

摂食と生殖能を繋ぐ分子メカニズムの解明と肥満症・ 糖尿病における男性不妊治療への応用*

清水 辰 徳

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 内分泌・代謝・老年内科学

(平成 30 年 4 月 27 日掲載決定)

Food intake affects sperm-egg fusion through the GIP/PSG17 axis in mice

Tatsunori Shimizu

Department of Endocrinology, Diabetes and Geriatric Medicine, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : GIP, PSG17, male fertility

はじめに

肥満症・糖尿病は多くの疾病・合併症を引き起こす危険因子であることが明らかにされている。一方、世界には 4,850 万組に及ぶ夫婦が不妊症を抱えており¹⁾、その中で肥満・糖尿病は、女性側においてよく知られた不妊の一因である。インスリン抵抗性によって惹起される多嚢胞性卵巣症候群などがその一つであり、メトホルミンのようなインスリン抵抗性改善薬は妊娠率を改善させることが報告されている²⁾。不妊症の原因の半数は男性側に原因があるとされ³⁾、近年の報告では肥満症・糖尿病は、男側においても不妊の一因あることが疫学的に示されている⁴⁾。しかしながら、肥満症・糖尿病と男性不妊の機構についてはほとんど解明されておらず、これらを繋ぐ因子については全く分かっていなかった。そのために、男性不妊に対する治療は生殖補助医療にほぼ限られている。肥満症男性の精子は体外受精による妊娠の成立率が低下するものの、卵細胞質内精子注入法を用いた場合は非肥満男性と同等であ

ることが報告されており⁵⁾、肥満症男性の精子は卵との結合ステージにおいて何らかの障害を有している可能性がある。

一方、摂取カロリーを制限した場合、大腸菌から哺乳類に至る多くの種において寿命の延長が認められているが、その反面で生殖能が低下することが示されている⁶⁾。これらのことは、摂取と生殖能には密接な関係があることを示唆するものである。

精子と卵の融合は生殖における最初の重要なステップである。精子と卵にはそれぞれ受精に必須とされる因子が同定されており、精子側の Izumo1 とそれに対応する卵側の Juno、更に卵側の因子として CD9 が明らかとなっている。CD9 ノックアウトマウスの卵は、精子との膜融合がほぼ完全に不能となる⁷⁾。Pregnancy-specific glycoprotein 17 (PSG17) は CEA ファミリーに属し、CD9 の結合パートナーとして考えられている糖蛋白である。PSG17 が卵の CD9 に結合することや、短縮させた PSG17 で前処理した卵は精子との膜融合が一部障害されることから⁸⁾、受精に重要な働きを持つことが考えられていたが、精子上での発現の有無はよくわかっていなかった。

これまでに、摂食に関わるいくつかのペプチドホルモンと生殖について報告されている。白色脂肪細胞から分泌されるレプチンは、体の栄養状態を脳の生殖中枢に伝えるとともに、精巣内の Leydig 細胞に発現するレプチンレセプターを介して男性ホルモンの生成を促す⁹⁾。グレリンは空腹によって胃から分泌される消

Correspondence : Yuichiro Yamada, M.D., Ph.D
Department of Endocrinology, Diabetes and Geriatric
Medicine, Akita University Graduate School of Medicine
Tel : 81-18-884-6769
Fax : 81-18-884-6449
E-mail : yamada@gipc.akita-u.ac.jp
*平成 30 年 2 月 21 日秋田医学会学術奨励賞受賞記念
講演

化管ホルモンであるが、その受容体が Leydig 細胞と伸長精子細胞に発現している。遺伝的にレプチンを欠損することで高度肥満となったマウスに生じる男性ホルモンの産生低下と精細胞のアポトーシスは、グレリンシグナルを抑制することで、回復することが報告されている¹⁰⁾。

Gastric inhibitory polypeptide (GIP) は、インクレチンと総称される消化管ホルモンの一つであり、摂食により小腸上部の K 細胞から分泌され、膵β細胞の受容体を介し、インスリン分泌促進作用を有している。興味深いことに、GIP 受容体は、膵β細胞のみならず、膵外の多くの臓器・組織に発現していることが知られ、多様な作用が報告されている^{11,12)}。高脂肪食や過食は、血中の GIP 濃度は増加させているが、肥満症・糖尿病患者に GIP を投与した際の反応性インスリン分泌は低下していることから、肥満症・糖尿病患者では GIP 抵抗性が生じていると考えられる。この GIP 抵抗性は、GIP 受容体の発現低下が原因の一つと考えられているが、膵外の GIP 受容体の発現低下による影響については全く分かっていなかった。

