

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09743

研究課題名(和文) マウスを用いた男性生殖器における嗅覚化学感覚細胞の組織内分布と解剖学的特徴の解明

研究課題名(英文) The distribution and anatomical characteristics of olfactory chemosensory cells in the male reproductive organs using mice.

研究代表者

上村 慶一郎 (Uemura, Kei-ichiro)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：70446079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オスの12週齢マウスの精路を用いて、嗅覚受容体の下流にあるGNAL(Guanin nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha)やAC3(Adenylate cyclase 3)のRNA定量を行った。GNALは、精巣・精巣上体尾部・精管にRNAの発現を認めたとはいえず、いずれも微量であった。AC3は、精路のどの部位にも非常に微量でしかRNAの発現を認めなかった。また、電子顕微鏡を用いたマウス前立腺神経内分泌細胞の超微細構造解析も行った。その細胞は、腺管内腔と交通する部位に微絨毛を有しており、化学感覚細胞の機能も有している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、マウスの精路に嗅覚受容体の下流に存在するGNALが微量であるが存在していることが示された。嗅覚受容体の下流に位置するタンパクが存在するということは、いずれかの嗅覚受容体が存在するということが示唆される。精路内には、未だ解明されていない化学感覚のセンサーやその受け皿が存在しており何らかな生物学的な意義を有していると思われる。マウスの前立腺神経内分泌細胞が、腺管内腔側に微絨毛を有していることは、その細胞が何らかの化学受容を行っている可能性が示唆された。今までにない知見であり、神経内分泌細胞が新たな機能を有する可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：RNA quantification of GNAL (Guanin nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha) and AC3 (Adenylate cyclase 3), which are downstream of olfactory receptors, was performed in the spermatid tract of male 12-week-old mice. GNAL showed RNA expression in the testis, cauda epididymis, and vas deferens, all in very small amounts. AC3 showed only very small amounts of RNA expression at any site in the spermatid tract. We also performed ultrastructural analysis of mouse prostatic neuroendocrine cells using electron microscopy. The cells had microvilli at the site of communication with the lumen of the glandular duct, which suggested that they may also have a chemosensory cell function.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：雄性マウス精路 GNAL AC3 神経内分泌細胞 微絨毛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究室が有する、RT-PCR 装置、共焦点レーザー顕微鏡や FIB/SEM tomography を用いて、組織の RNA 量の解析、免疫組織学的研究や超微細構造解析を開始した。

雄性マウス精路に存在する嗅覚化学感覚細胞を同定する目的で、嗅覚受容体の下流に位置する GNAL (Guanin nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha) や AC3 (Adenylate cyclase 3) に注目して研究を開始した。当初は、嗅覚受容体も研究対象として考えていたが、対象とする受容体の数が非常に多くて複雑であるために絞り込むことが困難であったために、まずは下流にあるタンパクや分子の解析を行った。嗅覚以外にも味覚に関わるタンパクや分子の解析も同時に実施した。対象としては、苦味・甘味・旨味の受容体の下流に存在する TRPM5 と gustducin を選択して研究を行った。

また、以前より研究の対象としていたマウス前立腺神経内分泌細胞も化学感覚細胞としての機能を有するのではないかと考えていたため、その細胞の 3D 超微細構造解析も並行して行った。令和 2 年度より、所属が久留米大学泌尿器科より獨協医科大学埼玉医療センターへ変更になったので、研究は獨協医科大学埼玉医療センター泌尿器科と同病院の共同研究センターで継続した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、雄性マウスの精路内に存在する嗅覚関連化学感覚細胞を同定し、その分布や解剖学的特徴を解明することである。化学感覚細胞は、何らかの(嗅覚の場合は臭いの、味覚の場合は味の)物質の有する分子やタンパク等を感知することにより、その細胞が何らかのシグナルを出し動物の行動を制御する役割を果たすとされる。その細胞は、生体防御や種の存続に重要な役割をするとされ、鼻や舌といった主要な化学感覚臓器以外の臓器にも存在が確認されてきている。

現時点で泌尿器科領域においては、尿道に TRPM5 陽性細胞が確認されており、尿路感染を感知するセンサーの役割を果たしているのではないかとされている。しかしながら、精路にはそのような化学感覚細胞は確認されておらず、それを解明することは精路の様々な生理機能や疾患の病態生理を明らかにするきっかけとなる可能性がある。

