

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18149

研究課題名（和文）1細胞RNAsequenceによる血液精巣関門の成立の解明と男性不妊治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of blood-testis barrier formation by single-cell RNA sequencing and application to male infertility treatment

研究代表者

加藤 大貴（KATO, Taiki）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：00620931

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）：セルトリ細胞は精子形成の足場となる体細胞で、細胞間接着の成立などを介して精子形成細胞の正常な分化をサポートする。当初のSingle cell RNA sequenceでは期待した成果を得られず、停留精巣のセルトリ細胞機能に関して研究を行い成果を得た。停留精巣（片側122例、両側 23例）を対象として、停留精巣の精巣生検組織とセルトリ細胞機能の関連を調べた。生後2歳以下の両側停留精巣患児のうち、セルトリ細胞機能が低下している症例では、精子形成細胞数が有意に少なく、将来男性不妊をきたすハイリスク群になり、造精機能障害リスクの層別化ができることをJournal of Urologyに発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

停留精巣は幼少期から精子形成細胞数の減少がみられることが知られている。精巣生検における1精細管断面あたりの平均精子形成細胞数は、造精機能障害の予測因子となり、不妊リスクの指標として長年使用されてきたが、精巣生検は侵襲を伴うことが問題である。今回、私たちは生検を行わずに、セルトリ細胞の機能に注目して、不妊リスクを予測するバイオマーカーを確立し得た。停留精巣術後の父性獲得率は、片側例で89.5%、両側例で62%と報告され、その原因のひとつがセルトリ細胞の機能異常に起因する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Sertoli cells are somatic cells that serve as scaffolds for spermatogenesis and support normal differentiation of spermatogenic cells through local hormone secretion and establishment of intercellular adhesion. We report the results of our study on Sertoli cell function in undescended testes. We investigated the relationship between testicular biopsy tissue from undescended testes and serum hormone levels reflecting Sertoli cell function in children with undescended testes (122 unilateral and 23 bilateral). The results were published in the Journal of Urology and showed that among bilateral undescended testis patients under 2 years of age, those with impaired Sertoli cell function had significantly lower spermatogenic cell counts and were at high risk for future male infertility, and that the risk of spermatogenesis dysfunction could be stratified according to serum hormone levels.

研究分野：小児泌尿器科

キーワード：停留精巣 セルトリ細胞 男性不妊

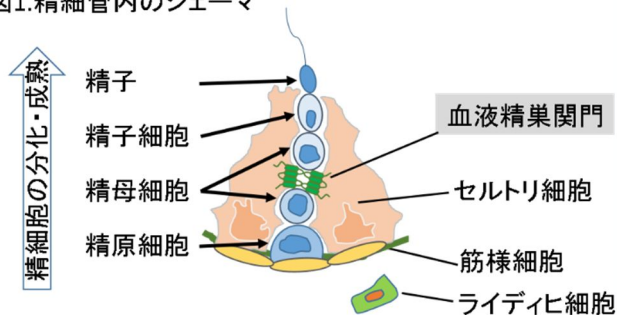
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

**男性不妊** 不妊カップルは5組中1組を占め、その原因の半数は男性側の要因である。男性不妊の70%は、染色体や内分泌学的に異常がみられない特発性である。男性不妊の病態は未だ不明な点が多く、治療法の確立は少子高齢化が進む本邦では喫緊の課題である。近年の生殖補助医療の発展により、自然妊娠できなくても精子採取できれば、受精することが可能となった。しかし、精子の前段階である精細胞の分化障害の機序は不明で、現時点では克服できていない。

**血液精巣関門と精細胞の分化** 精巣内には、精細管内に精細胞(精原細胞、精母細胞、精子細胞、精子)と体細胞であるセルトリ細胞、筋様細胞が、間質にはライディヒ細胞が存在する(図1)。セルトリ細胞は、精細胞を取り巻くように存在し、出生前から常に各種サイトカインやホルモンを分泌して精細胞の生存・維持・分化・成熟を促し、精子形成に深く関わる。また、隣接するセルトリ細胞間には、思春期に血液精巣関門が形成される。血液精巣関門の構成タンパクを欠損させたマウスでは精細胞の分化障害を生じ、血液精巣関門は精細胞の分化に必須である。