本研究では、精子細胞に発現した GIP 受容体を介して精子細胞の Psg17 の発現調整が行われること、精子頭部に Psg17 蛋白が発現し、GIP シグナルの抑制により劇的な Psg17 の発現低下と受精能の低下を招くこと、食事摂取により GIP の血中濃度と精巣内の Psg17 発現は上昇するものの、慢性的な高脂肪食の摂取は精巣内の GIP 受容体と Psg17 の遺伝子発現を低下させ、このことが肥満症・糖尿病による男性不妊の一因となり得ることを報告する。

1. 精子細胞に GIP 受容体が発現している

RT-PCR を用いた検討にて、マウス精巣に GIP 受容体 mRNA が強く発現していることが示された (図 1)。同じくインクレチンの一つである Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の受容体は精巣に全く発現していなかった。また、ヒトの精巣においても GIP 受容体 mRNA が発現していることがわかった。マウス精巣内の GIP 受容体発現細胞を見出すために、in situ hybridization 法を用いて組織切片内の GIP 受容体 mRNA の発現細胞を検索したところ、精細管内に存在する精子細胞での発現が確認された。マウスの精細管は発達段階によって 12 のステージに区別される¹³⁾が、GIP 受容体はこの中で VII, VIII, IX のステージ

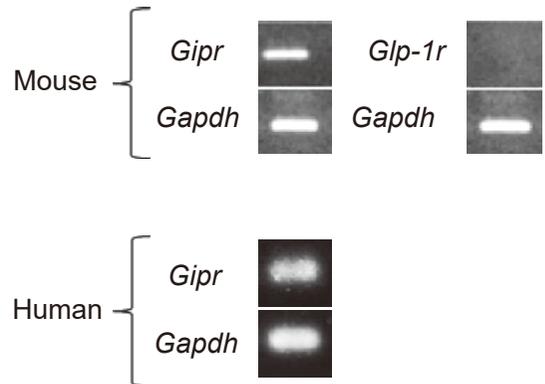


図 1. マウス・ヒトの精巣における GIP 受容体の発現

で発現していることが HE 染色・PAS 染色によるステージ判定にて明らかとなった (図 2)。

2. GIP 受容体欠損マウスの精巣では Psg17 の発現が劇的に低下する

GIP 受容体欠損マウスは生殖可能であり、野生型マウスと比較して、体重、精巣重量、血中レプチン濃度、レプチン受容体の発現、血中テストステロン濃度、精巣組織、精子運動に違いはみられなかった。そこで我々は、GIP 受容体欠損マウスと野生型マウスの精巣を用いたマイクロアレイ解析を行い、精巣における遺伝子発現を網羅的に検索した。有意な変化を示した遺伝子の中から、pregnancy-specific glycoprotein 17 (Psg17) に着目するに至った。Psg17 は CEA ファミリーに属し、精子と卵の結合に必須の卵側の因子である CD9 の結合相手として想定されている糖蛋白である¹⁴⁾。

3. Psg17 は先体反応後の精子頭部に発現する

Psg17 mRNA が野生型マウスの精巣に発現していること、また GIP 受容体欠損マウスの精巣にて劇的に発現が低下していることはリアルタイム RT-PCR にて確認された (図 3)。次に我々は、Psg17 が精巣のどの細胞に発現しているかを探索する目的に、精巣の構成細胞をフローサイトメトリーを用いて 1 倍体を多く含む細胞群、2 倍体を多く含む細胞群に分け、それぞれの遺伝子発現を検討した結果、Psg17 は 1 倍体を多く含む細胞群に多く発現していることが示された (図

