

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18355

研究課題名（和文）精巣捻転症に対する希少糖による新規治療法の開発 - 虚血再灌流障害の抑制 -

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for testicular torsion using rare sugar
-Suppression of ischemia-reperfusion injury-

研究代表者

形見 祐人 (Katami, Hiroto)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50791224

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）：「捻転時間が短く、手術時に精巣を温存し得た患者」を再現することを目的として1時間の精巣捻転および24時間の再灌流障害を負荷したモデルラットを作成し、短時間の精巣捻転と術後の再灌流障害が精巣、とくに精子形成に及ぼす影響について検証した。1時間の精巣捻転と24時間の再灌流障害により有意な病理学的障害が生じたが、精子形成指標であるJohnsen scoreは虚血再灌流群においても8点以上であり、組織学的な精子形成障害はみられなかった。しかし、RNA-seqおよびRT-PCRによる遺伝子発現解析の結果、精子形成の複数のフェーズで関連遺伝子の発現低下が見出され、遺伝子レベルでの造精能低下が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精巣捻転症では、精巣虚血が軽度であれば捻転を解除したうえで精巣を温存可能とされている。しかし、捻転解除後の再灌流障害が精巣に与える影響も懸念されている。本研究では、短時間の虚血とそれに続く再灌流障害は組織学的な精子形成低下をもたらさなかったが、精子形成関連遺伝子の発現低下が引き起こされた。このことから、精巣捻転患者では、手術時に精巣を温存可能であったとしても、術後に再灌流障害による遺伝子レベルの造精能低下が生じる可能性が示唆された。また、本研究は精巣捻転症における次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を世界で初めて発表したもので、シーケンスデータは国立遺伝学研究所のデータベースに公開された。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of short testicular torsion and postoperative reperfusion injury on the testes, especially on spermatogenesis using a rat model. We created a rat model subjected to 1 hour of testicular torsion and 24 hours of reperfusion injury to replicate patients with short-term testicular torsion. Although 1 hour of testicular torsion and 24 hours of reperfusion injury caused significant histopathological damage, the Johnsen score, an index of spermatogenesis, was greater than 8 points in the ischemia-reperfusion group, indicating that spermatogenesis was maintained. However, gene expression analysis using RNA-seq and RT-PCR demonstrated downregulation of genes associated with various phases of spermatogenesis, suggesting impaired spermatogenesis at the genetic level.

研究分野：小児外科学

キーワード：精巣捻転症 虚血再灌流障害 精子形成 次世代シーケンサー RNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精巣捻転症は、精索の捻転により精巣の虚血、壊死を生じるもので、男性およそ 4000 人に 1 人の頻度で発生し、思春期の男子に好発する。精巣を救済するために可及的速やかに捻転解除術を行う必要のある、救急疾患のひとつである。虚血が高度で精巣が壊死に至っている場合には精巣摘出術が選択されるが、虚血が軽度であれば手術時に精巣を温存可能とされる。しかし、捻転を解除して温存した精巣における術後の再灌流障害も問題視されており、術後治療 = ポストコンディショニングに注目が集まっている。一方で、希少糖は自然界に微量しか存在しない単糖の総称であるが、香川大学においてその生産体制が確立され、多様な生理活性を有することが近年の研究で明らかになっている。希少糖のひとつ、D-アロースには活性酸素の産生抑制ならびに消去作用があり、高血圧や脳梗塞の動物モデルにおいて活性酸素や虚血再灌流障害を軽減することが示されてきた。

2. 研究の目的

本研究では精巣を温存し得た精巣捻転症術後患者を想定したモデルラットを作成し、虚血再灌流障害に対する D-アロースの治療効果を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトにおける思春期以降を想定して 7 週齢の Sprague-Dawley ラットを使用し、精巣捻転モデルラットを作成する。マウスは虚血および再灌流を負荷する群、虚血のみ負荷する群、Sham 手術群の 3 群に大別し、さらに各群を D-アロース投与群と非投与群に分類する。負荷強度は、虚血 1 時間、再灌流 24 時間間とし、D-アロースは 400mg/kg までを腹腔内投与する。所定の実験が終了したのちラットを安楽死させ、精巣を摘出し、病理組織学的検査、酸化ストレスマーカー測定等により虚血再灌流障害およびそれに対する D-アロースの治療効果について検証する。病理組織学的検査で、HE 染色による精細管の障害所見の評価、TUNEL 染色によるアポトーシスの評価を行う。酸化ストレスマーカーとして、Malondialdehyde (MDA)、superoxide dismutase (SOD)、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 等の測定を行う。

