

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592081

研究課題名（和文） セルトリ細胞の分化・成熟と雄性生殖器の発生および精子形成との関わり

研究課題名（英文） The Relationship between Proliferation and Maturation of Sertoli cells and Development of Male Genitalia and Spermatogenesis

研究代表者

林 祐太郎 (HAYASHI YUTARO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40238134

研究成果の概要（和文）：

セルトリ細胞は性分化のみならず、出生後の精子形成に至るまで生殖細胞を支持・栄養している。性分化カスケードを明らかにすべく、46, XX 精巣性 DSD において特異的に発現する遺伝子群を探索した。発現亢進した遺伝子には、ROCK1, PQBP1, UCP2 などが、低下した遺伝子には、EEF1A1 遺伝子が含まれていた。ROCK1 遺伝子はセルトリ細胞内に発現し、培養細胞を用いた実験では、SOX9 遺伝子発現が低下した。ROCK1-SOX9 シグナル伝達系が精巣発生に重要な役割を持つことを明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：

Molecular mechanisms of sex differentiation have been unraveled by gene expression cascade triggered by the SRY gene, but the whole picture still remains unclear. In the present study, to clarify the genetic characteristics of the XX testis without SRY, we histologically analyzed the testicular tissue of patients with 46, XX testicular DSD and attempted to identify the genes with differential expression compared with the XY testis by using PCR-based subtractive hybridization technique. We used specimens obtained from testicular biopsy in boys with 46, XX testicular DSD. Age-matched XY testis derived from hydrocele were used as the control. After PCR-based subtractive hybridization, the subtracted cDNAs were sequenced and analyzed. Further, distribution of candidate genes in the testicular tissue was clarified by immunohistochemistry. The present study was approved by the institutional review board in our university. We finally identified 13 upregulated and 7 downregulated genes in the XX testis. Among the candidate genes, we focused on ROCK1, PQBP1, and UCP2 in the upregulated-gene group and on EEF1A1 in the downregulated-gene group. In immunohistochemistry, ROCK1 protein was detected in the germ cells and Leydig cells, PQBP1 protein in the Leydig cells, and UCP2 protein in the Sertoli cells. From previous reports and in vitro inhibitory assay, it is feasible that ROCK1 phosphorylates and activates SOX9 in Sertoli cells. It is suggested that testis formation is initiated by an alternative signaling pathway attributed to ROCK1 activation, and not SRY activation, in XX testis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード： 精巣、生殖細胞、セルトリ細胞、性分化

1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う脊椎動物の中でも性決定メカニズムは非常に多様性に富んでおり、哺乳類では、XX/XY型の性染色体によって性決定がなされる。1990年、SRY (Sex-determining region on the Y chromosome) 遺伝子が発見されたが、現在に到るまでSRY遺伝子をはじめとする性決定のカスケードの全貌は明らかにされていない。ヒト性腺原基の形成は、胎生5週齢前後に開始され、種々の分化・誘導因子により制御されるが、この発生メカニズムの破綻が半陰陽や性腺形成不全による様々な外陰部異常や排尿機能異常を来す。私達は日々こうした性分化異常症患者児に対して形成術・機能再建術といった外科的治療を行う一方、病態解明のため(1)性分化に関わる因子のヒトにおける発現変化、(2)始原生殖細胞の発生機序、(3)分化した精巣組織がどのように成熟し、受精可能な精子まで発生するのか、などの基礎的研究を行ってきた。

以上のような研究成果を踏まえ、私たちは、雄への性分化に重要な役割を果たすセルトリ細胞に注目した。マウスではセルトリ前駆細胞において *Sry* 遺伝子発現が精巣形成前の胎生期10-11.5日目に一過性にピークを示し、標的遺伝子近傍のDNA鎖に結合することにより、その発現量を調節していると考えられている²⁾。従来の性分化研究では生殖細胞に注目したものが多く、セルトリ細胞の発生・分化・成熟のメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。ところで最近、性分化の開始する時期に一致して、*Sry* 遺伝子の一過性発現の後に、セルトリ細胞内にグリコーゲン顆粒の蓄積が認められることが報告された³⁾。また Nef らはインスリン様成長因子を変異させたマウスでは精巣分化が起こらないことを示し⁴⁾、グルコースで刺激されるシグナル伝達系が性分化カスケードに関与する可能性が示唆されている。また精子形成過程においてもセルトリ細胞機能が重大な影響を持つと考えられ、生殖細胞との相互作用について研究が進められている。

