

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：23304

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06730

研究課題名（和文）三次元解析を用いた精路の構造・形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the structure and formation mechanism of seminiferous tubules using three-dimensional analysis

研究代表者

仲田 浩規（Nakata, Hiroki）

公立小松大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80638304

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）：日本を含む先進国の約15%のカップルが不妊と推計され、その原因の半数は男性側にある。男性側の研究の発展には精巣を含む精子の通り道（精路）の詳細な形態学的情報が不可欠である。本研究では連続切片を作製し、深層学習を用いて、精路の三次元再構築を行なった。その結果、ヒト精巣輸出管・精巣上体管と実験動物（マウス・ラット）の胎児期精路の詳細な三次元構造を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深層学習を用いることで、ヒト精巣輸出管・精巣上体管と実験動物（マウス・ラット）の胎児期精路を再構築し、その正確な三次元構造を明らかにした。本研究結果は、男性不妊症に関連する解剖学的異常の解析に有用であると考えられる。また、本研究で開発した方法は、精路以外の構造の詳細を明らかにする研究にも応用可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Detailed morphological information is essential for the development of research on reproductive tracts, including the testis. In this study, serial sections were prepared and three-dimensional reconstruction of the reproductive tract was performed using deep learning. We were able to reveal the detailed three-dimensional structures of the human efferent ducts and epididymal duct and the fetal reproductive tracts of experimental animals (mice and rats).

研究分野：解剖学

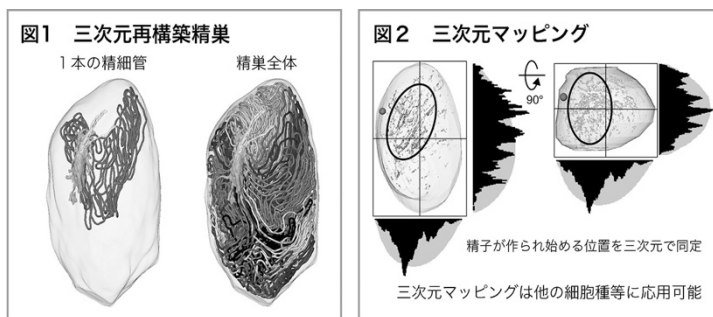
キーワード：三次元再構築 精巣輸出管 精巣上体管 精細管 精巣 深層学習

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

日本を含む先進国の約 15%のカップルが不妊と推計され、その原因の半数は男性側にある。男性側の主な原因は精子が作られる過程の障害であるが、原因が解明されたものは少ない。精巣を含む精子の通り道(精路)の研究の発展には詳細な形態学的情報が不可欠であるが、その詳細な形態や器官形成メカニズムの多くは不明である。

精細管は胎生期の生殖腺にある規則正しい C 字型のループで構成される精巣索が発達したものである。成人になると精細管は直径 200-300 $\mu$ m、長さが 10cm 以上、さらに複雑に蛇行しているため、肉眼でも顕微鏡でもその三次元の全体像を正確に把握することは技術的に難しく、概括的な把握に留まっている。もちろん、精細管を含めヒト精路の詳細な三次元構造の報告はない。2015 年、申請者は成体マウスの精巣における全ての精細管を高解像度で再構築することに成功し、精細管の詳細な三次元構造を初めて報告した(図 1)(Nakata et al., 2015)。1つの精巣に精細管は 11 本、1本の精細管は全体として漏斗型、精巣全体はコップを順に重ねたような規則的な層構造をしていた。また、精子形成の開始位置を三次元で同定し、その位置が頭部側かつ精巣網側に偏っていることも明らかにした(図 2)(Nakata et al., 2017)。精細管全体で規則性をもった層構造を作るメカニズムは現時点で未解明であるが、精子形成の開始位置が偏っていることと成体になるとその長さが 20 倍以上になることの 2つから、上記メカニズムは精子形成の開始位置が関与しているのではないかと推測した。さらに、精細管を再構築する方法を応用し、精巣の外にある精路の三次元構造も明らかにした(Nakata and Iseki 2019)。精巣のすぐ外にある精路(精巣外精巣網と精巣輸出管)は精巣から 1本の管のように始まり、すぐに 4本に分岐し、最終的に 1本になって精巣上部へ繋がっていた。精巣と精巣輸出管は発生の由来が異なり、胎児期に結合することはわかっているが、両者がどのように結合するかは未解明である。