4. 研究成果

所属機関の動物実験施設の改築や新型コロナウイルス流行の影響により、実験の進行に遅延が生じ、希少糖投与モデルラットの確立には至ることができなかったが、その前段階で今までにない新たな知見を得ることができた。具体的には、次世代シーケンサーによる精巣組織の RNA シーケンシングを行い、1 時間の虚血と 24 時間の再灌流障害を負荷した 7 週齢ラットの精巣では sham 手術群と比べてアポトーシス関連遺伝子および抗酸化酵素関連遺伝子の発現増加がみられ、一方で精子形成関連遺伝子の発現低下がみられた。アポトーシス関連遺伝子、抗酸化酵素関連遺伝子、精子形成関連遺伝子については 19 個の遺伝子に対して RT-PCR を追加で行った。その結果、アポトーシス関連遺伝子では *Bax*、*Bcl2*、*Casp3*、*Casp8* の発現増加がみられ、外因性と内因性の両方の経路に影響がみられた。抗酸化酵素関連遺伝子では、*Gpx1*、*Ho1* の発現が増加しており、精巣における酸化ストレスマーカー (MDA および SOD 活性) については虚血再灌流群と sham 群の間に有意差はみられなかったものの、遺伝子レベルでは酸化ストレスに対する応答がみられた。精子形成関連遺伝子については、減数分裂 (*Hspa2*、*Tex14*)、鞭毛形成 (*Bbs4*)、先体形成 (*Gopc*)、卵子透明帯との結合 (*Ace*) に関与する遺伝子の発現低下が見出され、精巣虚血再灌流障害が精子形成の複数のフェーズに影響を及ぼすことが示唆された。今回作成した精巣捻転モデルにおける虚血負荷は比較的軽度で、1 時間の虚血のみでは sham 群との間に有意な精巣の病理学的ダメージ所見を来さなかったが、虚血負荷に再灌流障害が加わることにより、病理組織学的ダメージが増強した。具体的には、虚血再灌流群では sham 群と比べて、sloughing of germ cell、vacuolation in tubule、necrosis of germ cell、apoptotic index の有意な悪化がみられた。とくに sloughing と vacuolation は Sertoli 細胞のダメージを示唆する所見と考えられており、精巣虚血再灌流障害における精巣組織障害の原因として、Sertoli 細胞が重要な役割を果たす血液 - 精巣関門 (BTB) の障害が関与する可能性が示唆された。BTB の破綻は、精子が免疫系からの攻撃や活性酸素からの酸化ストレスに暴露されることを意味する。病理学的な精子形成の指標である Johnsen score に関しては、虚血再灌流群では sham 群と比べて有意なスコアの悪化がみられたが、その数値自体は平均 8.81 点であり、精子形成は保たれていると考えられた。酸化ストレスマーカー (MDA、SOD 活性) の測定値に関しては、虚血再灌流群と sham 群の間に有意差はみられなかった。以上のことから、1 時間の精巣捻転症では虚血による障害は軽度だが、再灌流障害により精巣へのダメージが増加することが確認できたとともに、捻転解除から 24 時間後の時点では病理学的な精子形成障害は起こっていなかったとしても、遺伝子レベルでは造精能の低下が生じている可能性が示された。これらの研究成果は学会および英文誌にて発表し、精巣捻転症罹患後の精巣における次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析について世界で初めて報告した研究となった。また、本研究で得られたシーケンスデー

夕は国立遺伝学研究所のデータベース（DDBJ）に登録・公開された。

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 形見祐人、下野隆一、田中彩、藤井喬之、久保裕之	4. 巻 18
2. 論文標題 腹痛を主訴とする精巣捻転症の診断	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本小児救急医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 358-361
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 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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 形見祐人、藤井喬之、田中彩、上野正樹、鈴木辰吾、三木崇範、下野隆一
2. 発表標題 精巣捻転症ラットモデルによる精巣虚血再灌流障害に関する研究：病理組織学的分析と遺伝子プロファイリング
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 形見祐人、藤井喬之、田中彩、久保裕之、下野隆一
2. 発表標題 当科で経験した精巣捻転症8例の検討
3. 学会等名 第60回日本小児外科学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 形見祐人、藤井喬之、田中彩、上野正樹、鈴木辰吾、三木崇範、下野隆一
2. 発表標題 精巣捻転症ラットモデルによる精巣虚血再灌流障害に関する研究：病理組織学的分析と遺伝子プロファイリング
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------