

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06414

研究課題名（和文）セルトリ細胞の成熟メカニズム解明とそれを基にしたウシ精子形成の評価の樹立

研究課題名（英文）Elucidation of maturation in Sertoli cell and establishment of evaluation for bovine spermatogenesis

研究代表者

北原 豪 (Kitahara, Go)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90523415

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）：春機発動前の雄ウシからは精液を採取できず、精液以外の材料で精子形成を評価する必要がある。そこで、本研究では、精巣組織での受容体や遺伝子発現、末梢血中性ホルモンの動態から、セルトリ細胞の成熟および精子形成を評価ができないかを検討し、その結果を精巣発育不良モデルで検証した。その結果、精巣組織中のセルトリ細胞におけるアンドロジェン受容体およびLH受容体遺伝子の発現、末梢血中のTレベルの動態が、雄ウシの春機発動前の精子形成の評価における指標として有用である可能性が明らかとなった。また、精巣発育不良モデルにおける異常に対し、末梢血中のTレベルによって評価できることが検証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、春機発動前の雄ウシにおけるセルトリ細胞の成熟メカニズムを明らかにすることで、関与する遺伝子群及び性ホルモンを指標とした精子形成の評価の樹立に寄与できる。精液を採取できない時期（春機発動前）や精巣組織を採取しなくても、精子形成を客観的に評価できるようになり、また、雄ウシの造成にあたり将来性を考慮した新たな選抜基準も提案でき、雄ウシの繁殖障害の診断や治療の発展に繋がる。そのことで、国内外での雄ウシの造成や供用を効率化し、畜産振興に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：Semen cannot be collected from bulls before puberty, and it is necessary to evaluate spermatogenesis with materials other than semen. Therefore, in this study, we examined whether Sertoli cell maturation and spermatogenesis could be evaluated from the dynamics of receptors or genes expression in testicular tissue, and peripheral blood sex hormones, and the results were validated in a model bull with poor testicular development. The results revealed that the dynamics of androgen receptor expression in Sertoli cells, LH receptor gene expression in testicular tissue, and T levels in peripheral blood may be useful as the indicators in bull before puberty. It was also verified that T levels in peripheral blood can be evaluated for abnormalities in the models.

研究分野：獣医繁殖学分野

キーワード：雄ウシ 精巣 セルトリ細胞 アンドロジェン受容体 LH受容体遺伝子 テストステロン 抗ミューラ
ー管ホルモン

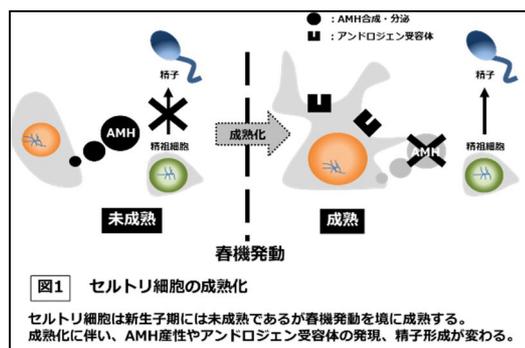
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

雄ウシを造成には、多くの候補雄ウシから、発育を評価する直接検定、産子を評価する後代検定を経て、約7年後ようやく生産現場に精液が供給される。しかし、この過程を経ても必ず供用できるとは限らず、多大な労力と経費が掛かる。よって、雄ウシの効率的な造成を行うには、正常で、精子形成が早期に開始される雄ウシから精液を採取し、後代検定を行いたい。そのため、春機発動前の雄ウシにおける精子形成の状況を知りたいが、精液は未だ採取できないため、精液以外の材料で精子形成を評価する必要がある。