(参考文献)

1. Sinclair, et al., (1990) Nature, 346: 240.
2. Harley, et al., (1992) Science, 255: 453.

3. Matoba, et al., (2005) J Cell Sci. 118: 1449.

4. Nef, et al., (2003) Nature, 426: 291.

2. 研究の目的

精巣決定因子としてSRY遺伝子が同定されて20年が経過するが、性分化メカニズムの全容は明らかにされていない。胎生期にセルトリ細胞内で発現するSRY遺伝子をキー遺伝子とした性分化カスケードを明らかにするため、性染色体がXXにもかかわらず精巣が発生する46,XX精巣性性分化疾患(DSD)に着目して、SRYを介さない新規カスケードの同定を本研究の目的とした。

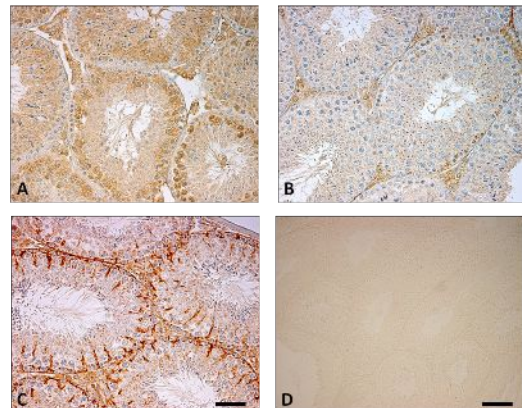
3. 研究の方法

46,XX精巣性DSD症例のうち、外性器形成術や精巣固定術を行う際に採取した精巣組織を本研究に使用した。また対照群として、同年齢のXY精巣組織を使用した。これらの精巣組織からmRNAを抽出し、cDNA libraryを作成した。PCR-Subtraction法によって両者間で発現差を示す遺伝子群の探索を行った。対象とした46,XX精巣性DSDはいずれもSRY遺伝子が陰性であった。なお、本研究は、本学ヒト遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

4. 研究成果

XX精巣で発現亢進した13遺伝子、発現低下した7遺伝子を同定した。発現亢進していた遺伝子のうち、ROCK1・PQBP1・UCP2の3遺伝子に着目した。免疫染色では下図に示すように、セルトリ細胞、もしくは精子形成細胞に局在していた(図1)。

図1 (A: ROCK1, B: PQBP1, C: UCP2, D: negative control)



この中でも、ROCK1 遺伝子は、精子形成細胞やセルトリ細胞に局在しており、成獣マウス精巣では、精細管ステージ特異的に発現変化を認めた。

さらに、セルトリ細胞培養株である TM4 細胞において ROCK1 特異的阻害剤である Y-27632 を添加したところ、SOX9 遺伝子発現が抑制された。このことから、ROCK1 が SOX9 を活性化することが示唆され、46, XX (SRY 陰性) において精巣が形成されたことを説明できる新規カスケードを同定することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 28 件) (1. ~28. すべて査読有り)

