

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16740

研究課題名（和文）精巣内分泌機能の改善・再構築に向けた基礎および臨床的検討

研究課題名（英文）Basic and clinical research for improving and reconstructing testicular endocrine function

研究代表者

富田 圭司 (Tomita, Keiji)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30640148

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ほとんどの臓器には存在しないD型アスパラギン酸がマウス精巣に存在し、その局在や個体内での挙動、生理的作用の一端を明らかにした。精巣内分泌機能に直接的に作用することが明らかとなり、またそれを介して造精機能へポジティブな影響を及ぼす可能性が示唆された。D型アスパラギン酸が精巣に局在する機序については検討中ではあるがL型からの変換酵素などが想定され、それを明らかにすることでテストロン合成過程への介入の可能性があり臨床的にも意義のある発見につながりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に急速に進行する少子化、また不妊症の増加という背景を鑑みるに、造精機能障害の原因解明は社会的にも重要な課題である。また造精機能に対して、明確な機序が明らかな介入手段は現状ほとんどないと言える。本研究はその可能性に繋がりうる成果と考える。さらに本研究が発展すれば男性更年期障害、前立腺癌に対する内分泌療法の開発など多岐に渡り様々な分野での新たな治療開発の可能性に繋がりうる。

研究成果の概要（英文）：We have clarified D-aspartic acid, which does not exist in most organs, is present in the mouse testis, its localization, intra-individual behavior, and some of its physiological effects. It was revealed that it acts directly on testicular endocrine function, and it was suggested that it may have a positive effect on spermatogenic function. Although the mechanism by which D aspartate is localized in the testis is currently being investigated, it is assumed that it involves a converting enzyme from L-type aspartate. By clarifying this mechanism, there is a possibility of intervention in the testosterone synthesis process, which may be useful clinically.

研究分野：造精機能

キーワード：精巣内分泌機能 ライディッヒ細胞 テストステロン

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生体における精巣の機能は、大きく分けて造精および内分泌機能の2つに分類される。精巣で合成されるテストステロンの役割は骨格筋の成長・維持、造血作用、脂肪・糖の代謝、性行動などの精神面、性機能への影響など非常に多岐にわたり、極めて重要なホルモンである。また認知機能への影響も近年指摘されており、加齢に伴うテストステロン合成の低下は身体的、精神的に大きな影響を及ぼす。テストステロン合成の低下に伴う男性更年期障害は、個人の Quality of Life を損なうのは言うまでもないが、現代の超高齢社会においては社会的な損失も大きいことに疑問の余地はない。男性ホルモンの補充で様々な臓器障害を予防し、QOLの高い生活を維持する Healthy aging for men という概念が提唱されている。しかし一方で外因性のテストステロン補充は心血管イベントの増加、前立腺癌発症リスク上昇の可能性など無視できない影響が存在する。またホルモン補充療法では、生理的な状態に近い精巣内分泌機能の再獲得は全く困難な状況と言える。

テストステロンは造精機能に対しても必須のホルモンであり、テストステロンの knockout mouse では無精子症になることが知られている。ヒトにおいても低ゴナドトロピン性性線機能低下性などにおいてテストステロン低下を認める場合、造精機能が障害される。しかしテストステロンそのものを補充すれば negative feedback により逆に精巣における造精機能はさらに障害を受ける。精巣内分泌機能の賦活化は、上位ホルモンである LH 作用を持つ HCG 製剤の補充に限られており、前述のように現在の実臨床では生理的な内分泌機能に近い状態の獲得は困難な状況である。現在数組に1組のカップルが不妊症とされ、そのうち約48%において男性側に原因を指摘される(女性要因65% 男女ともに原因24%)。出生率の低下、少子化が世界的問題となっており、生殖医療の進歩は今後ますます重要な課題となってくるが、男性不妊症に対する治療手段は極めて限定的で長期間大きな breakthrough がない。男性因子を認めた場合その改善が困難な状況も多く、その場合状態によっては体外受精などの高度生殖医療が必要になってくる。現代の生殖年齢のカップルにおいて、妊娠・出産へ向かうには社会的にも医学的にも高いハードルを生じることが決して稀ではない。