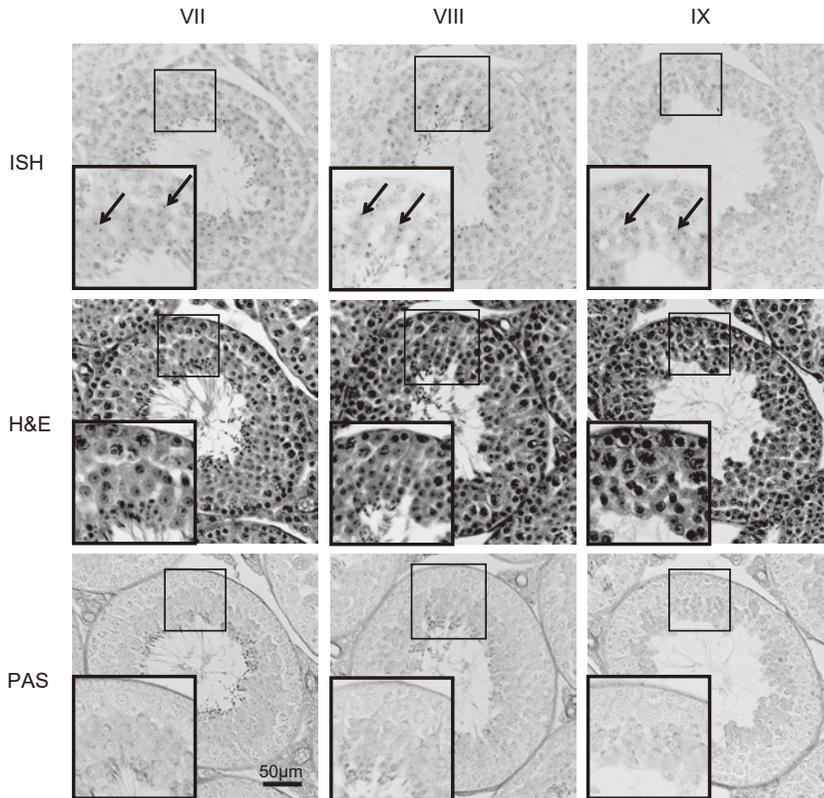


図2. 精子細胞に発現する GIP 受容体 mRNA

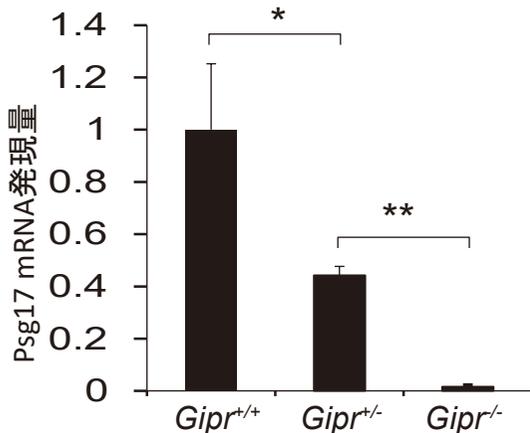


図3. 野生型マウス・GIP 受容体欠損マウスの精巣における Psg17 mRNA 発現量

4). この結果から、Psg17は精子細胞に発現していることが予想された。このことを裏付けるために、精子細胞を持たない精巣での遺伝子発現を検討する事とした。17日齢のマウスは性成熟前であり、精巣内に精子細胞のみを欠如した状態であることが報告されている¹⁵⁾。実際に17日齢のマウス精巣より切片を作成し、HE・PAS染色を行い、精子細胞を欠如していることを確認した。この17日齢マウス精巣では予想通りPsg17の発現が見られず(図5)、Psg17は精子細胞に発現していることが裏付けられた。次に、PSG17の蛋白発現を検索するために、PSG17ポリクローナル抗体を作成し、野生型マウス精子の免疫染色を行った。PSG17は精子頭部のアクロソームキャップに発現しており、先体反応後も精子頭部に発現し続けることが示され、この発現パターンは、精子における受精に必要な因子として知られるIzumo1¹⁶⁾と同様であり(図6A, B, C)、PSG17が精子細胞膜に結合した蛋白であることを示し、PSG17が受精に関与し得ることを裏

(20)