1. Hayashi Y, Mizuno K, Kojima Y, Moritoki Y, Nishio H, Kato T, Kurokawa S, Kamisawa H, Kohri K. Characterization of the urethral plate and the underlying tissue defined by expression of collagen subtypes and microarchitecture in hypospadias. *Int J Urol*. 18: 317-22, 2011.
2. Taguchi K, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Molecular Analysis of Clear Cell Sarcoma With Translocation. *Urology*. 78: 684-6, 2011
3. Nishio H, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic Nephrectomy for Pelvic Multicystic Dysplastic Kidney. *Urology*. 78: 434-6, 2011.
4. Iwatsuki S, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Umemoto Y, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Endocrine assessment of prepubertal boys with a history of cryptorchidism and/or hypospadias: a pilot study. *J Urol*. 185: 2444-50, 2011.
5. Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic management of nonpalpable testis: new treatment strategy. *J Endourol*. 25: 635-40, 2011.
6. Kojima Y, Umemoto Y, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Hayashi Y. Comparison of laparoscopic pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction in adults and children: lessons learned. *J Urol*. 185: 1461-8, 2011.
7. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kohri K. Prepuce: phimosis, paraphimosis, and circumcision. *Scientific World Journal*. 11: 289-301, 2011.
8. Kato T, Kojima Y, Kamisawa H, Takeuchi M, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Findings of fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the diagnosis of non-palpable testes. *BJU Int*. 107: 290-4, 2011.
9. Kubota H, Sasaki S, Kubota Y, Umemoto Y, Yanai Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Cyclooxygenase-2 protects germ cells against spermatogenesis disturbance in experimental cryptorchidism model mice. *J Androl*. 32: 77-85, 2011.
10. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. *Urology*. 77: 251.e1-6, 2011.
11. Kojima Y, Kohri K, Hayashi Y. Genetic pathway of external genitalia formation and molecular etiology of hypospadias. *J Pediatr Urol*. 6: 346-54, 2010.
12. Shibata Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Optimal cutoff value of contralateral testicular size for prediction of absent testis in Japanese boys with nonpalpable testis. *Urology*. 76: 78-81, 2010.
13. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kamisawa H, Maruyama T, Kohri K. A Japanese view on circumcision: nonoperative management of normal and abnormal prepuce. *Urology*. 76: 21-4, 2010.
14. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kurokawa S, Kamisawa H, Maruyama T, Kohri K. Demonstration of postoperative effectiveness in ventral lengthening using a tunica vaginalis flap for severe penile curvature with hypospadias. *Urology*. 76: 101-6, 2010.
15. Mizuno K, Hayashi Y, Tozawa K, Iwatsuki S, Kojima Y, Kohri K. Single-nucleotide polymorphism in WT1 gene in a hyperplastic intralobar nephrogenic rest with botryoid protrusion. *Urology*. 76: 149-52, 2010.
16. Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Kohri K, Hayashi Y. Spermatogenesis after 1-stage fowler-stephens orchiopexy in experimental cryptorchid rat model. *J Urol*. 183: 2380-4, 2010.