現在男性の癌罹患率で上位の前立腺癌においてもテストステロンは重要な factor である。現在に至るまで数十年に渡り、前立腺癌に対してアンドロゲン除去療法が施行されている。前立腺癌の発生、増殖にはアンドロゲン受容体が大きな役割を担っており、テストステロンはその主要な制御因子である。現在前立腺癌に対する治療薬として細胞内のテストステロン代謝に作用する薬剤が開発されており治療手段は増えてきているが、今なお治療抵抗性前立腺癌が致命的になる症例もしばしば経験する。さらなる前立腺癌治療の開発に対してもテストステロン代謝に関する新たな知見が望まれる。

2. 研究の目的

上記のようにテストステロンの重要性は明らかであり、それを制御する手段の開発は社会的に大きな影響を及ぼしうる。精巣内分泌機能、造精機能やホルモン依存性悪性腫瘍に対する新たな治療戦略を構築するにあたり、テストステロン合成・代謝に対してそれを制御しうる新たな手段の開発が必須であり、その前段階としてテストステロン合成そのものの新たな知見が必要であると考えられる。

生殖医療において、男性因子の改善が可能であればより自然に近い形での妊娠の可能性に繋がりを、身体的・経済的な負担も改善される可能性がある。そのためには当然基礎的研究の発展が必須であり、精巣での造精・内分泌機能へ関与する因子の特定、その解析が進めば、実臨床における治療手段の開発へ寄与しうる。

我々は生体内にほとんど含まれないD型アスパラギン酸(D-Asp)に着目した。生体を構成するアミノ酸はL型であり、D型アミノ酸はタンパク質の合成に負の影響を与えるため生体内で分解されていると考えられている。しかし一方、少数の臓器にD型アミノ酸も含まれることが知られている。ラットの松果体、下垂体、精巣などの内分泌臓器にD-Aspが含まれることが報告されているが、その機能はほとんどわかっていない。マウス精巣にD-Aspが含まれることを確認し、その挙動・作用を解析することで精巣機能への影響を明らかにすることができると考えた。また合成酵素等の精巣内D-Aspの由来を明らかにすれば、生体内におけるD-Aspを経由した精巣機能への介入手段の開発に寄与しうると思った。

テストステロンはコレステロールからプロゲステロン等を経て精巣間質のライディッヒ細胞で合成される。合成には様々な酵素が関与するが、コレステロールのミトコンドリアへの取り込みにStAR(Steroidogenic Acute Regulatory Protein)が作用する。D-AspはStARの発現を亢進し、テストステロン合成を賦活化する可能性が示唆されている。マウス精巣内でのD-Aspによるテストステロン分泌亢進作用を同定し、その挙動を解析することでテストステロン合成に対する介入手段の可能性を模索する。

3. 研究の方法

週齢ごとにマウス精巣組織を取り出し、液体クロマトグラフィーを用いて D-Asp の含有量を測定した。また比較のために L-Asp についても同様の手法で測定した。D-Asp の分解酵素である DDO の活性を測定するために、マウス精巣のホモジネート溶液と DDO を反応させ、その代謝産物であるオキサロ酢酸の定量を液体クロマトグラフィーで行った。活性の測定も週齢ごとに行い成長過程での変化を観察した。D-Asp 含有量、DDO 活性ともに比較対象としてマウスの肝臓、腎臓組織についても測定した。DDO の活性についてはウェスタンブロッティング、real-time PCR でも確認を行った。

D-Asp のマウス精巣内での局在を観察するために、成熟マウスをグルタルアルデヒドで環流固定した後に精巣を取り出し、精細管組織の免疫蛍光染色を行った。比較のため精巣上体を別に採取しこちらについても染色を行った。また DDO の局在を観察するために幼若マウス、成熟マウスともに免疫染色を行った。

D-Asp の生体に対する作用を観察するために、In vitro 精子形成のアッセイを用いてその培地に D-Asp を加えることで造精機能に対する D-Asp の影響を検討した。精細胞の成熟とともに GFP を発現する Acrosin-GFP transgenic mouse の精巣を使用し GFP の発現を確認した。