図1.精細管内のシエマ



### 2. 研究の目的

[1] 停留精巣における血液精巣関門の構成タンパクの発現解析と精細胞に与える影響を明らかにする。[2] 血液精巣関門の成立に関わる因子の探索を1細胞RNA-sequence法の手法を用いて、思春期ラット精巣、ヒト精巣で遺伝子発現の同定を行う。

### 3. 研究の方法

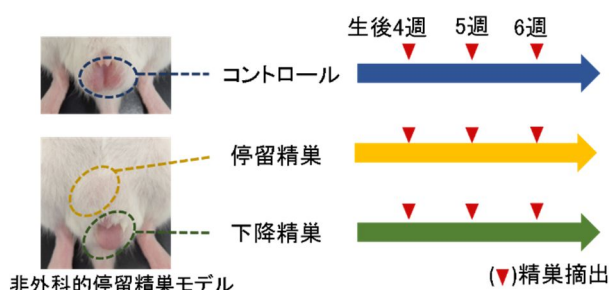
**研究[1] 停留精巣における血液精巣関門の構成タンパクの発現解析と精細胞に与える影響**

【モデル動物】:12週齢妊娠Sprague-Dawleyラットの妊娠14~20日の間、flutamide 7.5mg/bodyを腹腔内投与し、出生した雄仔を非外科的停留精巣モデルとして使用した。

【方法】思春期にあたる生後4、5、6週に精巣を摘出し、コントロール、停留精巣、下降精巣の3群で血液精巣関門の構成タンパク(Claudin-11, Occludin, Zo-1)の発現を経時的・横断的に比較する(図2)。血液精巣関門の機能を調べるため、精巣摘出直前に硝酸ランタン(分子量433)を全身灌流し、透過型電子顕微鏡を用いてそのバリア機能を評価する。精細胞に与える影響について、

経時的・横断的に精細胞の分化とアポトーシスを調べる。

図2. 停留精巣モデルラットを用いた実験計画



【評価項目】

- ・血液精巣関門の構成タンパクの発現：免疫組織化学染色、Western-blot
- ・血液精巣関門のバリア機能の評価：透過型電子顕微鏡での観察(間質から細胞間隙に侵入した硝酸ランタンが、血液精巣関門を通過して精細管管腔内に透過する

るか否か)

・精細胞の分化とアポトーシス：精細胞の各分化段階の特異的タンパクによる免疫染色(GFR1, SALL4, UTF1, ZBTB16, NGN3, c-kit)、減数分裂に関わるタンパクの発現(Strat8, DMC1, SCP3)、TUNEL、Western-blot(Cleaved caspase9)を用いたアポトーシスの評価

研究[2] 血液精巣関門の成立に関わる因子の探索

1 細胞 RNA-sequence 法を用いた思春期セルトリ細胞の特異的遺伝子発現の同定

【方法】[1]の3群からそれぞれ精巣を摘出した後、酵素処理を行い、細胞を分散する。各種細胞を1細胞ずつランダムに採取して、cDNAを合成・増幅し、RNA-sequenceを行う。分散した細胞は細胞種が不明であるため、得られた細胞での発現遺伝子と既知の細胞表面マーカー(Sox9, WT1, DDX4, LHCGR など)を比較することで細胞種の同定を行う。

【評価項目】コントロール群、停留精巣群、下降精巣群でそれぞれのセルトリ細胞の遺伝子発現を網羅的に比較する。

4. 研究成果

研究[1]

1)精巣組織学的所見

コントロール、下降精巣では生後6週で精子細胞がみられたが、停留精巣では精母細胞で分化が停止した。

2)BTB 構成蛋白質(CLDN11, OCLD, Zo1)の発現解析(Western-blotting(WB)、免疫染色)

