

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10074

研究課題名(和文)胎生期の低栄養環境による精巣機能障害の発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenic mechanism of testicular dysfunction due to malnutrition during the embryonic period

研究代表者

藤澤 泰子(Fujisawa, Yasuko)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40402284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：「胎生期の低栄養環境は出生後の精巣機能障害や生殖機能障害を引き起こす」を検証しそのメカニズムを探る研究を行なった。妊娠マウスを、自由摂餌群(C群)と栄養制限群(R群)の2群に分けて検討した結果、栄養制限母体における胎仔精巣での男性ホルモン(テストステロン)低下および生後6週の精子数減少が明らかになった。以上の結果から胎生期低栄養環境に惹起された低アンドロゲン状態に起因する男性生殖器障害という新しい疾病発症セオリーが明らかになった。さらに、単離したライディッヒ細胞の全ゲノムメチロームを進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、男性生殖器疾患の発症頻度は増加しています。その理由は様々ですが、なんらかの胎児期の環境因子の影響が考えられています。私たちは、母体の低栄養環境が生後の男性精巣機能の障害に関与する可能性を考え、マウスを使った実験にて検証を行いました。その結果、1母マウスの低栄養状態が胎児(胎仔)マウス精巣における男性ホルモン(テストステロン)の濃度を低下させること、2低栄養母マウスから出生した雄マウスでは、生後6週の時点で精子数が減少すること、が明らかになりました。以上から、私たちは胎生期低栄養環境に惹起された低男性ホルモン状態に起因する男性生殖器障害という新しい疾病発症セオリーを提唱します。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study to examine the mechanism of "undernutrition environment during the embryonic period causes postnatal testicular dysfunction and reproductive dysfunction". As a result of examining pregnant mice by dividing them into two groups, a free feeding group (C group) and a nutritionally restricted group (R group), a decrease in testosterone in the fetal testis, and sperm count at 6 weeks of age in R mothers. A decrease in numbers was revealed. From the above results, a new disease-onset theory of post-growth sperm count decrease due to low androgen state induced in the embryonic malnutrition environment was clarified. Furthermore, we are proceeding with whole-genome methylome of isolated Leydig cells.

研究分野：小児内分泌学 DoHAD

キーワード：胎生期低栄養環境 精巣機能低下 低アンドロゲン DoHAD

## 1. 研究開始当初の背景

男性の性分化疾患や性腺機能不全症は、遺伝的要因が判明しないケースが少なくないことから、私たちは環境要因の関与に着目してきた。重要な環境要因である胎生期の低栄養は、出生後の生活習慣病などの発症リスクをあげるが、男性の性腺 (= 精巣) への関与は明らかでない。

## 2. 研究の目的

本研究は、胎生期低栄養環境が出生後の精巣機能障害を引き起こすことを実証し、そのメカニズムを解明することを目的とするものである。本研究の着想の骨子は、以下の項目の学術的背景である。

1. 男性の性分化疾患や精巣機能不全症の発症機序の遺伝的原因が判明するのは、20%未満であると報告されている。このことは、男性の性分化疾患や精巣機能不全症発症には、遺伝以外の要因すなわち環境要因の関与が大きいことが予測される。

2. 妊娠中の低栄養を原因の一つとする子宮内発育遅延の児は、尿道下裂などの軽症の性分化疾患や、精巣形成不全症候群 (性の分化から生殖能の障害までの複数の疾患がオーバーラップした状態) のハイリスク群である。

3. マウスの未分化性腺が精巣に分化するときには、精巣のセルトリ前駆細胞に蓄えられた大量のグリコーゲンが消費されることがわかっている。この報告は、雄の性分化には十分なエネルギーが必要であることを示しており、よって性分化臨界期の低栄養は性分化を障害しうると考えられる。

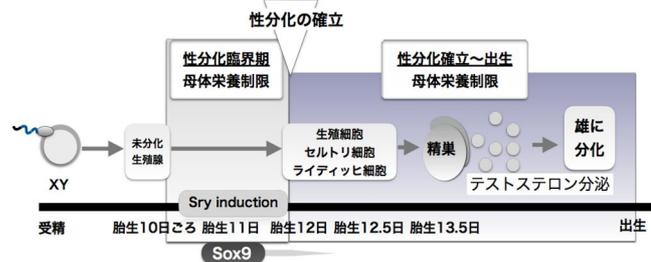
4. 胎生期から出生早期にかけての環境と、疾病発症との関連は、「Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD)」理論として確立されている。特に母体低栄養と高血圧・糖尿病といった生活習慣病との関連は、膨大な先行研究によってほぼ確定的である。一方、胎生期の栄養環境と雄の性分化や精巣機能についての研究成果は限られており、発症のメカニズムにまで踏み込んだ研究はない。

