

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09153

研究課題名(和文) 3次元再構築精巣をツールとした精子形成不全発生過程の解明

研究課題名(英文) Three-dimensional reconstructed testis as a new tool for studying the development of spermatogenic failure.

研究代表者

吉池 美紀 (Yoshiike, Miki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：60398964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：3次元再構築精巣というツールを用いて、精子形成不全発生過程を、精子形成および障害に関連した種々の指標の3次元分布に基づいて解析することを目的として研究を行った。0および70日齢の正常ハムスター精巣の病理標本から、3次元可視化解析ソフトを用いて3次元再構築を行った。その結果、いずれの精巣も精細管の数は8-11本で、2-4本の支配的な管があり、その管だけで全長の80%以上を占め、全周性に存在した。残りの管は短く、精巣の片側だけに存在した。全体として、精細管の走行に規則性はなかった。本法はシンプルであるが、複雑な管構造の解析に有用な方法であり、精子形成の研究の発展に貢献できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハムスター精巣を用いての3次元再構築は他に例がなく、また精子形成不全モデル動物を用いての検討も初の試みである。特に、3次元再構築された精巣の全体像を対象とした観察からは、精巣組織の一部を用いた検討からは得られない新たな発見がある。本研究ではモデル動物と精巣の3次元再構築および多様な情報のマッピングを組み合わせることにより、精子形成不全発生過程を経時的・空間的・多面的に観察することが可能になる。またこの結果から、障害が進んでも精子形成が残存している領域の位置や偏りなどの情報が得られれば、ヒトでのMD-TESEによる精子回収率を向上させるための新しい指標を開発する有力な手がかりとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to clarify the precise 3-dimensional (3D) structure of seminiferous tubules in hamsters to serve as a research tool for studying spermatogenesis and spermatogenic failure. We reconstructed all seminiferous tubules in testes from 0-day (new born) and 70-day (adult) Syrian hamsters using serial paraffin sections and high-performance 3D re-construction software. In either age hamster, the numbers of seminiferous tubules were 8-11, in which there were 2-4 dominant tubules accounting for over 80% of the total length. The dominant tubules were occupied the testis from the surface over the circumference to the center, while the others were short and occupied only one side of the testis. Although the procedure used in the present study is simple, it is a powerful tool to analyze organs with complex tubular structures, and will be useful for studying spermatogenesis under normal and pathological states.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：3次元再構築 精巣 ハムスター 停留精巣

1. 研究開始当初の背景

現在、男性不妊外来において、無精子症をはじめとする精子形成不全の多くは原因不明の特発性造精機能障害と診断されている。これは、精子形成不全が多様な原因で起こることと、その発症メカニズムがよく解明されていないことに起因する。近年の生殖補助医療技術の進歩により、非閉塞性無精子症患者においても精巣から精子が回収できれば、顕微授精によって児が得られる時代になった。しかしながら、最終的に産児を得る率はまだまだ低く、その治療過程で不妊カップルが被る身体的・精神的・経済的負担は計り知れず、社会的にも医療費の高騰を加速化するという問題点を抱えている。自然妊娠につながる根本的な治療を可能にするには、精子形成障害の原因と発症過程の解明を格段に進展させる必要があり、そのためには従来とは異なる研究アプローチと新たな研究ツールが必要になると考えた。

そこで今回、精巣の病理組織学的情報から精巣を3次元再構築する手法を用いて、精巣に精子形成不全が起こるメカニズムを解明することを発案した。精巣の3次元再構築は担当研究者の仲田により確立された手法で、精巣の連続病理切片を一定間隔でデジタルデータとして取り込み、3次元構築用ソフトウェアを用いて画像処理により再構築するという技術である。仲田らはこの方法にてマウス精巣の精細管を詳細に解析し、精巣網に繋がっている精細管の数、長さ、分枝数、盲端数などを明らかにし、精巣内での全ての精細管の走行を立体的に示すことに成功した(図1, Nakata H, et al. *Reproduction*, 2017, 154:569-579)。また、精子形成開始直後のマウス精巣の acrosome を指標として3次元再構築精巣上で精子形成の開始点を観察し、精子形成に空間的な「偏り」があることを証明した(図2)。