### 2. 研究の目的

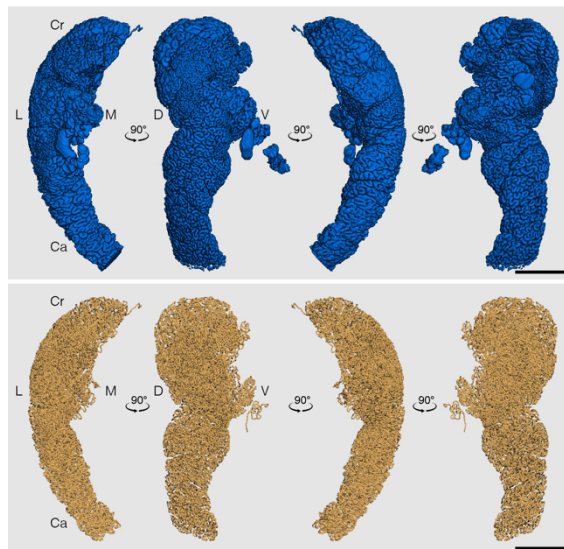
本研究の目的は、「精路はどのような三次元構造をしていて、どのように作られるのか」を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

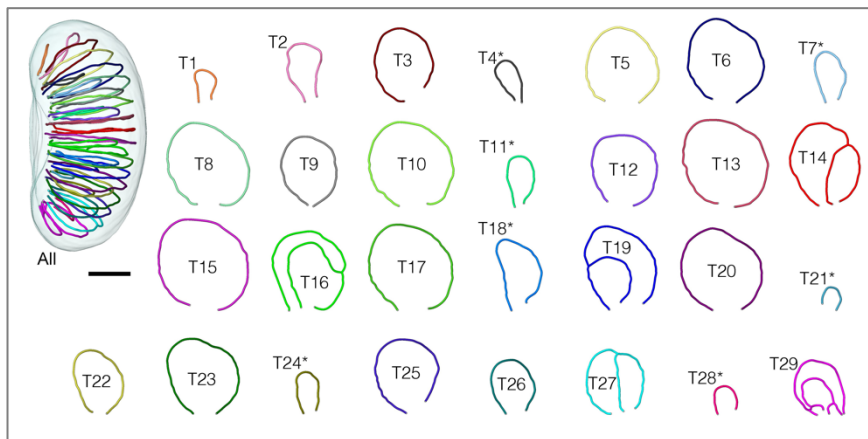
進行性前立腺癌で外科的去勢術にて摘出されたヒト試料を用いる。試料は摘出後直ちにブアン液に浸漬する。最適な固定・パラフィンブロック作製プロトコルを検討し、5 $\mu$ m 連続切片を作製する。ヒト試料は非常に大きいため、申請者が確立した三次元再構築法(Nakata et al., 2017, 2019)をさらに改良する。具体的には、管のセグメンテーションに深層学習を用いることで時間・労力を大幅に減らす。精細管・精巣輸出管・精巣上体管を三次元再構築し、本数、長さ、分岐、三次元走行、相互関係といった詳細な三次元構造を明らかにする。また、実験動物としてマウス・ラットの胎児期精路の詳細を明らかにするため、各発生段階のマウス・ラットから摘出した泌尿生殖器系の 5 $\mu$ m 連続切片を作製し、精路の三次元再構築を行う。

### 4. 研究成果

ヒト精巣上部頭部の連続切片を作製すると 669 $\pm$ 96 切片 (n = 3) になった。深層学習を用いて管のセグメンテーションを行い、三次元再構築するとともに、その中心線を作成した(右図)。管は 4.9 $\pm$ 1.4 m (n = 3) 作ることができた。精巣外精巣網と精巣上体管の両方に接続する管を 1本の精巣輸出管と定義すると、平均 14.7 本であり、その全長は 3.0 m であった。頭部側の精巣輸出管は 1本に合流して精巣上体管に結合していたが、残りの精巣輸出管は個々に精巣上体管に結合していた。上記の結合パターンの違いにより上皮のスイッチパターンも異なっていた。精巣上体管は結合組織性中隔の有無にかかわらず、構造的にセグメント化されていた。



マウス (E15.5 と E18.5) とラット (E16.5 と E19.5) の右精巣各 3 個を改変デービットソン固定し、パラフィンブロックを作製した。連続切片を作り、基底膜タンパク質の免疫染色を行うことで、管を三次元再構築した (右図はラット E16.5)。精巣索の本数はマウス・ラットでそれぞれ  $12.7 \pm 1.1$  本 ( $n = 6$ )・ $27.8 \pm 2.9$  本 ( $n = 6$ ) であった。精巣索 1 本あたり分岐数がマウス・ラットでそれぞれ  $1.52 \pm 0.42$  箇所 ( $n = 6$ )・ $0.30 \pm 0.23$  箇所 ( $n = 6$ ) であった。白膜に接しない管の割合がマウス・ラットでそれぞれ  $6.5 \pm 5.3\%$  ( $n = 6$ )・ $23.0 \pm 4.2\%$  ( $n = 6$ ) であった。マウス・ラットともに、精巣索は頭部側でコイリングが強く、尾部側でコイリングが弱かった。また、精巣索は精巣網側から観察すると、すべて時計回りであった。