精巣における GIP シグナルの役割

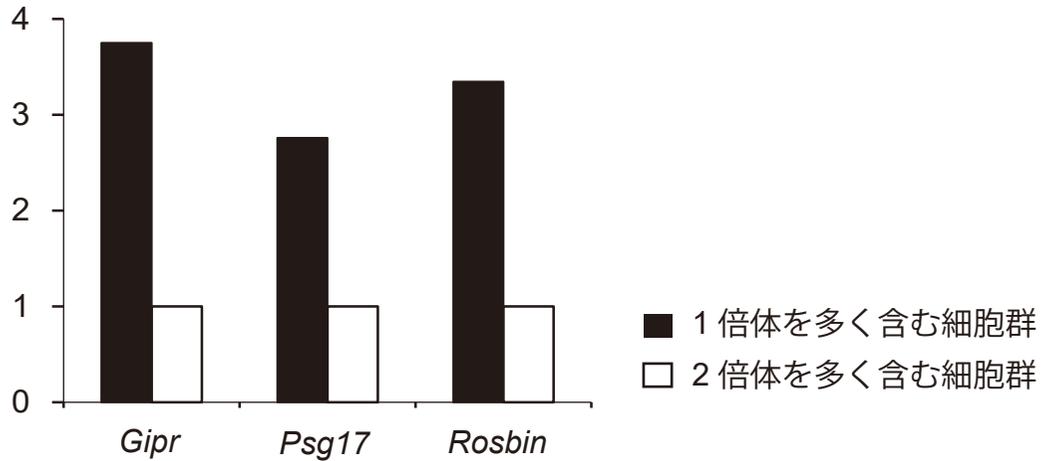


図4. 精巣を構成する細胞を、1倍体と2倍体のに分取し、遺伝子発現を検討
精子細胞のマーカーとして Rosbin を使用

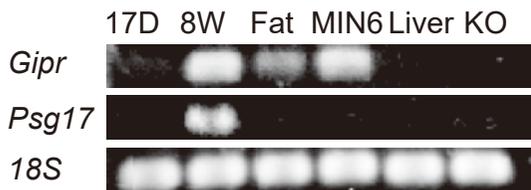


図5. 17日齢の野生型マウス精巣 (17D) の遺伝子発現

8W: 8週齢の野生型マウス, Fat: 脂肪組織と MIN6: マウスインスリノーマ細胞株は GIP 受容体発現のポジティブコントロール, Liver: 肝と KO: GIP 受容体欠損マウスの精巣は GIP 受容体発現のネガティブコントロール

付けるものと考えられた。PSG17のアミノ酸配列の解析から、PSG17は膜貫通領域を持たないものの、Glycosylphosphatidylinositol (GPI) によってアンカーされる領域が想定された。このことは、GPIを特異的に切断する PIPLC によって処理する事で先体反応後の PSG17 発現が消失したことから確かめられた (図 6D)。

4. GIP 受容体欠損マウスの精子は *in vitro* において野生型マウスの精子と比較して受精率が低い

次に、受精における PSG17 の役割を検討する目的で、野生型マウスと GIP 受容体欠損マウスの精子を

用いた *in vitro* での受精実験を行った。GIP 受容体欠損マウスの精子は野生型精子と比較して、卵の透明帯の有無に関わらず受精率が低いことが明らかとなった (図 7)。このことは、GIP 受容体欠損マウスの精子には卵の透明帯通過後の卵との結合において何らかの障害が生じていることを示唆する結果であった。

5. GIP シグナルは Psg17 発現を正に制御する

これまでの結果から、GIP 受容体欠損マウスでは Psg17 の発現低下をきたすことは示されているが、実際に GIP シグナルが Psg17 の発現を正に制御することを確かめることとした。GIP の腹腔内注射による精巣内 Psg17 の発現上昇 (図 8A)、GIP の細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP を増加させる Forskolin を精子細胞を含む精巣構成細胞に添加した際の Psg17 の発現上昇 (図 8B) が示された。更に、GIP 受容体ヘテロ欠損マウスの精子細胞を用いた検討を行った。ヘテロ欠損マウスの精巣内には、正常な GIP 受容体を発現する精子細胞と、正常な GIP 受容体を発現できない (neomycin 耐性遺伝子が組み込まれている) 精子細胞が混在する (図 9)。これらの細胞を用いて、1つ1つの細胞の RNA を検出することで、GIP 受容体の発現 (GIP シグナル有り) と Psg17 の発現の関係を調べることにした。結果、正常な GIP 受容体を発現している精子細胞では Psg17 が発現しており、正常な GIP 受容体を持たない精子細胞には Psg17

