害するシグナルが、5-HT₄、5-HT₆、5-HT₇受容体においてはcAMPの産生を惹起するシグナルが、5-HT₂受容体においては細胞内Ca濃度を上げるシグナルが、5-HT₃受容体においては脱分極を引き起こすシグナルである。

ところで、5-HTは雌性内性器において卵丘細胞より分泌され、卵成熟や受精、胚発生などに関与

している。また卵管内にも放出され、精子にも作用する。精子への作用として、ハムスターでは先体反応と運動の超活性化を惹起・促進させることが、マウスでは運動の超活性化促進すると共にIVFの成績を上げることが報告されている。ヒトにおいては遊泳速度を増加させることが報告されている。

【目 的】

本研究では、5-HTによって促進される運動の超活性化がどのような細胞内シグナルによって制御されているのか、ハムスター精子を用いて明らかにすることを目的とする。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認（承認番号107と1248）を得て、指針に従って実施した。雄ハムスター（10～20週齢）の精巣上体尾部から精子を採取した。約5 μ lのdropとして得た精子を35 mmの培養皿に添加し、3 mlのmTALP（modified Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate）溶液を加え、精子を懸濁した。精子をswim upさせたのち、CO₂インキュベーター（37℃、5 %CO₂）内に4時間静置して受精能獲得を起こさせた。精子の運動状態は、この4時間の間にビデオ位相差顕微鏡もしくは精子運動解析装置を使用して記録し、解析した。細胞内シグナルを調べるために、種々の試薬を1種類で用いる場合は、swim up時に添加した。複数種の試薬を添加する場合は、目的に応じて5分間隔で添加した。結果は、Student's t-testまたはrepeated measures ANOVA post-hoc testで統計処理され、P値が5 %未満を有意とした。

精子からの5-HT受容体の検出は、5M尿素を含むSDS-Sample Bufferで精子タンパク質を可溶化し10 % SDS-PAGEを行ったのち、抗5-HT受容体抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。検出は化学発光法で行った。

【結 果】

ハムスター精子における運動の超活性化は、受容体アゴニストを用いた検討から5-HT_{2A}受容体と5-HT₄受容体を介して起こることが明らかになった。さらにウエスタンブロッティング法により5-HT_{2A}受容体と5-HT₄受容体をハムスター精子から検出した。5-HT_{2A}受容体の下流のシグナルとして、ホスホリパーゼC（PLC）の活性化とIP₃受容体の関与、そして可溶性アデニル酸シクラーゼ（sAC）とプロテインキナーゼA（PKA）の関与が想定され、各種阻害剤を用いた検討の結果、これらの関与が確認された。また5-HT₄受容体の下流のシグナルとして、膜貫通型アデニル酸シクラーゼ（tmAC）、PKA、CatSper Ca channel（CatSper）、sACの関与が想定され、検討した結果、これらの関与が確認された。

【考 察】

運動の超活性化の調節において、key moleculesとされるのはCatSperとsACおよびPKAシグナルとされる。CatSperは活性化すると細胞外Caの流入を引き起こし、sACの活性化を促す。活性化したsACはcAMPを産生しPKAの活性化を促して運動の超活性化を惹起させる。この細胞内シグナルに対し5-HTの刺激がどのように介入して運動の超活性化の促進を引き起こすのかを本研究で明らかにした。5-HT₂受容体は、神経細胞ではGqタンパク質を介してPLCを活性化し、IP₃を産生させる。そしてIP₃はIP₃受容体に結合し細胞内CaストアからCaを放出させる。検討の結果、ハムスター精子にお

いても、同様のシグナルが存在することが明らかとなった。さらにこのシグナルはCaを放出するシグナルである事からkey moleculesであるsACの活性化を促すことができる。従って、5-HTが5-HT₂受容体に結合するとPLCの活性化、IP₃の産生、IP₃受容体を介したCaの放出、sACの活性化、cAMPの産生、PKAの活性化というシグナルを経て運動の超活性化が促進されることになる。一方、5-HT₄受容体は、神経細胞ではGsタンパク質を介してtmACを活性化し、cAMPを産生させる。産生されたcAMPはPKAを活性化させ、このシグナルは細胞膜近傍で起こっている。最近、CatSperの活性化にPKAが関与するとされているので、膜近傍でのPKAの活性化はCatSperの活性化を促すと考えられる。この可能性も含め検討したところ、ハムスター精子において5-HTが5-HT₄受容体に結合するとtmACの活性化、cAMPの産生、PKAの活性化、CatSperの活性化、sACの活性化が起こると考えられた。

ハムスター精子において、低濃度の5-HTは5-HT₂受容体を刺激し、高濃度の5-HTは5-HT₄受容体を刺激することが既に報告されており、その違いは受容体だけでなく受容体の下流のシグナルにもおよぶことが今回の検討で明らかとなった。また、既報において5-HT₂受容体を介した運動の超活性化の促進はγアミノ酪酸（GABA）によって抑制されるが、5-HT₄受容体を介した運動の超活性化の促進はGABAでは抑制されない。この違いも今回明らかになった受容体の下流のシグナルの違いによると考えられる。

