

【17】

氏 名	今 弘 枝
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	乙第726号
学位授与の日付	平成26年 8 月26日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項
学 位 論 文 題 目	Suppression of progesterone-enhanced hyperactivation in hamster spermatozoa by γ-aminobutyric acid （プロゲステロンと γ-アミノ酪酸（GABA）によるハムスター精子超活性化の調節）
論 文 審 査 委 員	（主査）教授 岡 田 弘 （副査）教授 安 西 尚 彦 教授 坂 本 秀 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

哺乳類の精子は、雌性生殖器内で受精能を獲得することで卵子への受精が可能になる。体外受精においても、あらかじめ人工的に受精能を獲得させた精子を卵子と共培養することで受精が起こる。しかし、その受精率は動物種によってはそれほど高くなく、より効率的に受精能獲得を起こさせる方法の開発が求められる。方法の一つとして、雌性生殖器内の体液中に存在する生体因子を用いて精子の受精能獲得を効率的に起こさせることにより、体外受精効率を向上させることができると考えられる。

精子は、受精能獲得の過程で運動様式の変化を起こし、超活性化と呼ばれる激しい運動を示すようになる。超活性化を示す能力と体外受精での受精率には相関があるという報告もあることから、超活性化を引き起こすもしくは増加・促進させる生体因子を探索し、その作用機序を明らかにすることで、精子の受精能獲得を効率よく起こす方法の開発につながると考えられる。

いくつかの研究からヒト、マウス、ラットおよびハムスター精子において、プロゲステロンが超活性化を促進することがよく知られている。近年、ヒト、ヒツジおよびラット精子において γ -アミノ酪酸（GABA）がプロゲステロンと同様に超活性化を促進し、GABAおよびプロゲステロンともに GABA_A 受容体を介して作用している可能性が示唆された。そこで、精子の超活性化運動が観察しやすく、すでにプロゲステロンによる超活性化促進効果が調べられているハムスターを用いて超活性化

に対するGABAの作用を検討することにした。

【目 的】

プロゲステロンによる超活性化の促進がプロゲステロン受容体を介して起こることが明らかになっているハムスター精子において、GABAが超活性化に与える影響を検討した。

【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を得て、指針に従って行った。

成熟雄ハムスターを安楽死させ、精巣上体尾部より精子を採取し、修正タイロードアルブミン乳酸ピルビン酸（modified Tyrode's albumin lactate pyruvate：mTALP）培養液に懸濁し、37℃ 5 % CO₂環境下で培養して超活性化を起こさせた。

培養開始時にプロゲステロン（20ng/ml）、GABA（5 fM～5 μM）、およびGABA_A受容体アンタゴニストであるビククリン（1 μM）を培養液に添加し、4時間後まで30分おきに精子の運動状態を位相差顕微鏡で観察し、画像をビデオ録画した。記録画像を解析し、精子数、運動精子数、超活性化精子数を計測した。

蛍光標識プロゲステロンを添加した培地で精子を培養し、蛍光位相差顕微鏡で精子へのプロゲステロンの結合を観察した。

各実験群間の比較はTukey's post hoc analysis of variance testを用い、P<0.05を有意とした。

【結 果】

GABAおよびビククリンは、単独では精子の運動率および超活性化率に影響を及ぼさなかった。また、ビククリンはプロゲステロンによる超活性化の促進にも影響を及ぼさなかった。

GABAはプロゲステロンによる精子の超活性化の促進を有意に抑制し、その作用は濃度依存的であった。精子に対して先にGABAを暴露し、後にプロゲステロンを暴露した場合には、nMレベル以上の濃度でプロゲステロンの作用を抑制し、pMレベル以下では抑制しなかった。プロゲステロンとGABAを同時に暴露した場合には、μMレベルでプロゲステロンの作用を抑制した。さらに、先にプロゲステロンを暴露し、後にGABAを暴露した場合には、超活性化の促進を抑制しなかった。