以上の背景から、仮説を「胎生期の低栄養環境が精巣機能障害を引き起こす」と設定し、その実証とメカニズムの解明に取り組んだ。具体的には、妊娠マウス (野生型および性分化関連遺伝子改変マウス) に栄養制限を加え、雄の胎仔と成獣における精巣について解析した。

## 3. 研究の方法

野生型 C57BL/6 マウスを使用する。性腺が正常な機能を発揮するためには、胎生期において、性分化臨界期 (マウス: 胎生 11.5 日) における生殖腺における性の決定と、これに引き続く性腺の器官発生から機能の獲得までの 2 つのステップが問題なく行われる必要がある (右図)。

母体低栄養マウスモデルは、これまでの報告と準備実験の結果をもとに、妊娠維持に影響がなく栄養制限効果が最大に発揮される 50% カロリー制限を行い作成する (Calorie-restricted, R 群)。自由摂餌妊娠マウスをコントロール (C 群) とする。飼料は standard chow 準拠したオーダーメイド飼料 (Research Diet 社) を使用する。摂餌制限は性分化臨界期を含む 6.5 days post coitum (dpc) から分娩直前 17.5 dpc まで行う。



1. 母獣の体重推移、胎仔体重、肛門性器間距離 (Anogenital distance, AGD, 胎生期アンドロゲン暴露量と関連し、短縮は低アンドロゲン環境を示唆する) および AGDI (Anogenital index = AGD/kg<sup>3</sup>) の評価

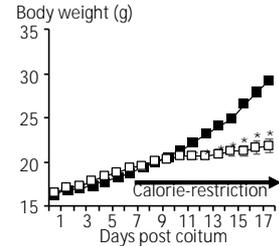
2. 性ステロイド産生酵素・ライディッヒ細胞マーカー・セルトリ細胞マーカー遺伝子の発現解析

3. 17.5 dpc、出生後 6 週 (成獣) (6 weeks) の精巣の形態評価 (HE 染色) および免疫染

- 17.5 dpc、出生後6週(成獣)(6 weeks)の精巣におけるテストステロン濃度の評価
- 6 weeksにおける精子数・精子運動能の評価
- 6 weeksにおける精巣の遺伝子発現プロファイル

#### 4. 研究成果

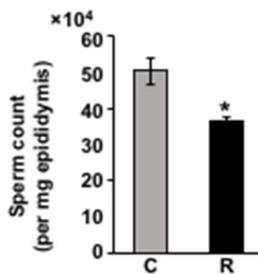
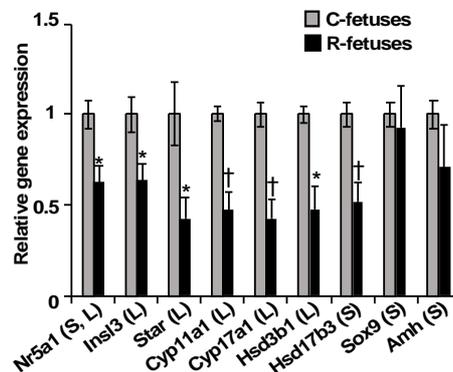
母獣摂餌制限を行い、出生直前の胎仔(17.5 dpc)および出生後6週齢(6 weeks)のマウス精巣について解析を行った。母獣の体重の推移は右図の通りである(□C群 R群) 仔の出生体重はR群においてC群より約35%小さく、母体の低栄養状態による子宮内発育遅延が引き起こされた。AGDは雄雌胎仔AGDI(Ano-genital index=AGD/kg<sup>3</sup>)では、R群の胎仔雄胎仔における有意な短縮が明らかになった(右表)。この結果から、胎仔精巣におけるアンドロゲン産生が低下している可能性が考えられたため、さらに精巣におけるテストステロン(T)産生関連酵素の発現を調べた。



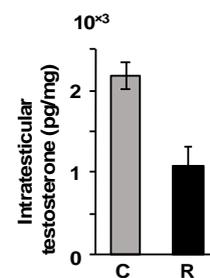
		C-fetuses	R-fetuses	P-value
Weight (g)	Male	0.82 ± 0.01 (n = 73)	0.61 ± 0.02 (n = 33)	<b>1.7E-11</b>
	Female	0.88 ± 0.03 (n = 46)	0.59 ± 0.02 (n = 29)	<b>6.4E-10</b>
AGD (mm)	Male	1.37 ± 0.03 (n = 73)	1.14 ± 0.33 (n = 33)	<b>0.00015</b>
	Female	0.74 ± 0.02 (n = 46)	0.61 ± 0.02 (n = 29)	<b>0.00034</b>
AGDI (mm/g <sup>3</sup> )	Male	1.46 ± 0.03 (n = 73)	1.34 ± 0.06 (n = 33)	<b>0.042</b>
	Female	0.78 ± 0.02 (n = 46)	0.73 ± 0.03 (n = 29)	0.20

C, control; R-calorie-restricted; AGD, anogenital distance; and AGDI, anogenital distance index.