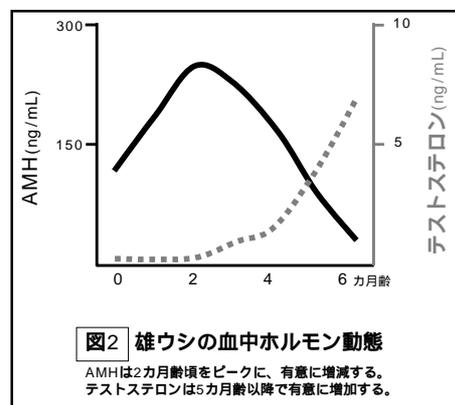
セルトリ細胞は成熟化を経て精子形成をサポート

雄の春機発動及び性成熟は、視床下部 - 下垂体 - 性腺(精巣)軸で制御されている。精子形成にはセルトリ細胞が必要で、生殖細胞と直接的に接触し、精祖細胞から精子への形成を誘導する。セルトリ細胞は、細胞の形態及び機能から、未成熟型と成熟型の2つのタイプが存在する(図1)。未成熟型では、抗ミュラー管ホルモン(AMH)を盛んに合成・分泌するが、精子形成を進行させることができない。一方、成熟型では、AMHの合成・分泌は失われ、アンドロゲン受容体(AR)が発現し、精子形成を進行させる。しかし、セルトリ細胞の未成熟型から成熟型への過程やメカニズムは、解明されていない。



精子形成における AMH とアンドロジェンの関与

未成熟型セルトリ細胞からのみ合成された AMH は、精細管腔や血液中に分泌されるが、その生理作用は明らかになっていない。研究者らはこれまでに、雄ウシの AMH が血液中で2カ月齢をピークとした分泌動態を示すこと(図2)を国内外ではじめて明らかにした¹⁾。この動態の中で、2カ月齢にかけての増加はセルトリ細胞の増殖を、以降の低下はその成熟化によるものと推察している。一方、ライディッチ細胞で主に合成・分泌されるアンドロゲン(テストステロン:Tなど)は、精細管腔内で春機発動に向け増加し、セルトリ細胞が分泌するアンドロゲン結合蛋白質を介して、精子形成に作用すると考えられている。AMHは、ライディッチ細胞に対し増殖やT産生を抑制することが報告されている。しかし、AMHとTの相互作用、および精子形成への関与について、十分に実証されていない。



雄ウシの精子形成異常に対する遺伝子群や性ホルモンによる評価の可能性

雄ウシの繁殖性評価は breeding soundness examination (BSE) と呼ばれ、陰嚢周囲長などの精巣の外観的な評価や精液の品質(精子の生存性や運動性など)が中心となる。よって、採精が困難な春機発動前の雄ウシの精子形成異常は、BSEでは十分に明らかにできない。また、精液検査によって精子形成の異常が疑われても、貴重な雄ウシへの侵襲を伴う組織学的検査は、非常に困難である。一方で、AMHやTといった性ホルモンは、血液や精細管腔内に分泌されるため、侵襲を伴わずに採取できる。しかし、性ホルモンと精子形成異常の関係性は明らかにされていない。

2. 研究の目的

そこで、春機発動前の雄ウシにおける精子形成の評価の樹立を目的に、以下の3つの実験を行う。

実験1: セルトリ細胞の成熟化の評価

セルトリ細胞が未成熟型から成熟型に変わる過程やメカニズムは、ウシをはじめ、他の動物においても未だ解明されていない。この過程やメカニズムを解明するには、未成熟型から成熟型セルトリ細胞を区別し、同一個体より継続的な精巣組織を採取し、動態を観察することが必要である。研究者らは、ウシへのニードルバイオプシーによる4週間隔での精巣組織採取が、その後の精巣発育に影響せず、組織障害も認められなかったことを明らかにしている²⁾。また、セルトリ細胞の未成熟型および成熟型の分類は、電子顕微鏡を用いた報告はあるが、設備と技術を要するため、一般的には難しい。そこで、より簡便な方法として、免疫組

織化学染色による AR の発現の有無を観ることで、セルトリ細胞の成熟化を調べられないか、を検討することとした。さらに形態的な変化だけでなく、成熟メカニズムに関わる遺伝子群の発現を明らかにすることを目的とした。

実験 2：性ホルモンと精子形成の関係性

アンドロジェンは、副腎などの精巣以外でも合成・分泌される。また、春機発動前では自らアンドロジェンを合成・分泌できる成獣型ライディッチ細胞が少ない。一方、AMH は、未成熟型セルトリ細胞でのみ合成・分泌され、胎生期から検出できる物質である。しかし、AMH 自体が精子形成にどのような影響を与えるかの報告はない。よって AMH と精子形成における関係を明らかにすることを目的に、精子形成像と、血中 AMH および T 濃度との関係性を調べた。

実験 3：遺伝子群および性ホルモンと精子形成異常の関係性

実験 1 および 2 の結果に基づき、候補となった物質や動態が、精子形成に異常を来した雄ウシを評価できるか確認するために、出生後 1 カ月と 3 カ月に抗 GnRH 抗体誘導剤を接種して精巣発育不良モデルを作成し、検証することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1

