

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09701

研究課題名(和文)精子ミトコンドリアの解析による精索静脈瘤の病態解明および新規治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pathology of varicocele and development of new treatments through analysis of sperm mitochondria

研究代表者

小林 秀行 (Kobayashi, Hideyuki)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：10408875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：2019年度は、精索静脈瘤患者の精液検体の採取に重点を置いてきたが、コロナ渦の影響で2020年4月以降の手術は中止となり、その後も手術件数は増えず思うように検体は集まらなかった。そのため、無精子症の精巣組織の病理画像をAIによって分類する研究を開始した。2010年から2019年の10年間の無精子症患者に対して精巣内精子採取術(TESE)を行った275例中264症例の病理標本を対象に合計7,115枚の病理写真を撮影し、精巣内での精子への成熟度を示すJohnsen scoreのAI判別モデルを作成した。2021年5月に英国科学誌「Scientific Reports」に発表することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、精巣内での精子への成熟度を示すJohnsen scoreは病理専門医によって判定されている。しかし、病理専門医数は全国2700名程度で、決して多いとは言えず診断までに時間がかかっている状況である。そこで、AIによってJohnsen scoreを判別することができれば、患者も迅速に結果を受け取ることができ、さらに病理専門医の仕事の軽減にもつながると考えている。Johnsen scoreのAI判別モデルは、世界に先駆けて発表した研究内容であり、他論文に対して引用も数多くされている。今後、製品化をすることができれば、実際に患者や病理専門医に対して利益をもたらすと考えている。

研究成果の概要(英文)：In 2019, we have focused on collecting semen specimens from patients with varicocele, but due to the infection of COVID-19, varicocele surgeries were cancelled after April 2020, and specimens were not collected as expected after that without an increase in the number of surgeries. Therefore, a study was initiated to classify pathological images of testicular tissue in azoospermia by AI: a total of 7,115 pathological photographs were taken of pathological specimens from 264 out of 275 cases in which testicular sperm extraction (TESE) was performed on azoospermia patients over a 10-year period from 2010 to 2019, and a total of 7,115 pathological images were taken of the testicular tissue. The results were published in Scientific Reports in May 2021.

研究分野：男性不妊症

キーワード：男性不妊症 Johnsen score micro TESE 無精子症 AI

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精索静脈瘤と不妊との因果関係は、19世紀末にBarfieldらが報告しているが、現在に至るまでに人工授精、体外受精、顕微授精といった生殖補助医療(assisted reproductive technologies : ART)が生殖医療の中心となり、精索静脈瘤の立ち位置は遅れをとってきた。また、2003年にLancetの報告の中で、精索静脈瘤に対する手術は効果がないとされ、その後2013年に精索静脈瘤手術に一定の効果を認めると修正論文を発表するまでの10年間は、混沌とした時代を過ごしてきた。最近では、顕微授精を含めたARTの成績にも限界があり、精索静脈瘤を治療することによりARTの成績を上げることが分かってきた。そのため、精索静脈瘤に対する手術は再評価され、認知されてきている。また、2018年4月より顕微鏡下精索静脈瘤手術が保険収載され、世間においても、治療の重要性は高まっている。

精索静脈瘤における外科的治療は、内精静脈を結紮することにより、静脈血の逆流を失くし、よりスムーズな血流を施すことで精液所見が改善することである。しかし、精索静脈瘤が不妊を引き起こすメカニズムに関して、静脈血のうっ滞による陰嚢温度の上昇、酸化ストレスの上昇、精子DNAダメージなどの造精機能障害が指摘されているが明確なメカニズムは不明のままである。

10年以上前にミトコンドリアゲノムに突然変異を導入したマウスでは、精子数の減少と精子運動能の低下が見られると報告されている(Nakada et al. PNAS, 2006)。しかし、ヒトでの研究はほとんど行われていない。最近、精索静脈瘤における精子ミトコンドリアの構造と機能に関するタンパク質の異常を示唆する報告がされた(Samanta et al. the J of Urology, 2018)。

そこで精索静脈瘤の原因を精子ミトコンドリアに着目し、詳細に探ることにより、外科的治療を超えた治療法の確立を目指した。

2. 研究の目的

精索静脈瘤は静脈血が腎静脈から内精静脈へ逆流するために、蔓状静脈叢が怒張およびうっ血をきたした状態であり、多くは左側に発生する。造精機能障害の原因は静脈血のうっ滞により陰嚢内温度の上昇が主たる原因と考えられている。しかし、不妊を起こすメカニズムに関しては明確ではなく、温度上昇以外に、酸化ストレスの上昇、精子DNAダメージなどが関連すると指摘されている。最近、精索静脈瘤における精子ミトコンドリアの構造や機能異常が、酸化ストレスの上昇や精子運動能の減弱に関与することが示唆されている。そのため、精索静脈瘤によって、精子ミトコンドリアのゲノムに突然変異が引き起こされ、精子数の減少や運動能の低下が起こることが考えられる。今回、精索静脈瘤の程度と造精機能に関して、精子ミトコンドリアに着目し、客観的に評価しうるマーカーの探索および、精子における変異したミトコンドリアゲノムを標的とした治療開発を行なう。