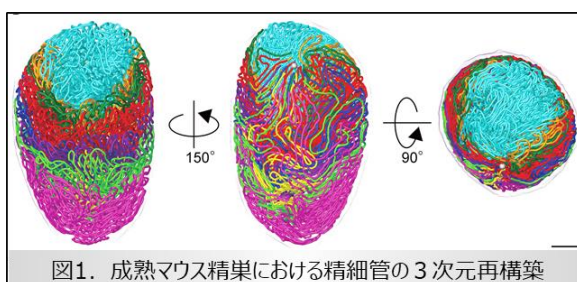


図1. 成熟マウス精巣における精細管の3次元再構築

研究代表者らはこの“3次元再構築精巣”というツールを用いて、精子形成不全が生じる過程を、精子形成およびその障害に関連した種々の指標(形態学的指標・各種精子形成関連マーカーなど)の3次元分布に基づいて詳細に解析する研究計画を立てた。本研究課題における学術的問いは、『精子形成不全に陥っていく精巣において、その障害は精巣内のどの部域から、どのような変化として始まり、どのように進展していくのか?』である。

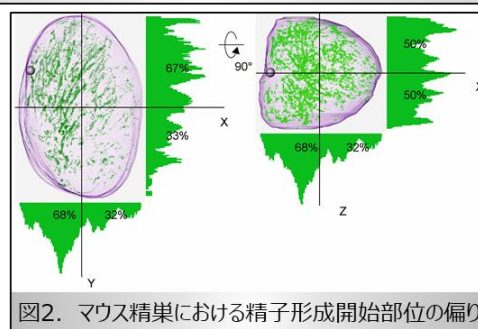


図2. マウス精巣における精子形成開始部位の偏り

2. 研究の目的

本研究の目的は、精子形成不全の発生と進展の過程を“3次元再構築精巣”というツールを用いた立体構造の中で明らかにし、そこに関与する因子を同定することであり、① ハムスター精巣の3次元再構築による立体的基本構造の解明、② 精子形成障害の発生と進展の解明、③ 精子形成障害の発生と進展に関与する因子の同定の3点を検討項目とする。

ハムスター精巣を用いての3次元再構築は他に例がなく、また精子形成不全モデル動物を用いての検討も初の試みである。特に、3次元再構築された精巣の全体像を対象とした観察からは、精巣組織の一部を用いた検討からは得られない新たな発見があると確信している。本研究ではモデル動物と精巣の3次元再構築および多様な情報のマッピングを組み合わせることにより、精子形成不全発生過程を経時的・空間的・多面的に観察することが可能になる。またこの結果から、障害が進展しても精子形成が残存している部域の位置や偏りなどの情報が得られれば、ヒトでのMD-TESEによる精子回収率を向上させるための新しい指標を開発する有力な手がかりとなることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) ハムスター精巣の3次元再構築による立体的基本構造の解明

ハムスター精巣の精細管3次元再構築を行い、そこに精子形成障害と関連があると考えられる血管走行についての3次元情報を加えることで、精子形成障害を評価するための、正常精巣の立体的な基本構造を明らかにする。

① ハムスター精巣の3次元再構築

0日齢 (new born) と 70日齢 (adult) の正常なシリアンハムスターから摘出した精巣のブアン液 (or 4%PFA) 固定-パラフィン包埋後、5 μ m 連続切片を作製する。まずラミニンの免疫染色により精細管基底膜を描出し、10枚おきにデジタルデータとして病理画像を取り込む。3次元可視化解析ソフト Amira を用いて画像の軸合わせを自動で行い、精細管を精巣網から連続的に半自動でトレースすることで3次元再構築する。

