

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20215

研究課題名(和文) 精巣組織培養法を用いた、新しい精子形成方法の開発

研究課題名(英文) Development of spermatogenesis method using testicular tissue culture method

研究代表者

吉岡 伸人 (Yoshioka, Nobuhito)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10468928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、造精機能障害患者の残存精原細胞のPI3K/Aktシグナルの活性化を行うことで精子形成を再生し、造精機能障害に対する治療法を開発することを最終目的とした。精巣組織の体外培養でPI3K/Aktシグナルの活性化により得られた精子の機能と正常性の検証についてヒト検体を用いて行った。非閉塞性無精子症患者の精巣組織における精子形成誘導を行い、得られた精子の機能解析および正常性を検証した。以上の結果から非閉塞性無精子症患者では疾患の原因が多岐にわたるために、活性化する患者もいれば活性化しない患者もいることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to regenerate spermatogenesis by activating PI3K / Akt signal of residual spermatogonia in patients with spermatogenesis dysfunction and to develop a treatment for spermatogenesis dysfunction. Human testis were used to verify the function and normality of sperm obtained by activation of PI3K / Akt signal in vitro culture of testis tissue. Spermatogenesis was induced in testicular tissues of azoospermia patients, and functional analysis and normality of the obtained spermatozoa were examined. From the above results, it was revealed that in patients with non - obstructive azoospermia, there are a variety of causes of disease, some patients may be activated but others may not be activated.

研究分野：精子形成

キーワード：精子形成 PI3K 精巣組織培養

1. 研究開始当初の背景

射精液中に精子が存在しない状態を無精子症といい、その中でも精路通過障害に起因する閉塞性無精子症と、造精機能障害に起因し精子が作られない非閉塞性無精子症 (Non-obstructive azoospermia : NOA) に分類される。卵細胞質内精子注入法 (ICSI) などの生殖補助技術の向上により、一匹でも精子を得ることができれば妊娠することが可能になってきた。しかしながら、造精機能に問題があり精子を得ることができない場合には有効な治療方法は未だない。

NOA に対する唯一の治療方法は、顕微鏡下精巣内精子回収法 (Micro-dissection testicular sperm extraction : MD-TESE) である。MD-TESE は手術用顕微鏡により精巣内を観察し、良好な精細管のみを採取し精子が含まれているか調べる手術法である。しかしながら精子獲得率は約 3 割と非常に低く、精子の獲得がなされなければ不妊治療の断念を意味する。このため、無精子症などの重症男性不妊患者が自らの精子を得て妊娠できるような新たな治療方法の開発が急務となっている。

重症男性不妊患者から精子を得る可能性のひとつとして、精子幹細胞の体外培養がある。マウスにおいて精巣組織の気層液層境界部培養法 (図) により精原幹細胞から精子への分化が報告されている (Sato T, et al. Nature. 2011)。一方で、ヒト体外培養方法の確立はなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は PTEN-Akt 経路の活性化 (IVA 技術) が卵巣においてこの経路を優位に活性化させることを明らかにし、既に臨床応用にも成功している (Kawamura K, et al. PNAS. 2013)。精子形成の調節要因としては、下垂体からのゴナドトロピンである卵胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) や、精巣のライディヒ細胞から

のアンドロゲン (テストステロンなど) と、それらの受容体、その他に精巣内で働くリガンドの局所要因などが知られている。そのリガンドの中で SCF (Stem cell factor : 別名 kit ligand) は、精子形成において重要な働きを担っている (Williams DE et al. Cell. 1990)。また、PI3K 経路は精原幹細胞の機能維持を行うなど、精子形成についても重要な関与が報告されている (論文 4,5)。従って、IVA 技術が精巣においても PTEN-Akt 経路を活性化し、これまで得られなかった体外培養における精子を獲得できる可能性がある。そこで、本研究では IVA 技術における精子形成促進の分子基盤を明らかにし、体外培養において得られた精子の正常性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスモデルを用いて精子形成過程に IVA 技術がどのような影響を及ぼすか精子形成促進作用について評価する。さらにヒト余剰精子細胞を用いて、精子体外培養法の確立を目指した。本研究では、造精機能障害患者の妊娠法確立を目標として、以下の研究項目について計画した。

IVA 技術による精子形成メカニズムへの影響を評価し、その分子基盤を明らかにする。

ヒト精子体外培養法の臨床応用を目指し、得られた体外成熟精子の正常性を評価する。

【IVA 技術による精子形成促進作用の分子基盤の解明】

Kit-ligand 欠損モデルである Steel マウスを使用する。steel マウスは、Kit-ligand の欠損により精子形成が精子幹細胞で停止するために精子細胞を得ることができず不妊を呈する動物モデルである。しかしながら Kit-ligand を添加することにおいて精子形成を再開させることができるため、精子形成メカニズムを解明する上で、非常に有用なモデルとして

使用されている。また Kit-ligand は PI3K 経路の上流に作用することが知られており、このマウスをモデルとして使用し IVA の有効性を評価した。

PTEN-Akt 経路の活性化(IVA) 技術による精子形成促進作用について明らかにし、その分子基盤を明らかにする。

A) IVA 技術による体外培養法の構築

気層液層境界部培養法を用いて、そこに PTEN-Akt 経路の活性化を行うために PTEN 阻害剤および PI3K 活性化剤を添加し培養する。コントロール群および PTEN 阻害剤および PI3K 活性化剤添加群について組織学的検索を行い、各発育段階の精子細胞を比較することで精子形成の有無を観察した。