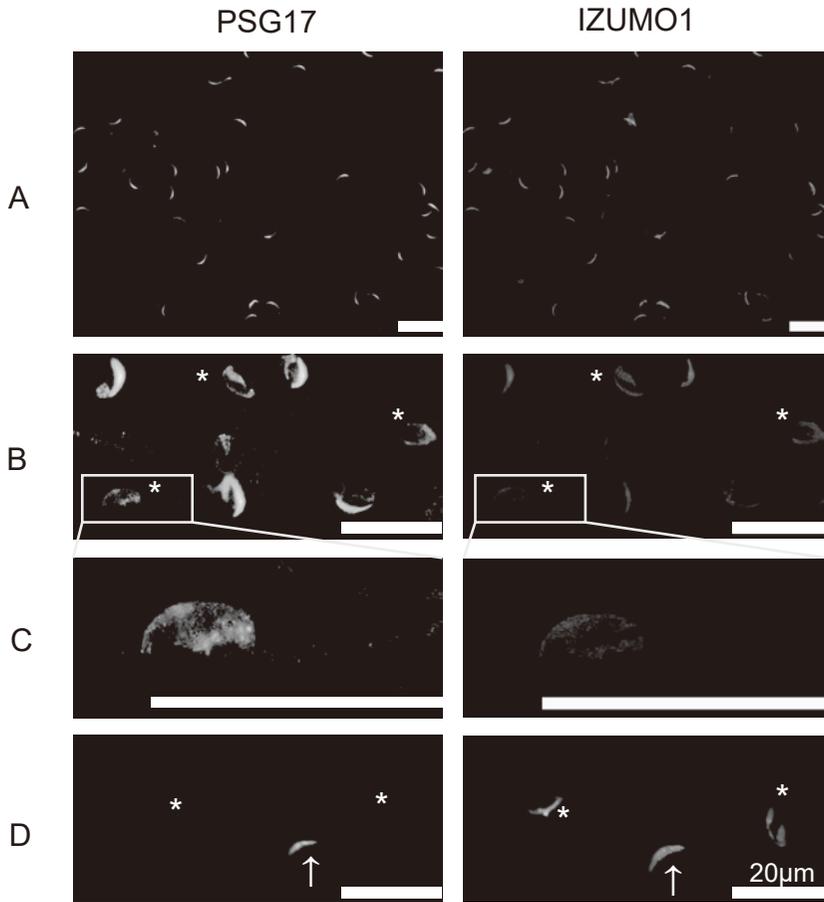


図6. 野生型マウスの精子における PSG17 の蛋白発現
 緑: PSG17, 赤: Izumo1, Aは400倍, Bは1,000倍, Cは先体反応後, DはPIPLC処理後

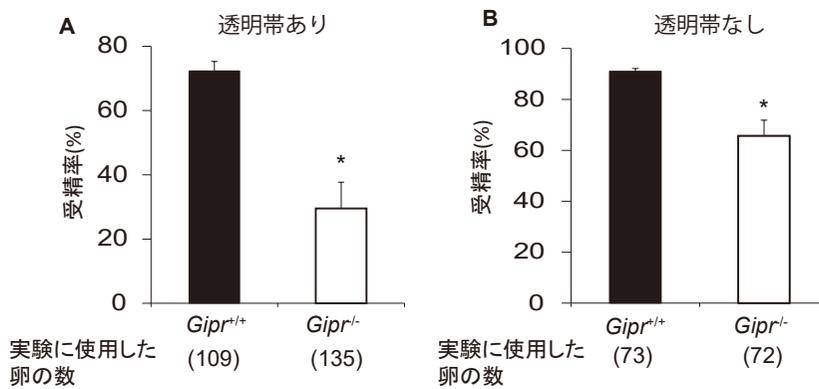


図7. 野生型マウスの精子と GIP 受容体欠損マウスの精子を用いた対外受精実験

(22)

精巣における GIP シグナルの役割

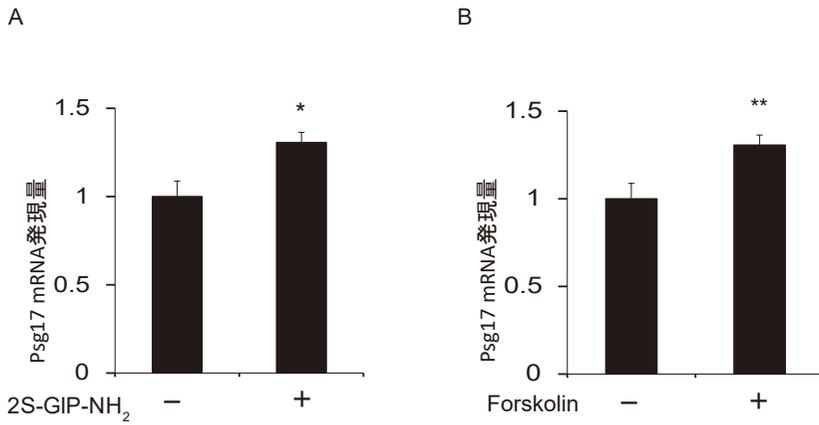


図 8. GIP シグナルと Psg17 発現量の関係

A: 野生型マウスへの GIP 腹腔内投与の有無と精巣内 Psg17 の発現量, B: 野生型マウス精巣構成細胞への Forskolin 投与の有無と Psg17 発現量