その結果、R群の胎仔における *Star*、*Cyp11a1*、*Cyp17a1*、*Hsd3b1*、*Hsd17b3* の遺伝子発現は有意に低下していた(右図)。これらの遺伝子は *Hsd17b3* を除いて全てライディッヒ(Leydig)細胞[右図にて遺伝子名に続き(L)と表記]に発現する遺伝子である。さらにやはりライディッヒ細胞に発現する *Insl3* およびステロイド産生酵素の発現におけるマスター遺伝子的な役割を担う *Nr5a1*(ライディッヒ細胞およびセルトリ細胞に発現)の発現低下が明らかになった。一方、セルトリ細胞に発現する *Sox9* および *Amh* の発現はC群胎仔とR群胎仔との間で有意差を認めなかった。これらの酵素発現の挙動と一致して胎仔精巣内T濃度は、R群においてC群の50%程度にまで低下していた(右図)。



出生後の成獣(6 weeks) 生後6週の時点でR群の精子数はC群の56%まで減少していた(左図)。精巣重量および精子運動能は2群間の差はなかった。生後6週の精巣発現遺伝子の網羅的解析にてセルトリ細胞に関連する複数の遺伝子の発現低下が明らかになった。



本研究によって、胎生期の低栄養環境が、胎仔精巣のテストステロン産生障害と成長後の精子形成障害を引き起こすことを明確にすることができた。さらに胎生期低栄養マウスモデルにおける胎仔精巣テストステロン産生障害の機序として、胎仔ライディッヒ細胞に特異的なエピゲノム変化が生じている可能性を考え、胎仔型ライディッヒ細胞特異的にEGFPを発現するトランスジェニックマウス(Ad4BP/SF-1-EGFPマウス)を利用し、ライディッヒ細胞を単離し、ライディッヒ細胞における全ゲノムメチル化解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Hiroyuki, Saito Hiroto, Horikawa Reiko, Nakashima Shinichi, Ohkubo Yumiko, Yanagi Kumiko, Nakabayashi Kazuhiko, Fukami Maki, Fujisawa Yasuko, Ogata Tsutomu	4. 巻 8
2. 論文標題 Partial androgen insensitivity syndrome caused by a deep intronic mutation creating an alternative splice acceptor site of the AR gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-20691-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukami Maki, Suzuki Erina, Izumi Yoko, Torii Tomohiro, Narumi Satoshi, Igarashi Maki, Miyado Mami, Katsumi Momori, Fujisawa Yasuko, Nakabayashi Kazuhiko, Hata Kenichiro, Umezawa Akihiro, Matsubara Yoichi, Yamauchi Junji, Ogata Tsutomu	4. 巻 21
2. 論文標題 Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein-coupled receptor PROKR2 promotes early puberty	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med	6. 最初と最後の頁 2623 ~ 2626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.13146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohtaka Kohnosuke, Fujisawa Yasuko, Takada Fumio, Hasegawa Yukihiko, Miyoshi Tatsuya, Hasegawa Tomonobu, Miyoshi Hideaki, Kameda Hiraku, Kurokawa-Seo Misuzu, Fukami Maki, Ogata Tsutomu	4. 巻 38
2. 論文標題 FGFR1 Analyses in Four Patients with Hypogonadotropic Hypogonadism with Split-Hand/Foot Malformation: Implications for the Promoter Region	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 503 ~ 506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.23178	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamato Kaori, Saito Hiroto, Nakagawa Norio, Nakajima Hisakazu, Hasegawa Tatsuji, Fujisawa Yasuko, Kagami Masayo, Fukami Maki, Ogata Tsutomu	4. 巻 38
2. 論文標題 De novo IGF2 mutation on the paternal allele in a patient with Silver-Russell syndrome and ectrodactyly	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human mutation	6. 最初と最後の頁 953 ~ 958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.23253	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤澤泰子
2. 発表標題 胎生期低栄養環境は胎仔テストステロン産生障害と成獣精子形成障害を引き起こす
3. 学会等名 第37回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤泰子
2. 発表標題 胎生期低栄養環境は胎仔テストステロン産生障害と成獣精子形成障害を引き起こす」
3. 学会等名 第8回日本DOHaD学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤泰子
2. 発表標題 胎生期低栄養環境が仔マウスの精巣機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会 宮崎 2018年4月26日-28日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤澤泰子
2. 発表標題 胎生期低栄養環境は胎仔テストステロン産生障害と成獣精子形成障害を引き起こす
3. 学会等名 第52回日本小児内分泌学会学術集会 東京 2018年10月4-6日
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	緒方 勤 (Ogata Tsutomu)	浜松医科大学・小児科・教授	
研究協力者	伊東 宏晃 (Itoh Hiroaki)		
研究協力者	深見 真紀 (Fukami Maki)		
研究協力者	諸橋 憲一郎 (Morohashi Kenichiro)		
連携研究者	紺野 在 (Konno Aru) (20573059)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教  (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------