### 3. 研究の方法

12 週齢マウス(雄)を深麻酔下に頸椎脱臼を施して精路を摘出し、精巢、精巢輸出管、精巢上体の initial segment (IS)、精巢上体頭部、精巢上体体部、精巢上体尾部、精管に分けて、RT-PCR に用いる目的で凍結した。摘出した雄性マウスの各部位を、GNAL、AC3、TRPM5、Gustducin の RNA の発現を確認する目的で RT-PCR を実施した。

免疫染色用に、12 週齢の雄性マウスを 4%パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を実施した。還流固定後に精路(精管、精巢上体、精巢)を一塊にして摘出した。摘出した精路は一塊のまま OCT コンパウンド内に凍結し包埋した。凍結・包埋した組織を 3~5 μm の薄さで完全連続切片を作製後に免疫染色を実施した。

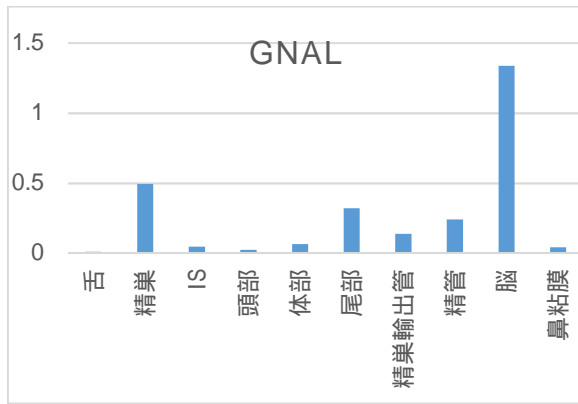
電子顕微鏡を用いた超微細構造解析を実施する目的で、12 週齢マウスに対してハーフカルノフスキーを用いて還流固定し、下部尿路を一塊にして摘出した。摘出した下部尿路を実体顕微鏡下でトリミングを行った。前立腺部尿道を約 1mm スライスにして特殊染色を施して、その組織をエポンに包埋し電子顕微鏡で観察する準備を行った。まず、FIB/SEM tomography を用いて、その組織内の詳細な表面観察を行い、ターゲットとなる細胞の位置関係を把握した。次に、ターゲットとなる細胞(前立腺神経内分泌細胞)を 3D で詳細に観察するために撮影範囲を決めて、FIB/SEM tomography で連続切片を撮像した。

### 4. 研究成果

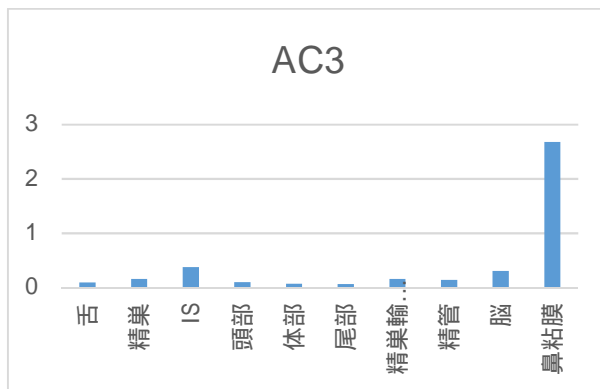
#### (1) RT-PCR 解析

12 週齢マウスの精巢、精巢輸出管、精巢上体の各部位(IS、頭部、体部、尾部) 精管の組織を GNAL、AC3、TRPM5、Gustducin を用いて RT-PCR による解析を行った。

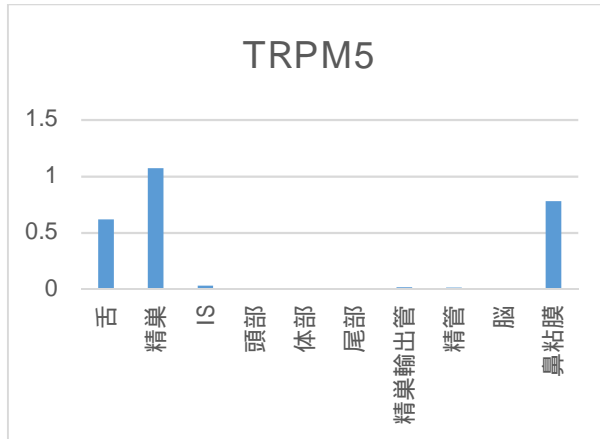
GNAL は精巢、精巢上体尾部、精管に微量であるが存在していた。その他の部位(精巢上体 IS、精巢上体頭部、精巢上体体部)にも検出されたが、ごく微量であった。