B) IVA 技術による機能解析

IVA 技術により活性化される遺伝子を、PTEN-Akt 経路の下流因子を指標にプライマーを作成し、リアルタイム PCR 法によりその遺伝子発現の増減を明らかにする。

精子形成過程の各ステージの特異的分子マーカーを抗体を用いて蛍光標識し、免疫染色により局在を明らかにする。

・精子形成にはセルトリ細胞やライディッヒ細胞といった支持細胞が産生するホルモンが深く関与することが報告されており、IVA 技術により精巣組織内におけるホルモン産生細胞にどのような影響を与えるかを明らかにする。インヒビン、アンドロステジオン、テストステロン量を ELISA 法を用いて定量する。

【体外培養条件の最適化と得られた精子の正常性評価】

IVA 技術によるヒト精巣組織体外培養法の確立を目標として、前年度に得られたマウス体外培養精子の正常性評価を行う。さらにヒト余剰精巣組織を用いた体外培養の最適条件を決定する。

A) 前年度に得られたマウス精子の正常性評価

・得られた精子が正常な機能を持っているかを評価するために、ICSI を行い受精能・胚盤胞到達率について正常精子と比較する。さらに得られた受精卵を雌マウスの子宮内に移植し正常産仔を作成可能か判断する。

・得られた産仔についても出生仔数・出生体重について正常個体と比較し、さらに次世代への影響を見るために各臓器の組織学的検査、行動異常の有無、妊孕性、寿命等を3世代に渡り確認し安全性について十分検討する。

B) ヒト余剰精巣組織を用いた体外培養条件の最適化

気層液層境界部培養法を用いて、そこに PTEN 阻害剤および PI3K 活性化剤の種類とそれら薬剤の使用濃度・培養時間の詳細な検討を行う。PTEN 阻害剤および PI3K 活性化剤の種類とそれら薬剤の使用濃度・培養時間の詳細な検討を行う。PTEN 阻害剤および PI3K 活性化剤添加による培養前後で組織学的検索を行い、各発育段階の精子細胞を比較することで最適培養条件を見出す。

C) 得られたヒト体外培養精子の正常性評価

・**メチル化解析**：体外培養によって得られた精子と正常精子を質的に異なるかどうかについて評価を行うためにエピジェネティックな異常を検証するためにインプリント遺伝子のメチル化解析を行う。

・**ハムスターテスト**：得られた精子が受精能を持っているかを評価するために、透明帯を除去したハムスター卵子と得られた精子を ICSI を用い受精能・胚盤胞到達率について正常精子と比較する。さらに得られた受精卵を雌マウスの子宮内に移植し正常産仔を作成可能か判

断する。

・アクロビーズテスト:先体反応誘起ヒト精子と特異的に反応する MH61 モノクローナル抗体結合ビーズを用いて、ビーズに結合した精子の運動性によるビーズの凝集形成を判定の指標に確認する。

4. 研究成果

不妊症の約半数は男性因子であり、男性不妊の約 90% が造精機能障害といわれている。精子形成には PI3K/Akt シグナルが必須であるが、その分子機構には不明な点が多い。最近申請者らは、早発閉経患者の残存原始卵胞における PI3K/Akt シグナルの活性化により卵胞発育を再生し、患者の妊娠・分娩に成功した。本研究では、造精機能障害患者の残存精原細胞の PI3K/Akt シグナルの活性化を行うことで精子形成を再生し、造精機能障害に対する新たな男性不妊の治療法を開発することを最終目的としてきた。今年度は昨年度から引き続き、精巣組織の体外培養で PI3K/Akt シグナルの活性化により得られた精子の機能と正常性の検証をマウスでなくヒト検体を用いて行った。非閉塞性無精子症患者の精巣組織における PI3K/Akt シグナル活性化を用いた精子形成の誘導と得られた精子の機能解析および正常性の検証 : 昨年度に行ったマウスを用いて PI3K/Akt シグナル活性化による精子形成のプロトコールを用いて培養を行った。非閉塞性無精子症患者の MD-TESE 時に余剰となり廃棄する精巣組織を用いて、組織培養下に PI3K/Akt シグナルを活性化させ、精子形成誘導の有無について調べた。同意の得られた非閉塞性無精子症患者の精巣組織を、マウスを用いて至適化した培養条件で 740YP および bpV を添加培養した。PI3K/Akt シグナル活性化の状態をリン酸化 Akt の発現量変化増加 (ウェスタンブロットイング) PI3K/Akt シグナルの下流因子 (サ

イクリン D1, 2, 3) の発現増加 (ウェスタンブロットイング、定量的 PCR) で確認した。さらに、培養後の精子形成と各発生段階の生殖細胞の存在をマウスと同様の方法で確認する。非閉塞性無精子症患者では疾患の原因が多岐にわたるために、活性化する患者もいれば活性化しない患者もいることを明らかにした。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 第 68 回 日本産科婦人科学会学術講演会
2016 : Clinical outcomes of hormone replacement therapy for primary ovarian insufficiency

[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: 特記なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 伸人 (Yoshioka, Nobuhito)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10468928