【結 論】

ハムスター精子は5-HTによって運動の超活性化の促進が起こるが、今回の検討で促進は5-HT_{2A}受容体と5-HT₄受容体を介して起こっていた。そして、5-HT_{2A}受容体の下流ではPLCとIP₃を介したCaシグナルによってsACが活性化することで促進が起こり、5-HT₄受容体の下流ではtmAC/cAMP/PKAを介してCatSperが活性化することで促進が起こることが分かった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

哺乳類精子は受精能獲得の過程で運動状態が変化し、この受精能獲得に伴って起こる運動を超活性化運動という。卵管内に分泌されるステロイドや神経伝達物質により超活性化運動への変化が促進され、ハムスター精子では5-hydroxytryptamine (5-HT) が5-HT₂受容体と5-HT₄受容体を介して超活性化運動を促進する事が知られている (Fujinoki 2011)。5-HT受容体は7種類のfamilyが存在する事から、申請論文では、ハムスター精子において、5-HT₂受容体と5-HT₄受容体以外の受容体の関与および5-HT₂受容体と5-HT₄受容体の下流のシグナルについて検討している。結果、1) 5-HTによる超活性化運動の促進には5-HT₂受容体と5-HT₄受容体のみが関与する事、2) 5-HT₂受容体の3種類のsubfamilyのうち、5-HT_{2A}受容体が超活性化運動の促進に関与する事、3) 5-HT₂受容体と5-HT_{2A}受容体を刺激すると遊泳速度が減少する事、4) 5-HT₂受容体の下流ではphospholipase C、inositol trisphosphate受容体、可溶性アデニル酸シクラーゼ、protein kinase A (PKA) が関与する事、5) 5-HT₄受容体の下流では膜貫通型アデニル酸シクラーゼ、PKA、CatSper、可溶性アデニル酸シクラー

ゼが関与する事を明らかにしている。これらの結果から、ハムスター精子において5-HTは5-HT₂受容体と5-HT₄受容体の2種類の受容体のみを介して超活性化運動の促進を起し、5-HT₂受容体の下流では細胞内Ca²⁺を増加させるシグナルが、5-HT₄受容体の下流ではcAMPを増加させ細胞外Ca²⁺を流入させるシグナルが作動していると結論づけている。そしてこれらのシグナルは、神経細胞と同じ構成で、また超活性化運動の調節で重要な可溶性アデニル酸シクラーゼの活性化を促すシグナルになっているとも結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、巧みに5-HT受容体アゴニストを用いて5-HTによる超活性化運動の促進に関与する受容体を決定した。さらに、関与が確定した5-HT₂受容体と5-HT₄受容体の下流で作動する細胞内シグナルを先行研究での知見を参照しながら論理的に推定し、阻害剤を巧みに組み合わせて検討することで、推定した細胞内シグナルが実際に作動していることを証明している。科学的思考力、論理性に秀でた研究遂行力に基づいて実施されており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

卵管液から5-HTが検出され精子の超活性化運動に関与していると提唱されてきたが、その具体的な制御機構は明らかではなかった。申請論文では、巧みに受容体アゴニストや各種阻害剤を用いて、精子において神経細胞と同様の制御機構が存在し、超活性化運動の調節がなされている事を初めて明らかにしている。不妊の原因の一つにストレスがある事を鑑みれば、5-HTシグナルによって精子機能の調節がなされている事を明らかにした本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、受容体アゴニストや阻害剤を用いた巧みな生理学・薬理学的実験を駆使し、5-HTによる超活性化運動の調節機構を解明している。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、生理学的にも妥当と言える結論を導き出している。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、精子における受精調節である受精能獲得について超活性化運動を指標に、その調節機構を明らかにする事を目的とし、特に卵管内に卵丘細胞から分泌される5-HTに着目する事で精子と卵丘細胞-卵子複合体との相互作用の仕組みをも明らかにしようとするものである。受精は言うまでもなく精子と卵丘細胞-卵子複合体との相互作用の結果として起こる生理現象であり、その仕組みの一端を明らかにした事は当該領域の知見を大いに進展させたと言える。また、同様の調節機構が人にも存在する可能性もある事から、臨床応用も視野に入れることができ、大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、精子学を中心とした生殖生理学を学んだ上で、妥当な作業仮説を立て、それを実験的に証明するための実験計画を立案したのち、生理学・薬理学的手法を駆使して適切に本研究を遂行し、独創的で貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質が高く、かつ臨床応用可能な研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判断した。

（主論文公表誌）

Journal of Reproduction and Development

(67 : 241-250, 2021)