② ハムスター精巣の精細管の立体構造解析

再構築した3次元データより、精細管の数、長さ、分枝数、盲端数、精巣網への結合点などを全精細管について解析し、ハムスター精巣の立体的基本構造を明らかにする。

(2) 精子形成障害の発生と進展の形態学的解明

精子形成不全モデルを作製し、経時的にサンプリングした精巣を3次元再構築後、精子形成に関連のある種々の形態学的指標をマッピングし、その3次元情報から障害の発生と進展を解明する。

① 停留精巣による精子形成不全モデルの作製

サイズの大きなハムスター精巣では1個の精巣の3次元再構築に多大な時間と労力を要することが研究の進展の妨げとなっていた。そこで、成熟マウスの精巣 (重量比でハムスター精巣の約10分の1) を用いて同様の検討を行い、停留精巣マウスの精巣との比較から、精子形成およびその障害に関連した指標の解析を行うこととした。

左側精巣を挙上し、腹腔内に固定した後、経時的にサンプリングする。手術後の日数を検討し、病理標本の評価から精子形成不全の程度が異なる初期~後期の3種類 \times 3個体を作製する。

② 精子形成不全モデル精巣の3次元再構築と形態学的解析データのマッピング

正常と同様の手法にて、精子形成不全モデルマウス精巣を3次元再構築する。デジタルデータ化した病理画像の全精細管について、精細管上皮ステージ、Johnsen score、精細管直径、精細管壁厚、精細管占有率などを形態学的に評価し、3次元再構築データ上に自動で情報をマッピングする。

4. 研究成果

(1) ハムスター精巣の3次元再構築による立体的基本構造の解明

0日齢 (3例) と 70日齢 (1例) の正常なシリアンハムスターから摘出した精巣を固定・包埋後、連続切片を作製し、3次元再構築した。

0日齢においては、精細管の本数は平均9本、分岐は93.0カ所、精巣網との結合点は89.7カ所、精細管の全長は62.0mmであった。盲端は3例の解析で2カ所存在した。精巣1つに2-4本の支配的な管があり、その管だけで全長の86%を占めた(図3)。