ス・ラットでそれぞれ  $12.7 \pm 1.1$  本 ( $n = 6$ )・ $27.8 \pm 2.9$  本 ( $n = 6$ ) であった。精巣索 1 本あたり分岐数がマウス・ラットでそれぞれ  $1.52 \pm 0.42$  箇所 ( $n = 6$ )・ $0.30 \pm 0.23$  箇所 ( $n = 6$ ) であった。白膜に接しない管の割合がマウス・ラットでそれぞれ  $6.5 \pm 5.3\%$  ( $n = 6$ )・ $23.0 \pm 4.2\%$  ( $n = 6$ ) であった。マウス・ラットともに、精巣索は頭部側でコイリングが強く、尾部側でコイリングが弱かった。また、精巣索は精巣網側から観察すると、すべて時計回りであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanazawa Yuta, Omotehara Takuya, Nakata Hiroki, Hirashima Tsuyoshi, Itoh Masahiro	4. 巻 164
2. 論文標題 Three-dimensional analysis and in vivo imaging for sperm release and transport in the murine seminiferous tubule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 9~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-21-0400	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 Nakata Hiroki, Omotehara Takuya, Itoh Masahiro, Iseki Shoichi, Mizokami Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Three dimensional structure of testis cords in mice and rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1911~1922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.13069	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 Nakata Hiroki, Iseki Shoichi, Mizokami Atsushi	4. 巻 20
2. 論文標題 Three dimensional reconstruction of testis cords/seminiferous tubules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 402~409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Taito, Nakata Hiroki, Kadomoto Suguru, Iwamoto Hiroaki, Yaegashi Hiroshi, Iijima Masashi, Kawaguchi Shohei, Nohara Takahiro, Shigehara Kazuyoshi, Izumi Kouji, Kadono Yoshifumi, Mizokami Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Three-dimensional morphological analysis of spermatogenesis in aged mouse testes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02443-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Omotehara Takuya, Nakata Hiroki, Nagahori Kenta, Itoh Masahiro	4. 巻 157
2. 論文標題 Comparative anatomy on the development of sperm transporting pathway between the testis and mesonephros	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-02057-x	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 Omotehara Takuya, Nakata Hiroki, Itoh Masahiro	4. 巻 251
2. 論文標題 Three dimensional analysis of mesonephric tubules remodeling into efferent tubules in the male mouse embryo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 513 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.410	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 Omotehara Takuya, Hess Rex A., Nakata Hiroki, Birch Lynn A., Prins Gail S., Itoh Masahiro	4. 巻 393
2. 論文標題 Expression patterns of sex steroid receptors in developing mesonephros of the male mouse: three-dimensional analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 577 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-023-03796-0	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 該当する

1. 著者名 Nakata Hiroki, Iseki Shoichi, Mizokami Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Three dimensional analysis of junctions between efferent and epididymal ducts in the human caput epididymis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 87 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13445	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10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲田浩規, 表原拓也, 伊藤正裕, 井関尚一, 溝上敦
2. 発表標題 胎児期マウス・ラット精巢索の三次元構造
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲田浩規
2. 発表標題 精巢と精子形成障害の三次元解析
3. 学会等名 第31回精子形成・精巢毒性研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲田浩規, 表原拓也, 伊藤正裕, 溝上敦
2. 発表標題 マウス・ラット精巢索の3次元構造
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第40回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲田浩規, 表原拓也, 伊藤正裕, 井関尚一, 溝上敦
2. 発表標題 マウス・ラット精巢索の3次元構造
3. 学会等名 第81回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲田浩規, 溝上敦
2. 発表標題 精子形成障害モデルマウスの三次元解析
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲田浩規, 表原拓也, 伊藤正裕, 井関尚一, 溝上敦
2. 発表標題 マウス・ラット精巣索の3次元構造
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲田浩規, 井関尚一, 溝上敦
2. 発表標題 ヒト精巣輸出管・上体管の三次元構造
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第42回学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仲田浩規, 井関尚一, 溝上敦
2. 発表標題 ヒト精巣輸出管・上体管の三次元構造
3. 学会等名 第83回日本解剖学会 中部支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川尻彩夏, 仲田浩規
2. 発表標題 ビタミンA欠乏モデルマウスにおける精子形成障害と回復の三次元解析
3. 学会等名 第83回日本解剖学会 中部支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仲田浩規, 井関尚一, 溝上敦
2. 発表標題 ヒト精巣輸出管・上体管の三次元構造
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024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