ビククリンは、GABAによるプロゲステロンの超活性化抑制作用を有意に抑制した。

蛍光標識プロゲステロンを用いた結合実験の結果、GABAによってプロゲステロンの精子への結合が抑制された。

【考 察】

実験結果より、GABA単独では精子の超活性化に何の影響も及ぼさず、プロゲステロンもGABA_A受容体を介して作用しない事が示され、ヒト、ヒツジおよびラット精子で報告された現象はハムスター精子では認められなかった。しかし、GABAおよびプロゲステロンを培養液に添加することによって、GABAがプロゲステロンによる超活性化の促進を競合的に抑制する作用があることが明らかになった。その作用濃度はnM～μMの範囲であり、GABA_A受容体アンタゴニストによってGABAの効果が阻害されたことから、その作用はGABA_A受容体を介したものであることが明らかになった。また結合観察実験の結果から、GABAはプロゲステロンの精子への結合を抑制することによってプロ

ゲステロンの作用を抑制するものと考えられた。

哺乳動物においては、排卵された卵子の周囲を覆っている卵丘細胞から分泌されるプロゲステロンが卵管内の精子に作用して受精能獲得を促進するものと考えられている。一方GABAについては、ラットにおいて、卵管内のGABA濃度が脳の2.5倍であるという報告、また卵管内のGABA濃度は発情周期に伴って変化するという報告があることから、体内受精時の精子の受精能獲得に何らかの形で関与していることが推察される。本実験の結果より、ハムスターにおいてはGABAはプロゲステロンによる超活性化促進作用を競合的に抑制することで卵管内での精子の受精能獲得のタイミングを調節している可能性が示唆された。

【結 論】

本研究は、ハムスター精子においてGABAがプロゲステロンによる超活性化促進作用を競合的に抑制することを明らかにした。その抑制の仕組みは、GABAがGABA_A受容体に結合し、精子へのプロゲステロンの結合を抑制するというものであった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

哺乳類の精子は、受精能獲得の過程で運動様式の変化を起こし、超活性化と呼ばれる激しい運動を示すようになる。申請者は、超活性化と体外受精での受精率には相関があることから、その調節機序を明らかにすることで、精子の受精能獲得の効率化が可能と考え、研究を開始した。

先行研究で、プロゲステロンによる超活性化促進効果が認められる、ハムスター精子を用いて、超活性化に対するGABAの作用を検討した。

結果、1) GABAは単独では精子超活性化率に影響を及ぼさなかったが、2) プロゲステロンの精子への結合による超活性化の促進過程で、GABAはGABA_A受容体と結合することで、競合的に抑制することを明らかにした。

申請論文はこれらの実験結果から、哺乳動物において卵丘細胞から分泌されるプロゲステロンによる精子超活性化を介しての受精能獲得促進機構を、卵管内で発情周期に伴って濃度が変化するGABAが抑制することで、卵管内での精子の受精能獲得のタイミングを調節している可能性がある」と結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、所属施設での先行研究で明らかにされ手技として確立された、ハムスター精子のプロゲステロンによる超活性化促進モデルが用いられている事、受容体結合による阻害であることを示すために、レセプター阻害薬を用いた実験がなされており、適切な実験モデルの選定と解析手法を用いており、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】

卵管内でのプロゲステロンによる精子の授精能獲得を、これまでの報告されている他のホルモンではなく、神経伝達物質であるGABAが調節している事を示した点で、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、所属施設ですでに確立している実験モデルを用いた、プロゲステロンのハムスター精子超活性化に影響を与える因子の検討対象として、これまでに報告のないGABAによる調節機能に着目している。さらに、GABA (γ -aminobutyric acid) によるハムスター精子超活性化の作用機序解明のために、受容体阻害剤を用いた実験と、蛍光標識プロゲステロンを用いた結合実験も行っており、そこから導き出された結論は、論理的に矛盾はなく、生殖生理学、薬理学などの関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、これまで他の哺乳類で示されていた、プロゲステロンの精子超活性化促進作用をGABAがその受容体を介して、プロゲステロンの精子への結合を阻害することにより調節しているという、新しい作用機序を示した点で、生殖生理学の今後の進歩にも大いに役立つ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、獣医学の理論を学びさらに実験動物センターならびに生理学教室で、動物の体外受精実験に必要な生殖生理学的手技を修得した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、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に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の高い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定した。

(主論文公表誌)

The Journal of Reproduction and Development

60 : 202-209, 2014