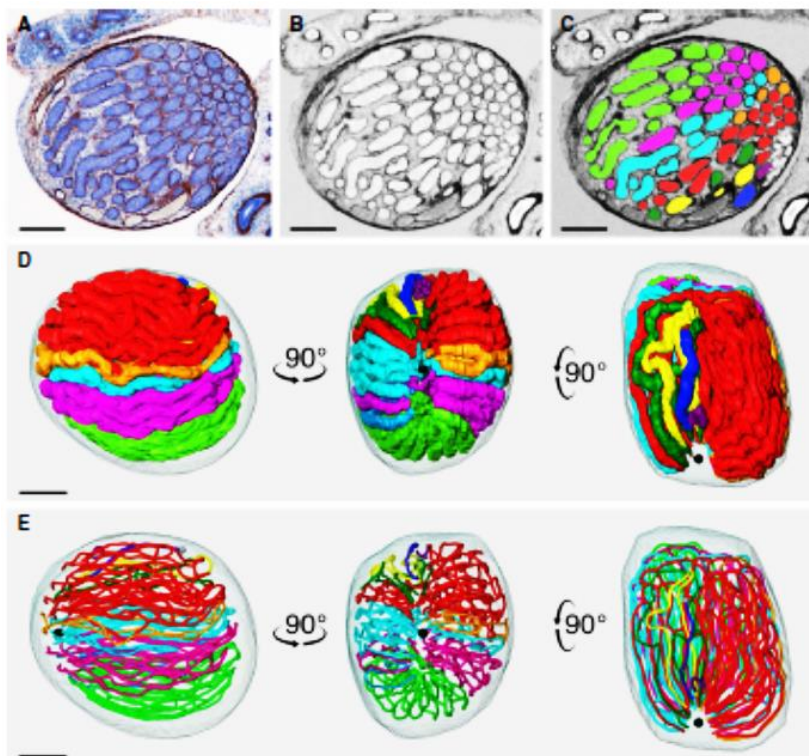


図3

0日齢ハムスター精巣の断面標本

A: α SMA 染色像

B: 色抽出による精細管の描出

C: 3次元再構築後に異なる

精細管を色分けした合成図

D: 再構成された全ての精細管

E: 全ての精細管の中心線

70日齢においては、精細管の本数は11本、分岐は88カ所、精巣網との結合点は98カ所、盲端は2カ所、精細管の全長は22mであった。支配的な管が3本あり、全長の83%を占め、全周性に存在した。残りの8本は短く、精巣の片側だけに存在した。全体として、走行の規則性はなかった(図4,5)。

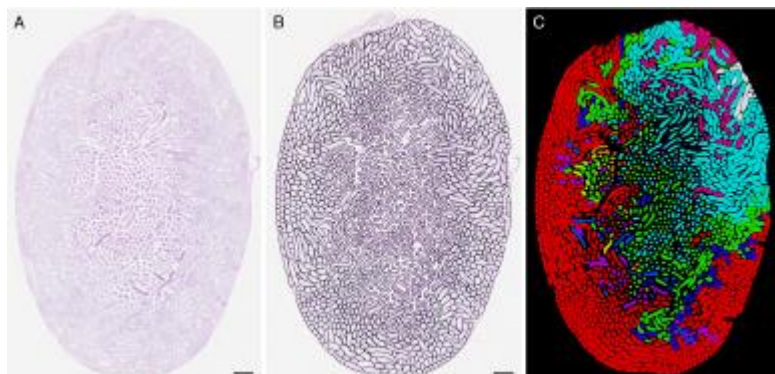


図4
70日齢ハムスター精巣の断面標本
A: PAS染色像
B: 精細管基底膜の描出
C: 3次元再構築後に異なる精細管を色分けした合成図

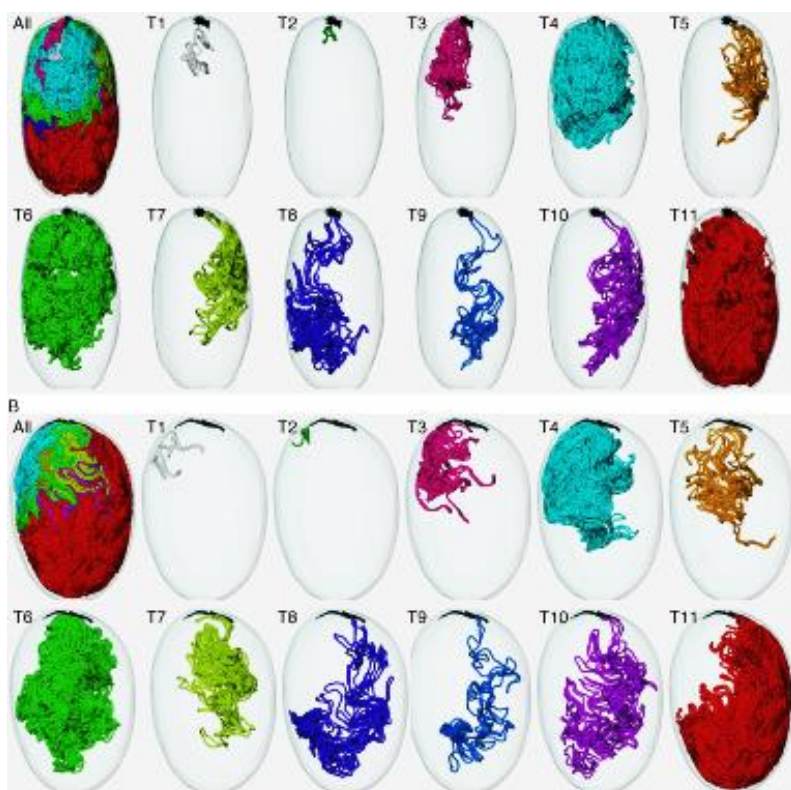


図5
70日齢ハムスター精巣に再構築された全て(11本)の精細管の中心線(BはAの90°回転)