黒毛和種雄子牛 17 頭を供試し、2 カ月齢時から 1 カ月毎に精巣のニードルバイオプシーを行い、9 カ月齢時に両精巣を摘出した。採取した精巣組織を用い、精細管直径、精子形成像、ピメンチンとアンドロジェン受容体 (AR) の陽性細胞数 (それぞれ全セルトリ細胞数、AR 陽性セルトリ細胞数) を観察および計測した。また、11 頭については、採取した精巣組織におけるアンドロジェン、AMH、LH および FSH の受容体遺伝子と、ステロイド産生関連遺伝子である CYP19A1、SF-1、DAX-1 の mRNA の発現量を測定した。伸長精子細胞が 7 カ月齢時に観察された群 (早期群) と、8~9 カ月齢時に観察された群 (標準群)、伸長精子細胞が 9 カ月齢時においても観察されなかった群 (遅延群) に分類し、各測定項目を比較した。

実験 2

黒毛和種雄子牛 17 頭を供試し、2 カ月齢時から 1 カ月毎に精巣のニードルバイオプシーを行い、9 カ月齢時に両精巣を摘出した。採取した精巣組織を用い、精子形成像を観察した。また、精巣組織採取時に採血を行い、血中 AMH およびテストステロン (T) 濃度を測定した。早期群、標準群および遅延群に分類し、各測定項目を比較した。

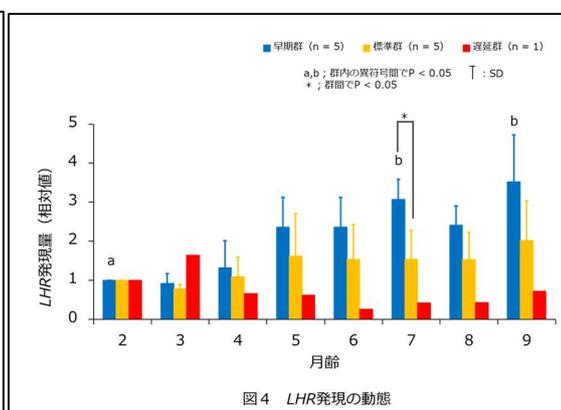
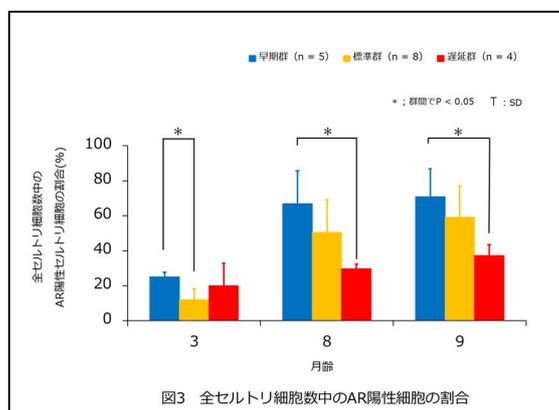
実験 3

黒毛和種雄子ウシ 27 頭を供試し、精巣発育不良モデル群 (n = 14) と正常群 (n = 13) に分けた。精巣発育不良モデル群には、抗 GnRH 抗体誘導剤を 1 カ月齢時と 3 カ月齢時に頸部皮下に投与した。両群において 0 カ月齢 (生後 7 日以内) から 9 カ月齢までの期間に、体重、陰囊周囲長、血漿中 AMH とテストステロン (T) 濃度および 9 カ月齢時の精巣の容積を計測した。

4. 研究成果

実験 1

全セルトリ細胞数中の AR 陽性細胞の割合は、3 カ月齢時で早期群が標準群より、8 および 9 カ月齢時で早期群が遅延群より、それぞれ有意に高かった (図 3)。LH 受容体 (LHR) 遺伝子の発現量は 7 カ月齢時で早期群が標準群より有意に高かった (図 4)。LHR 遺伝子以外の mRNA の発現量は群間で有意な差はみられなかった。



実験 2

血中 AMH 濃度は、0 カ月齢時は他の月齢と有意な差はみられなかったが、1 カ月齢時に比べて、早期群では 7 カ月齢時以降、標準群では 6 カ月齢時以降、遅延群では 7 カ月齢時および 9 カ月齢時に低下した（いずれも $P < 0.05$ ）。血中 T 濃度は、0 カ月齢時と比較して早期群では 7 カ月齢時以降、標準群では 6 カ月齢時以降に高くなった（図 5、いずれも $P < 0.05$ ）。しかし、遅延群では有意な変化はみられなかった。8 カ月齢時において、早期群が標準群および遅延群よりも高かった（ $P < 0.05$ ）。