AC3 は、精巢上部 IS に微量の検出を確認したが、他の精路（精巢、精巢上部頭部、精巢上部体部、精管）では非常に微量のみしか検出されなかった。



TRPM5 は精巢で検出されたが、精巢以外の精路には非常に微量でのみしか検出されなかった。



Gustducin は、精巢を含む精路全般においてほとんど検出されなかった。

## (2) 免疫染色の所見

GNAL は精巢上部内腔側に存在する微絨毛の先端に発現していた。染色にばらつきがあるものの、精巢上部の全域にわたって染色が確認されている。(現在、更なる追加の観察を実施している段階であり、結果については後日報告予定である)。

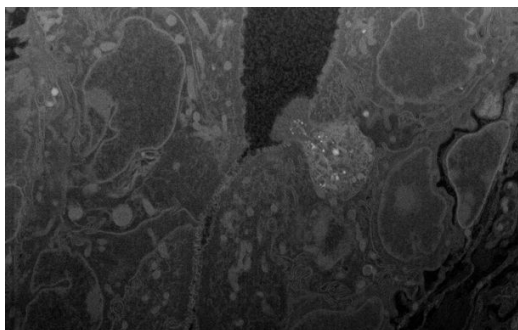
AC3 も、精巢上部や精管の上皮直下の間質細胞に発現している所見を認めたが非常に微細な染色であり、慎重に解析を進めているところである。

TRPM5 は、精巢を中心に免疫染色を実施しているところである。

## (3) 電子顕微鏡 (FIB/SEM tomography) を用いた研究

FIB/SEM tomography を用いた、マウス前立腺神経内分泌細胞の 3D 超微細構造解析を実施した。マウス前立腺神経内分泌細胞は、尿道近傍の前立腺の導管の基底側に偏在していた。マウス前立腺神経内分泌細胞は、上皮の基底側に長い突起を伸ばすように存在しており、必ず導管内腔と交

通しており、その部位には微絨毛を有していた。この微絨毛の存在は、神経内分泌細胞が導管内腔から何らかのシグナルを受け止める役割を果たしている可能性を示唆した。(この所見は、神経内分泌細胞が化学感覚細胞の様な役割をしている可能性についても示唆している)



(マウス前立腺神経内分泌細胞を FIB/SEM で表面観察した写真。神経内分泌細胞は、前立腺導管の内腔に突出しており、内腔と接する面には微絨毛を有している)

マウス前立腺神経内分泌細胞内には、細胞の形態に沿うようなイメージで神経が走行していることが確認された。また、前立腺上皮直下の間質細胞は、上皮の基底側と接するように存在しており、上皮の基底細胞や神経内分泌細胞と何らかのやり取りをしている可能性を有していると思われた。

以上の所見は、マウス前立腺神経内分泌細胞が自身周囲の細胞や内腔から何らかのシグナルを受け取り、神経や間質細胞に何らかのシグナルを送る役割を果たす重要な細胞であることを裏付ける所見である可能性があると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Uemura Kei-ichiro, Hiroshige Tasuku, Ueda Kosuke, Ohta Keisuke, Hayashi Tokumasa, Hirashima Shingo, Kanazawa Tomonoshin, Nakiri Makoto, Igawa Tsukasa, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Distribution, shape, and immunohistochemical characteristics of serotonin-immunoreactive neuroendocrine cells in the urethra and periurethral genital organs in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Histology	6. 最初と最後の頁 1205 ~ 1214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10735-021-10020-2	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 -

〔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 上村慶一郎
2. 発表標題 マウス精巣上体における基底細胞と免疫系細胞の組織学的特徴について
3. 学会等名 第64回 日本生殖医学会
4. 発表年 2019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	中島 則行  (Nakashima Noriyuki)  (80625468)	久留米大学・医学部・准教授    (37104)	

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