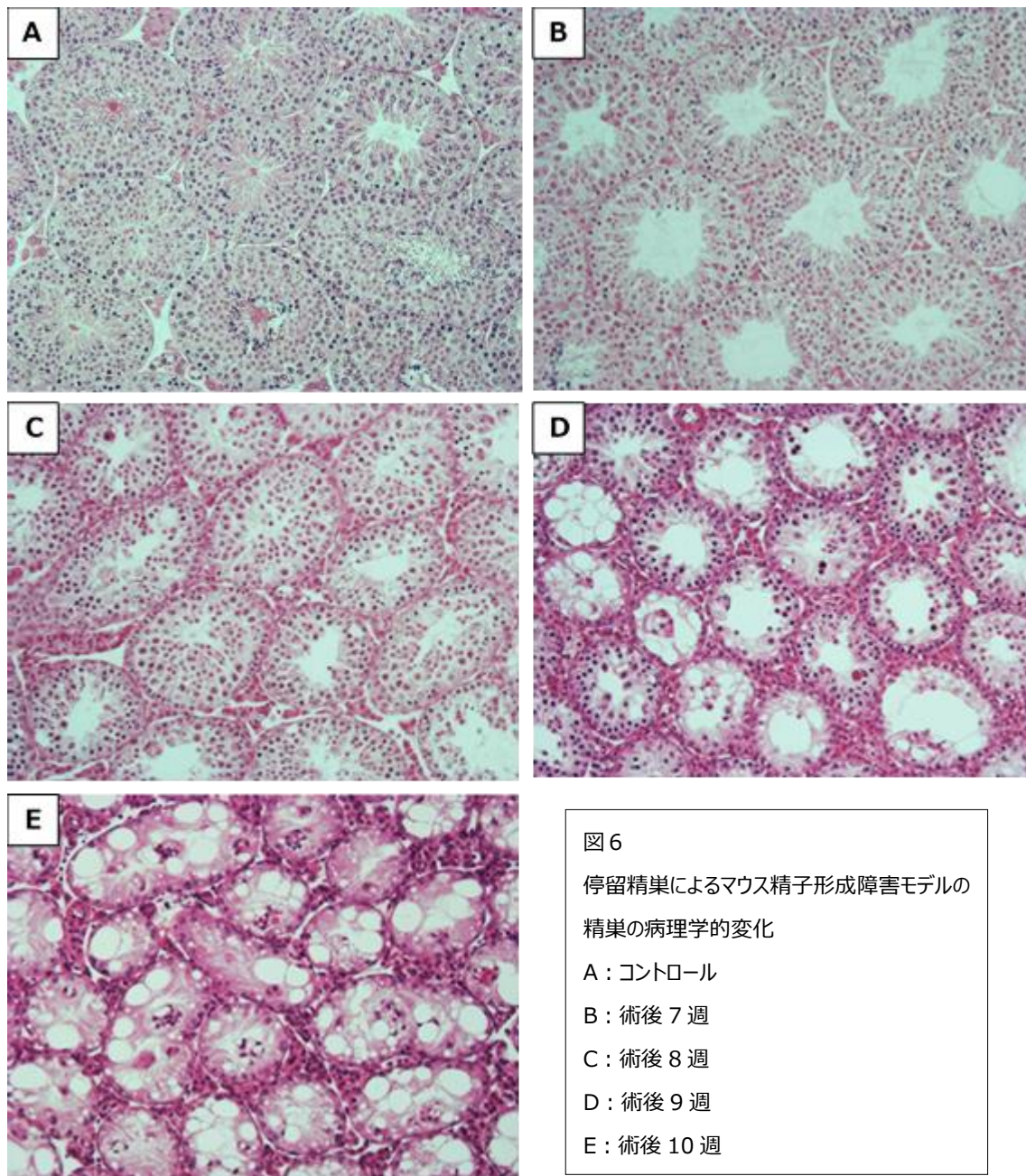
本法はシンプルであるが、複雑な管構造の解析に有用な方法であるとともに、正常または病的な男性生殖システムの研究に貢献できると推察された。