3. 研究の方法

1. ヒト精子の採取および取り扱い

東邦大学医学部倫理委員会の承認を得て、ヒト精子を実験に用いる。東邦大学医療センター大森病院リプロダクションセンターを受診する患者を対象とする。書面を用いて、精索静脈瘤を認め、手術適応のある患者を対象とする。研究に用いる旨の説明を行ない、同意を得た患者の精子を研究に用いる。また、コントロール群として、正常所見の精液を用いる。この場合は、男性不妊症の検査に訪れた際に、正常所見だった患者を対象とする。

2. 精液検査

精液検査は、WHOマニュアル第6版に沿って行なう。精子濃度 16×10^6 /ml 以上、精子運動率 42% 以上を正常所見とする。精子濃度および運動率の片方または両者が正常所見に達していない場合を異常と捉える。

3. 精子酸化ストレスの測定

MiOXSYS (ナカメディカル) を用いて、精子酸化ストレスを測定する。酸化還元電位 (static Oxidation-Reduction Potential; sORP) の原理に基づき精液内の電子の移動を測定することで酸化レベルを数値化することができる。測定結果を精子濃度/ 10^6 で割った数字が標準化 sORP 値となる。

4. 精子からのミトコンドリアの単離

Mitochondria Isolation kit for Tissue and Cultured Cells (バイオビジョン) を用いて、ミトコンドリアの単離を行なう。単離したミトコンドリアは膜電位が保たれているため、JC-1 の凝集により、蛍光を検出できることによりミトコンドリアの単離が確認できる。JC-1 は生細胞ではミトコンドリアに取り込まれて赤色蛍光を発するが、アポトーシスを起こした細胞ではミトコンドリアに取り込まれず細胞質内で緑色蛍光を発する。
ミトコンドリア機能解析

ミトコンドリアに機能不全が起こった場合では、正常と比べて酸素消費速度(OCR)が遅いことが言われている。Mitocheck Mitochondrial OCR Assay kit (ケイマンケミカル)を用いて、単離したミトコンドリア内のOCRを直接測定することができる。測定には、温度調整付き(37℃)の蛍光プレートリーダーを使用する。予想では、精索静脈瘤における精子では、正常群と比べて、精子ミトコンドリアのOCRは遅いことが予想される。

5. 精子におけるミトコンドリアDNA(mtDNA)の精製および次世代シーケンサーを用いたmtDNAの変異解析

Mitochondrial DNA Isolation kit (バイオビジョン)を用いて、精子のmtDNAの精製を行なう。正常群と精索静脈瘤群でのmtDNAによるゲノムシーケンスを行なうことで、mtDNA変異が明確になる。mtDNAは変異が入りやすいことで知られている。特に、精索静脈瘤における精子ミトコンドリアのmtDNAの特定の部位に変異が入っていることが明確にできれば、その部位をターゲットとしたマーカーの探索や新規治療に結びつけることができる。ミトコンドリアは、ATP産生に関与する電子伝達系酵素複合体I-Vの複合体が存在する。これまでの報告では、精索静脈瘤の存在は、その構成タンパク質であるNDFSU1、UQCRC2、COX5Bに、影響を受けることが示唆されている(Samanta et al. the J of Urology, 2018)。しかし、この解析では、LS-MS/MSを用いたタンパク質の解析であり、遺伝子レベルではない。我々は、次世代シーケンサーを用いた精索静脈瘤における精子でのmtDNAを解析することにより、遺伝子レベルでの違いを見出し、精索静脈瘤の原因究明に迫ることができると確信している。

4. 研究成果

研究1年目である2019年度は、精索静脈瘤患者の手術前後の精液検体の採取に重点を置いてきた。2020年度は、コロナ渦の影響で2020年4月以降の精索静脈瘤手術は中止となり、その後も手術件数は増えず思うように検体は集まらなかった。そのため、無精子症の精巣組織の病理画像をAIによって分類する研究を開始し、2021年5月に精巣内の精子への成熟度を判定するJohnsen scoreをAIで自動分類するシステムを構築、英国科学誌「Scientific Reports」に発表することができた。1)