Western blotting; CLDN11, OCLD, Zo1 の発現量は、コントロール、停留精巣、下降精巣とも差がみられなかった。免疫染色に関して、生後5週以降で CLDN11 局在がコントロールと停留精巣で異なっていた。すなわち、停留精巣では CLDN11 タンパクが精細管の基底膜に対して垂直方向に発現する異常な局在を示した。

### 3)アポトーシス評価(TUNEL 法)

コントロール、下降精巣と比較して、停留精巣では、生後 5 週以降で TUNEL 陽性精細胞数が有意に多く、BTB が破綻した周囲の精細胞がアポトーシスした。精細管辺縁の精細胞は TUNEL 陰性であった。

### 4)精細胞の分化

コントロール、下降精巣、停留精巣とも精細胞は Stra8, SCP3 が陽性で第一減数分裂完了まで分化していることが確認された。

### 5)透過電子顕微鏡(TEM)を用いた BTB の超微細構造解析

試料作成時に硝酸ランタンを全身灌流させたところ、停留精巣では BTB を透過して精細管内腔まで浸透し BTB の機能不全が観察された。

#### 研究[2]

過去の文献に従って酵素処理を行い、精巣の細胞の分散を試みた。分散後にセルトリ細胞のみを培養したが、他細胞の混在が確認され、精度に問題がみられ、解析に至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Taiki Kato, Kentaro Mizuno, Daisuke Matsumoto, Hidenori Nishio, Akihiro Nakane, Satoshi Kurokawa, Hideyuki Kamisawa, Tetsuji Maruyama, Shoichiro Iwatsuki, Yukihiro Umemoto, Takahiro Yasui, Yutaro Hayashi	4. 巻 207(3)
2. 論文標題 Low Serum Inhibin B/Follicle-stimulating Hormones and Anti-Mullerian Hormone/Follicle-Stimulating Hormones Ratios as Markers of Decreased Germ Cells in Infants with Bilateral Cryptorchidism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 701-709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/JU.0000000000002344	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 -

1. 著者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Ando Ryosuke, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1398-1408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.12788	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Taiki Kato, Kentaro Mizuno, Hidenori Nishio, Daisuke Matsumoto, Hideyuki Kamisawa, Satoshi Kurokawa, Akihiro Nakane, Tetsuji Maruyama, Takahiro Yasui, Yutaro Hayashi
2. 発表標題 Dysfunction of the Blood Testis Barrier in Undescended Testes and the Role of Androgens in the Blood Testis Barrier Composition
3. 学会等名 European Association of Urology Annual Congress（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤大貴、丸山哲史、梅本幸裕、松本大輔、岩月正一郎、水野健太郎、西尾英紀、安井孝周、林祐太郎
2. 発表標題 停留精巣患児における男性不妊リスクの層別化 ～術前の血清ホルモン値から精子形成細胞数を予測する～
3. 学会等名 日本小児泌尿器科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Ando Ryosuke, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model.
3. 学会等名 The 68th Societies for Pediatric Urology annual meeting, 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Ando Ryosuke, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Abnormal Claudin-11 localization and its effects on the blood-testis barrier function during puberty in a cryptorchid rat model
3. 学会等名 35th Annual European Association of Urology Congress, 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 加藤大貴、水野健太郎、西尾英紀、安井孝周、林祐太郎
2. 発表標題 血液精巣関門の構成におけるアンドロゲンの関与～停留精巣モデルラットを用いたアンドロゲンレセプターの発現解析～
3. 学会等名 第29回日本小児泌尿器科学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 11.加藤大貴、水野健太郎、西尾英紀、守時良演、神沢英幸、黒川寛史、中根明宏、丸山哲史、安藤亮介、林祐太郎、安井孝周
2. 発表標題 思春期停留精巣モデルラットにおける血液精巣関門関連タンパクCLDN11の発現解析と精細胞の分化に与える影響
3. 学会等名 第71回名古屋市立大学医学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------