実験 3

9 カ月齢時の体重は両群間で有意な差がみられず、2 カ月齢以降の陰嚢周囲長は、精巣発育不良モデル群が正常群より小さかった（ $P < 0.05$ ）。精巣発育不良モデル群は正常群に比べ、血漿中 AMH 濃度が 2~5 カ月齢時に低く、7~9 カ月齢時に高く（ $P < 0.01$ ）、血漿中 T 濃度が 4~9 カ月齢時に低く（図 6、 $P < 0.01$ ）、精巣容積が小さかった（ $P < 0.001$ ）。

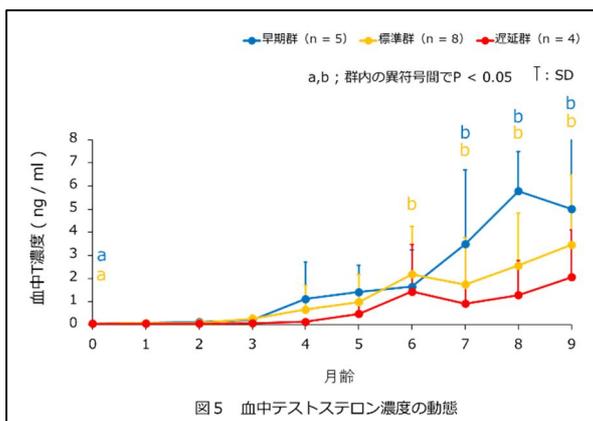


図5 血中テストステロン濃度の動態

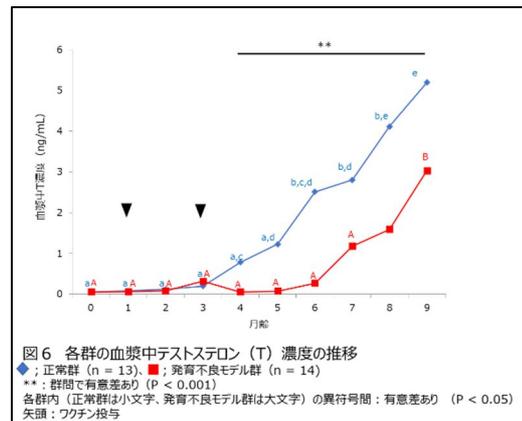


図6 各群の血漿中テストステロン (T) 濃度の推移

◆: 正常群 (n = 13)、■: 発育不良モデル群 (n = 14)
*: 群間で有意差あり ($P < 0.001$)
各群内 (正常群は小文字、発育不良モデル群は大文字) の異符号間: 有意差あり ($P < 0.05$)
矢頭: フラグチン投与

以上より、セルトリ細胞における AR の発現はセルトリ細胞の成熟化を反映し、LHR 遺伝子の発現とともに精子形成の進行に関係すること、また、T はセルトリ細胞の成熟と協調して精子形成を進行させることが示唆された。よって、精巣組織中のセルトリ細胞における AR 発現および LHR 遺伝子発現、末梢血中の T レベルの動態が、雄ウシの春機発動前における精子形成の指標として有用である可能性が示された。また、抗 GnRH 抗体誘導剤を用い精巣発育不良モデルを作出し、異常所見を末梢血中の T レベルによって評価できるかを調べた結果、正常に発育した個体との差異を 4 カ月齢以降に明らかにすることができた。

今後、T レベルで評価を行う上での適切な時期、その他の候補指標による基準を作成できるかどうか、さらに異なる病態での評価の適正について検討していく必要がある。

【参考文献】¹⁾Kitahara *et al.*, *Dom Anim Endocrinol* (2016), ²⁾池田ら, 日本繁殖生物学会大会 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 加藤 梨帆, 北原 豪, 遠見 広一郎, 小林 郁雄, 大澤 健司
2. 発表標題 春機発動前の牛セルトリ細胞成熟化と精子形進行解明
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学農学部獣医学科産業動物臨床繁殖学研究室 https://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/rinpan/
--

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	村瀬 哲磨 (Murase Tetsuma) (30303514)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	
研究 分担者	大澤 健司 (Osawa Takeshi) (90302059)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	

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