1. Johnsen scoreをAIで自動分類するシステムの開発の経緯

男性不妊症の中で最も重篤な病態は無精子症である。無精子症の場合は、精液に1匹も精子がないため挙児を得ることができない。挙児を希望する場合は、精子を採取するために精巣内精子採取術(TESE)が必要である。その際、精子の有無以外に、精巣内の状況を調べるために一部の精巣組織を病理検査にまわす。精巣内での精子への成熟度を示すJohnsen scoreと呼ばれるものがあり、病理専門医によってスコアリングが行われる。スコアは1~10点に分かれ、点数が上がるほど精子への分化が進んでいることを示す。点数は1点(細胞成分が認められない)、2点(精粗細胞が認められずセルトリ細胞のみ)、3点(精粗細胞のみ)、4点(精母細胞5~10個)、5点(精母細胞多数)、6点(精子細胞5~10個)、7点(精子細胞多数)、8点(精子5~10個)、9点(精子多数も精細胞配列が不規則)、10点(精子多数)となっている。

Johnsen scoreのスコアリングをAIによって自動化を検討し、10段階の細かいスコアリングは煩雑になるため、必要最低限の4段階にJohnsen scoreを分けた。この4段階は、ラベル1(1~3点:精粗細胞まで分化)、ラベル2(4~5点:精母細胞まで分化)、ラベル3(6~7点:精子細胞まで分化)、ラベル4(8~10点:精子まで分化)とした。2010年から2019年の10年間の無精子症患者に対してTESEを行った275例中264症例の病理標本を対象に合計7,115枚の病理写真を撮影し、4つのラベル(JSC 1-3, JSC 4-5, JSC 6-7, JSC 8-10)に分けた。(図1)

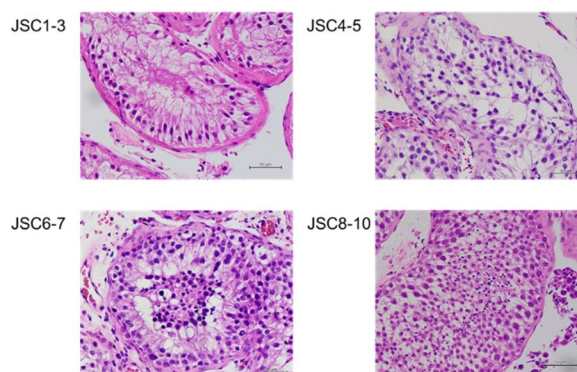


図1: 精巣病理画像(400倍)

AutoML Vision で作成した精巣病理 AI 診断モデルは AUC 82.6%であった。さらに AUC を上げるために、1 枚の病理画像のなかで、Johnsen score を判断する部位のみを 5.0 cm X 5.0 cm で切り抜いた加工画像 9,822 枚を用意し、4 つのラベル(JSC 1-3, JSC 4-5, JSC 6-7, JSC 8-10)に分けた。(図 2)この AI モデルでは AUC 99.5%であった。

この研究内容は、世界に先駆けて Johnsen score の AI 自動判別モデルを医師主導のみで作成することができた。現在、他論文にも多く引用されており注目度が高い研究である。今後も男性不妊症に対する AI 研究を進めていく次第である。

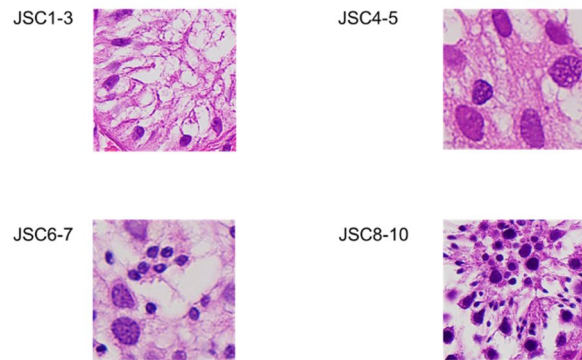


図2: 精巣病理画像 (拡大)

<引用文献>

1. Ito Y, Unagami M, Yamabe F, Mitsui Y, Nakajima K, Nagao K, Kobayashi H. A method for utilizing automated machine learning for histopathological classification of testis based on Johnsen scores. Scientific Reports 2021 May 10;11(1): 9962.doi:10.1038/s41598-021-89369-z.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Yurika, Unagami Mami, Yamabe Fumito, Mitsui Yozo, Nakajima Koichi, Nagao Koichi, Kobayashi Hideyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 A method for utilizing automated machine learning for histopathological classification of testis based on Johnsen scores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89369-z	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 小林 秀行	4. 巻 39
2. 論文標題 Google Cloud のAutoML Visionを用いたノーコードの画像認識AIモデルの構築	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学2021年11月号	6. 最初と最後の頁 2933-2942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林秀行
2. 発表標題 正診率99.5%の無精子症における精巣病理診断AIモデルの開発
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林秀行
2. 発表標題 画像認識AIによるJohnsen scoreの自動判別モデルの構築
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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