17. Iwatsuki S, Kojima Y, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic Management for Fibroepithelial Polyp Causing Ureteropelvic Junction Obstruction in a Child. *Urology*. 76: 146-8, 2010.
 18. Hayashi Y, Kojima Y, Kamisawa H, Imura M, Mizuno K, Kohri K. Is antibiotic prophylaxis effective in preventing urinary tract infections in patients with vesicoureteral reflux? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 8: 51-8, 2010.
 19. Niimi K, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Successful treatment with hydrodistension in a boy with refractory overactive bladder with glomerulation. *J Pediatr*. 155: 597-597.e1, 2009.
 20. Kojima Y, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Advances in molecular genetics of cryptorchidism. *Urology*. 74: 571-8, 2009.
 21. Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Long-term physical, hormonal, and sexual outcome of males with disorders of sex development. *J Pediatr Surg*. 44: 1491-6, 2009.
 22. Kojima Y, Sasaki S, Mizuno K, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Laparoscopic dismembered pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction in children. *Int J Urol*. 16: 472-6, 2009.
 23. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol*. 181: 1330-7; discussion 1337, 2009.
 24. Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic orchiectomy and subsequent internal ring closure for extra-abdominal testicular nubbin in children. *Urology*. 73: 515-9; discussion 519-20, 2009.
 25. Iwatsuki S, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Detection of ectopic ureteral insertion to vagina with hypoplastic ectopic kidney by three-dimensional computed tomography. *Urology*. 73: 505-6, 2009.
 26. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF-kappaB associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model. *Urology*. 73: 389-93, 2009.
 27. Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K, Masui S, Nishinakamura R. Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of integrin alpha8 and aquaporin-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 45: 62-8, 2009.
 28. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic diagnosis and treatment of a phenotypic girl with mosaicism 45,XO/46,X,idic(Y) mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg*. 44: e1-3, 2009.
- [学会発表] (計 15 件)
1. 林祐太郎:先天性泌尿器科疾患の発症機序の解明と新しい治療法の開発。第 62 回名古屋市立大学医学会総会 (特別講演)、2011. 12. 4、名古屋市
 2. 林祐太郎:小児停留精巣のガイドライン。第 61 回日本泌尿器科学会中部総会、2011. 11. 16-18、京都市
 3. 林祐太郎:小児泌尿器医療の常識と非常識。第 79 回秋田県泌尿器科集談会 (特別講演)、2011. 10. 1、秋田市
 4. 林祐太郎、水野健太郎、神沢英幸、西尾英紀、守時良演、小島祥敬、郡健二郎:尿道下裂修復術～プリンシプルとプラクティス～。第 20 回日本小児泌尿器科学会総会 (ビデオシンポジウム)、2011. 7. 13-15、秋田市
 5. 林祐太郎:停留精巣に対する手術戦略～プリンシプルとプラクティス～。第 7 回鹿児島泌尿器科セミナー (特別講演)、2011. 7. 2、鹿児島市
 6. 林祐太郎:小児内分泌疾患と泌尿器科疾患。第 8 回東海小児内分泌セミナー (特別講演)、2011. 5. 21、名古屋市
 7. Hayashi Y, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K: Evaluation of long-term functional outcome with uroflowmetry after proximal hypospadias repair: original Koyanagi repair vs modified Koyanagi repair. AUA 2011, 2011. 5. 14-19, Washington, USA.
 8. 林祐太郎:小児泌尿器科学～現在から未来へ～。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21-24、名古屋市
 9. Hayashi Y, Imura M, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K: Evaluation of long-term functional outcome with uroflowmetry after proximal hypospadias repair; Original Koyanagi repair vs modified Koyanagi repair. 23rd

International Symposium on Paediatric Surgical Research, 2010.9.12-14, 東京都

10. Hayashi Y, Mizuno K, Nishio H, Kamisawa H, Kojima Y, Kohri K: Characterization of the urethral plate and the underlying tissue in hypospadias with transmission electron microscopy and expression of collagen subtypes. 23rd International Symposium on Paediatric Surgical Research, 2010.9.12-14, 東京都
11. Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K : Disturbance of testicular development during testicular tubule formation causes vanishing testis. 23rd International Symposium on Paediatric Surgical Research, 2010.9.12-14, 東京都
12. 林祐太郎、小島祥敬、水野健太郎、郡健二郎:精巣鞘膜フラップ補填により高度の陰茎彎曲を是正した尿道下裂の術後評価。第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010.4.27-30、盛岡市
13. 林祐太郎、小島祥敬、水野健太郎、丸山哲史、梅本幸裕、橋本良博、安井孝周、戸澤啓一、郡健二郎:腹腔鏡と鼠径部アプローチを組み合わせた片側非触知精巣 75 例の治療経験。第 23 回日本 Endourology・ESWL 学会総会、2009.11.11-13、東京都
14. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kohri K: Disturbance of testicular development during testicular tubule formation causes vanishing testis. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
15. 林祐太郎、水野健太郎、黒川覚史、小島祥敬、郡健二郎:埋没陰茎に対する手術治療アルゴリズムの作成と治療成績。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市

[その他]

1. 林祐太郎、水野健太郎、小島祥敬:医療の現場—泌尿器科の最前線 ③。24P、読売新聞 2011 年 7 月 1 日号、2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 祐太郎 (HAYASHI YUTARO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40238134

(2)研究分担者

小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60305539

水野 健太郎 (MIZUNO KENTARO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70448710

黒川 覚史 (KUROKAWA SATOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50468253