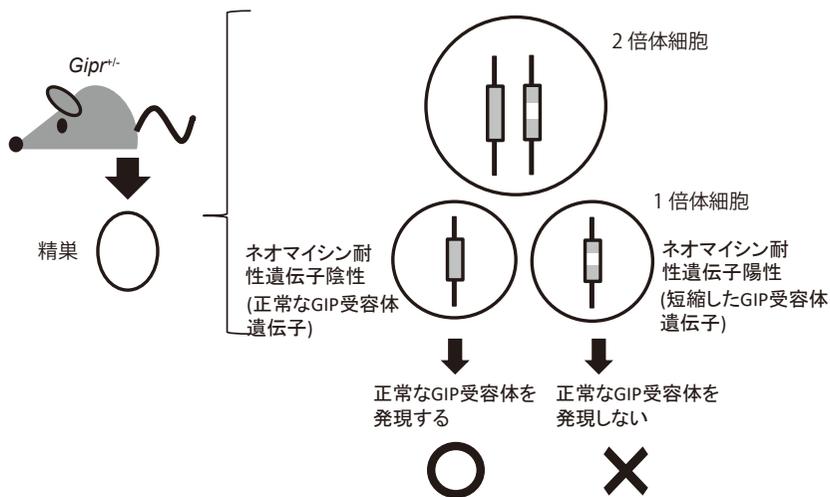


図 9. GIP 受容体ヘテロ欠損マウスの精巣内イメージ

の発現を認めなかったことから (図 10), GIP シグナルにより Psg17 が正に制御されていることが示された。

6. 食事は GIP 血中濃度・Psg17 発現に影響を与える

単回の食事摂取によって精巣内の Psg17 mRNA の発現は増加する (図 11). また, 通常食と高脂肪食では, 高脂肪食において優位に血中 GIP 濃度の増加が大きい (図 12). 過食となる ob/ob マウスの血中 GIP 濃度



図 10. 精子細胞の GIP 受容体の有無と Psg17 の発現の関係

が, 野生型マウスよりも優位に高いことも報告されている¹¹⁾. これまでの結果を考えると, 高 GIP 血症となる肥満・糖尿病モデルマウスの精巣内 Psg17 発現は

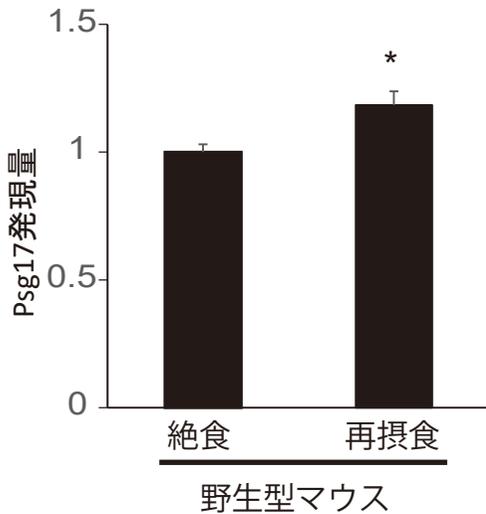


図11. 単回の食事摂取により、精巣内 Psg17 遺伝子発現は増加する

上昇することが考えられるが、実際には精巣内 Psg17 発現は劇的に低下しており、精子細胞に発現する GIP 受容体の発現量の低下が原因と考えられた (図13). 糖尿病状態における GIP 受容体の発現低下は膵臓において報告¹⁷⁾ されている. このことは、糖尿病患者に対して GIP を投与しても、有効なインスリンの上昇を得られない原因と考えられており、糖尿病の発症・進展に関与する可能性が考えられている. このように GIP シグナルは、食事の質や習慣を感知し、体の様々な組織に影響を与えているが、過食・高脂肪食による GIP 受容体の発現低下は何を起点に生じるのであろうか. 高血糖、高インスリン血症、高 GIP 血症などが