Percoll 濃度勾配法を用いて成年マウス精巣組織から Leydig 細胞を単離した。その細胞培養を行い培地へ L-Asp、D-Asp をそれぞれ添加し、培地中へのテストステロン分泌が亢進されるか観察した。購入可能な Leydig 細胞株の細胞培養、In vitro 精子形成のアッセイでも L-Asp、D-Asp の培養液中への添加で精巣組織からのテストステロン分泌の変化を観察した。

4. 研究成果

マウス精巣組織において、1 週齢から週齢と共に D-Asp 含有量が増加することがわかった。10 週齢以降の成熟マウスにおいて D-Asp 含有量は plateau に達していた。比較対象として肝臓、腎臓でも測定を行ったが、幼若マウスから成熟マウスに至るまでの週齢においても D-Asp は全く含まれていなかった。L-Asp については出生直後より精巣、肝臓、腎臓内に含まれており、成長過程での有意な変化は認められなかった。

D-Asp の局在は免疫蛍光染色で、精細胞分化過程において精子細胞の細胞質に出現すると考えられた。成熟し放出された精子が存在する精巣上体の染色では D-Asp の蛍光は認めなかった。また精巣上体のみを抽出し液体クロマトグラフィーで定量したが D-Asp は全く検出されなかった。

D-Asp の分解酵素である DDO の活性の測定を行った。出生直後は DDO の活性は高かったが、急速に低下し性成熟を迎える 6-7 週齢ころではその活性をほぼ失っていた。この活性の減弱はウェスタンブロッティング、real-time PCR でも同様の結果が確認できた。これにより精巣機能が成熟していく過程に伴い、精巣内に D-Asp が存在できるように DDO 活性が制御されていると予想された。一方、肝臓、腎臓においては出生後より恒常的に DDO の活性は高い状態であった。DDO の存在部位を免疫染色で確認したところ、マウス精巣の Sertoli 細胞であることがわかった。

以上のことから精巣組織内での D-Asp は、精細胞の分化の過程で減数分裂を終えた精子細胞の細胞質に出現し、精子成熟に伴い Sertoli 細胞へ放出される残余小体に含まれると考えられる。一方 Sertoli 細胞では成熟マウスにおいて DDO の活性を失っており、D-Asp はその作用を受けず分解されないよう制御されている。

In vitro 精子形成において D-Asp を添加すると、濃度依存的に精子形成のマーカーである Acrosin GFP の発現が抑制された。この理由を確かめるために培養組織の染色を行うと体細胞分裂のマーカーである Phospho Histone H3 の発現が抑制されていることが確認された。これにより外因性の D-Asp は精細胞の増殖、分化に抑制的に働くと考えられる。当然のことながら同一組織においては減数分裂も認めず精子形成も確認されなかった。一方生体内の減数分裂を終えた精子細胞には D-Asp が確かに存在しており、これは分化の最終過程において精子細胞内で D-Asp が合成されていることを示す結果である。

Sertoli 細胞に放出された D-Asp の作用を確認するため、精巣間質に存在する Leydig 細胞を用いて内分泌機能の定量を行った。単離した Leydig 細胞を用いて細胞培養を行い、その培養液へ D-Asp を添加すると Leydig 細胞からのテストステロン分泌は亢進する傾向は認められたものの優位な差は得られなかった。In vitro 精子形成の手法を用いて同様に実験を行ったが、やはり優位な差は認めなかった。生体マウスへの Leydig 細胞の移植に関しては細胞の生着を認めなかった。

これらの結果から精巣内での D-Asp の挙動がある程度明らかとなった。精細胞の成熟に伴い精子細胞の細胞質において D-Asp の合成が行われ、精子の成熟のタイミングで細胞質とともにセルトリ細胞へ放出される。そこでは DDO による分解を受けず、精巣間質へ放出され Leydig 細胞に作用し StAR の発現を亢進、テストステロン合成を賦活化する。これによりさらに次の精子分化に対して正の影響を及ぼすというサイクルが推測される。いずれにせよ D-Asp は精巣内の微小構造の中で制御されその作用を発揮していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------