(2) 精子形成障害の発生と進展の形態学的解明

精子形成障害モデルとして、精巣を腹壁に固定する停留精巣手術を施した停留精巣マウスを作製した。術後5、7、8、9、10週の精巣からパラフィン切片HE染色組織標本を作製し、その組織像を対側の未処理の精巣(sham control 図6-A)と比較したところ、精巣重量は術後5週から停留精巣マウスで有意に低下するものの、5・7週の精巣組織では精子形成を認める精細管がまだ一部に観察された(図6-B、術後7週:一部に精子形成を認めるがmaturation arrestが始まりかけている。精子・精細胞が減少または消滅し始めている)。顕著な精子形成障害は術後8・9週間から始まり、個体によって精細胞のmaturation arrest(図6-C、術後8週)またはSertoli cell only、あるいはその両方(図6-D、術後9週)が観察され、全精細管がSertoli cell onlyとなるのに10週間を要した(図6-E、術後10週:空砲化が著しく、大部分がSertoli cell onlyで精細胞は殆ど残存していない)。一方ハムスターの停留精巣では術後2週間でSertoli cell onlyを呈するので、マウスでは精子形成障害が起こるまでの期間が長いことがわかった。

停留精巣マウスでは、術後日数を基準にすると、精巣重量の低下と精子形成障害の進行のいずれも個体差が大きかったが、今回観察した限りでは精巣重量が小さいほど精子形成障害が進行している傾向にあった。

さらに、精子形成障害の回復を観察するモデルとして、マウス停留精巣手術後 10 週間経過した後、腹壁に固定した精巣を解除し陰嚢内に戻す手術を試みた。停留精巣解除後 8 週間後に開腹して精巣を回収したが、精巣が腹腔内に戻っている個体が多く、手術法にさらなる工夫が必要であることが明らかになり、3次元再構築には至らなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakata Hiroki, Yoshiike Miki, Nozawa Shiari, Sato Yoko, Iseki Shoichi, Iwamoto Teruaki, Mizokami Atsushi	4. 巻 238
2. 論文標題 Three dimensional structure of seminiferous tubules in the Syrian hamster	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 86 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joa.13287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoko, Asahina Kiyoshi, Yoshiike Miki, Nozawa Shiari, Otoi Takeshige, Iwamoto Teruaki	4. 巻 20
2. 論文標題 A change in the steroid metabolic pathway in human testes showing deteriorated spermatogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 210 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.repbio.2020.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Youichi, Tajima Atsushi, Kiguchi Misaki, Kogusuri Suzu, Fujii Aki, Sato Takehiro, Nozawa Shiari, Yoshiike Miki, Mieno Makiko, Kojo Kosuke, Uchida Masahiro, Tsuchiya Haruki, Yamasaki Kazumitsu, Imoto Issei, Iwamoto Teruaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Genome-wide association study of semen volume, sperm concentration, testis size, and plasma inhibin B levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 683 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0757-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲田浩規、吉池美紀、野澤資亜利、佐藤陽子、井関尚一、岩本晃明、溝上敦
2. 発表標題 ハムスター精細管の詳細な三次元構造を明らかにする
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	岩本 晃明 (Iwamoto Teruaki) (60046117)	国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・教授 (32206)	
研究分担者	佐藤 陽子 (Sato Yoko) (50398963)	東海大学・生物学部・教授 (32644)	
研究分担者	仲田 浩規 (Nakata Hiroki) (80638304)	金沢大学・医学系・講師 (13301)	

	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	野澤 資亜利 (Nozawa Shiari)	聖マリアンナ医科大学・医学部・非常勤講師 (32713)	
研究協力者	岡部 幸子 (Okabe Sachiko)		

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
---------	---------