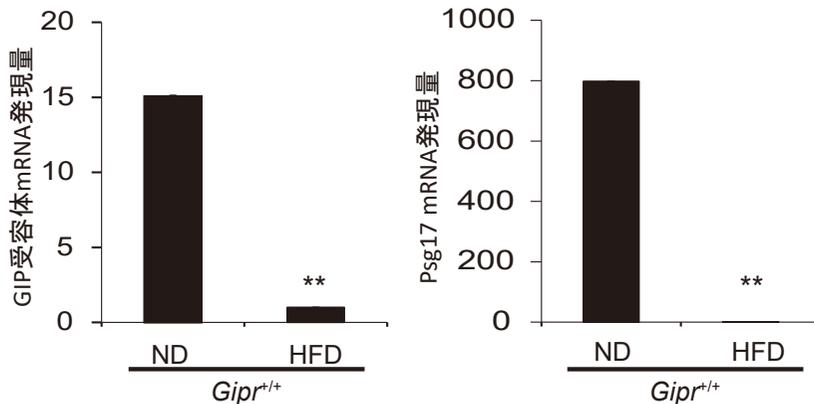


図13. 通常食 (ND) と高脂肪食 (HFD) 飼育群における精巣内 GIP 受容体・Psg17 mRNA の発現量比較

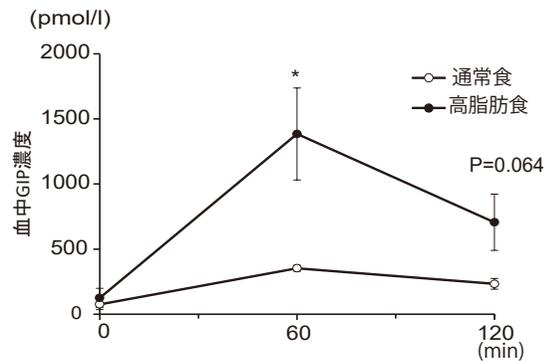


図12. 高脂肪食は通常食と比較して有意に血中 GIP 濃度を増加させる

候補に挙げられるが、高血糖の関与を調べるために、Akita マウスを用いた実験を行った. Akita マウスはインスリン 2 遺伝子に異常を有するマウスであり、高インスリン血症とならず、通常食にて高血糖となるため、高 GIP 血症を引き起こさない. この Akita マウスの精巣と野生型マウスの精巣の GIP 受容体・Psg17 遺伝子発現を比較したところ、有意な違いは見られなかった (図14). この結果から、少なくとも高血糖のみでは GIP 受容体の発現抑制はなされることが示された.

7. 食事と寿命・生殖能力の関係

以上の検討から、摂食によって引き起こされる GIP 血中濃度の上昇によって、精子細胞の Psg17 発現が上昇し、受精に有利な環境を作っていると考えられるが、慢性的な過食や高脂肪食により GIP 受容体の発現が

(24)

精巣における GIP シグナルの役割

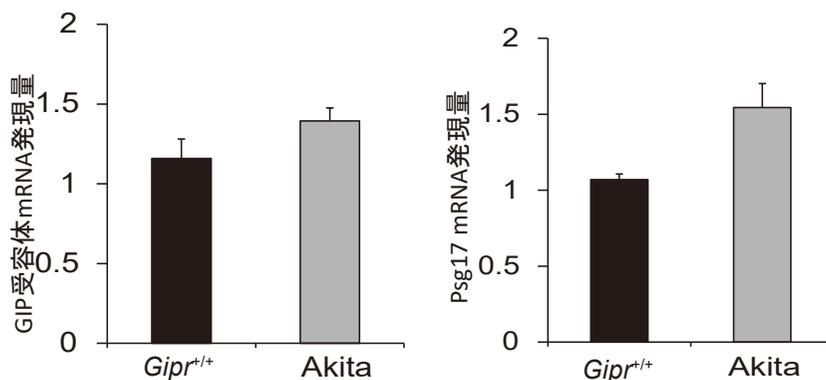


図 14. 野生型マウス (*Gipr*^{+/+}) と Akita マウス (AKITA) の精巣内 GIP 受容体・Psg17 mRNA の発現量比較

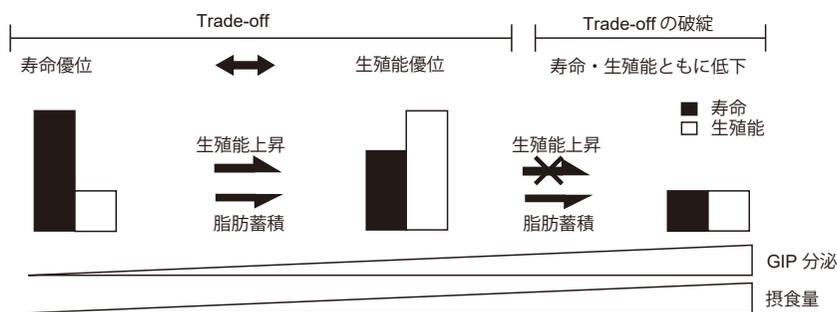


図 15. 仮説：寿命と生殖能の Trade-off には GIP シグナルが関与する

低下してしまうことで、精子細胞への GIP シグナルが低下し、受精しにくくなることが考えられた。カロリー制限は、哺乳類を含む多くの種で寿命を延長させる効果を有しているが、問題点として、生殖能力が低下することが報告されている。この現象は寿命と生殖能力の trade-off と呼ばれているが、GIP 受容体欠損マウスがカロリー制限マウスと似た表現型であること^{18,19)}、GIP のシグナルが受精をしやすい状況を作ること、また、GIP が過量に出ている状況は、肥満を引き起こし、寿命は低下する方向に働くと考えられることから、この trade-off には GIP が関与している可能性が考えられる。更に、寿命と生殖能の trade-off は、ある食事量までは成立するが、それを超える摂食が持続した場合、精子細胞の GIP 受容体の発現低下が生じることによる生殖能の低下を招き、寿命・生殖能ともに低下する trade-off の破綻が生じるものと考えられた (図 15)。

8. 結 語

本研究では、精子細胞に消化管ホルモンの一つである GIP 受容体が発現し、精子細胞は GIP シグナルによって Psg17 の発現を上昇させ、受精に有利に働いていることを明らかにした。更に、慢性的な過食や高脂肪食摂取は、高 GIP 血症となるものの、精子細胞の受容体発現が著明に低下することで精子細胞の Psg17 発現も低下することを示し、受精に不利な状況が生じることが考えられた。この機序は、肥満症・糖尿病患者における男性不妊の一部を説明し得るものと考えられ、精巣における GIP 抵抗性を改善させる薬剤や食事法は、肥満症・糖尿病における男性不妊の新たな治療戦略となるものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、当講座の山田祐一郎教授、産婦人科学講座の寺田幸弘教授をはじめとする共

同研究者の皆様、多くの実験サポートをして頂いた技術系補佐員の皆様、本研究に御協力頂きました全ての方々に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S. and Stevens, G.A. (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990 : a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.*, **9**, e1001356.
- 2) Johnson, N.P. (2014) Metformin use in women with polycystic ovary syndrome. *Ann. Transl. Med.*, **2**, 56.
- 3) McLachlan, R.I. and de Kretser, D.M. (2001) Male infertility : the case for continued research. *Med. J. Aust.*, **174**, 116-117.
- 4) Sallmen, M., Sandler, D.P., Hoppin, J.A., Blair, A. and Baird, D.D. (2006) Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology*, **17**, 520-523.
- 5) Keltz, J., Zapantis, A., Jindal, S.K., Lieman, H.J., Santoro, N. and Polotsky, A.J. (2010) Overweight men : clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **27**, 539-544.
- 6) Partridge, L., Gems, D. and Withers, D.J. (2005) Sex and death : what is the connection? *Cell*, **120** (4), 461-472.
- 7) Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., *et al.* (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, **287**, 321-324.
- 8) Ellerman, D.A., Ha, C., Primakoff, P., Myles, D.G. and Dveksler, G.S. (2003) Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 5098-5103.
- 9) Zieba, D.A., Amstalden, M. and Williams, G.L. (2005) Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism : a comparative review. *Domest Anim. Endocrinol.*, **29**, 166-185.
- 10) Zhu, C.C., Zhang, H., Zhang, J.S., Li, Z., Zhao, J., Li, W. and Zhang, Y.Q. (2013) Inhibition of ghrelin signaling improves the reproductive phenotype of male ob/ob mouse. *Fertil. Steril.*, **99**, 918-926.
- 11) Tsukiyama, K., Yamada, Y., Yamada, C., *et al.* (2006) Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 1644-1651.
- 12) Miyawaki, K., Yamada, Y., Ban, N., *et al.* (2002) Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat. Med.*, **8**, 738-742A.
- 13) Russell, L.D., Ren, H.P., Sinha, Hikim, I., Schulze, W. and Sinha, Hikim, A.P. (1990) A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.*, **188** (1), 21-30.
- 14) Waterhouse, R., Ha, C. and Dveksler, G.S. (2002) Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J. Exp. Med.*, **195**, 277-282.
- 15) Yamanaka, M., Koga, M., Tanaka, H., *et al.* (2000) Molecular cloning and characterization of phosphatidylcholine transfer protein-like protein gene expressed in murine haploid germ cells. *Biol. Reprod.*, **62**, 1694-1701.
- 16) Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, **434**, 234-238.
- 17) Lynn, F.C., Thompson, S.A., Pospisilik, J.A., Ehses, J.A., Hinke, S.A., Pamir, N., McIntosh, C.H. and Pederson, R.A. (2003) A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *Faseb J.*, **17**, 91-93.
- 18) Holehan, A.M. and Merry, B.J. (1985) Lifetime breeding studies in fully fed and dietary restricted female CFY Sprague-Dawley rats. 1. Effect of age, housing conditions and diet on fecundity. *Mechanisms of ageing and development*, **33**, 19-28.
- 19) Yamada, C., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Yamada, K., Yamane, S., Harada, N., Miyawaki, K., Seino, Y. and Inagaki, N. (2007) Genetic inactivation of GIP signaling reverses aging-associated insulin resistance through body composition changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**, 175-180.