

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591504

研究課題名(和文)抗ミュラー管ホルモンは前思春期の精子形成を抑制する

研究課題名(英文)Effect of anti-Mullerian hormone on germ cells of maturing rat testis

研究代表者

大山 建司(KENJI, Ohyama)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：80051861

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)：抗ミュラー管ホルモン(AMH)はセルトリ細胞から分泌されライディヒ細胞機能を抑制するが、生殖細胞に対する効果は不明である。そこで、AMHとその受容体(AMHR2)の精細管内の作用を明らかにするため、抗体を用いた免疫染色、in situ hybridization、単離セルトリ細胞、生殖細胞の遺伝子発現を検討した。その結果、AMH、AMHR2をセルトリ細胞以外に精母細胞が発現していることを初めて明らかにした。AMHはAMHR2に結合し、Smad系を介して精子形成に関与していると考えられる。未成熟ラットにAMH抗体を投与すると精母細胞発現が若干進行しており、精子形成の抑制が察知された。

研究成果の概要(英文)：The expression of AMH and AMHR2 mRNA and protein was determined to clarify the effects of of AMH on germ cells. <Methods> Animal:SD rats, Germ cell isolation:collagenase digestion and percoll gradient, Quantitative real-time PCR:postnatal 5day-35day testes, In situ hybridization(Amh, Amhr2 mRNA):21D and 49D testes, Immunohistochemistry (AMH, AMHR2 antibody):10-49D testes. <Results> In situ hybridization of 21D testis, expressions of Amh and Amhr2 were observed in spermatocytes, but negative on spermatogonia. Immunohistochemical stainings of AMH and AMHR2 in 21D were observed in spermatocytes and Sertoli cells, but not spermatogonia. The staining of AMH in 49D was positive in spermatocytes and round spermatids. The staining of AMHR2 was positive in spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids. These results indicate that AMH expressed in developing germ cells is crucial molecule to lead precise spermatogenesis by binding to AMHR2 in spermatocyte and spermatids.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：抗ミュラー管ホルモン 生殖細胞 精巣 精子形成

1. 研究開始当初の背景

胎児セルトリ細胞から分泌される AMH が胎児期早期のミューラー管退縮と精巣下降に参与している事は、衆知の事実であるが(1,2)、その後胎児期から新生児期、学童期にかけて多量に分泌され、どのような機能を果たしているかは、ほとんど明らかになっていない。出生後の未成熟セルトリ細胞からの AMH 分泌は FSH により刺激されると報告されているが、FSH 分泌が少ない前思春期の方が思春期以降より AMH 分泌が亢進していることも説明がついていない。最近、AMH がライディヒ細胞の成熟とテストステロン産生を抑制することが報告された。このことは、AMH が間接的に精子形成を抑制していることを示唆している(3,4)。しかし精細管内における AMH の作用は検討されていない。

2. 研究の目的

我々は、AMH が直接精子形成に参与していると考えており、性成熟過程にあるラット精巣を用いて、AMH および AMHR2 の精巣内発現と関連遺伝子との関係を検討し、出生後の AMH の生理的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 組織学的検討

AMH の精巣内発現がセルトリ細胞のみなのかをまず再確認する。そのため、AMH と AMHR2 の特異的抗体を新たに作成した。作製した抗体は affinity column 精製した。本抗体を用いて 21 日齢、35 日齢、49 日齢精巣の免疫染色を行い、AMH、AMHR2 蛋白の発現部位を確認した。また、in situ hybridization により AMH、AMHR2 mRNA の発現部位を確認した。

(2) 精巣遊離細胞の作成

21 日齢および 49 日齢精巣をコラゲナーゼ処理し、単離した細胞をパーコール濃度勾配でセルトリ細胞と生殖細胞に分離して採取した。単離した細胞の遺伝子発現を定量 PCR で測定した。測定した遺伝子は、AMH、AMHR2 以外に、Ngfr (未成熟セルトリ細胞のマーカー)、Rhox5 (成熟セルトリ細胞のマーカー)、Scp1 (精母細胞マーカー)、Rsb1 (精子細胞マーカー)、Smad1,5,9、である。

(3) 精巣遺伝子発現の加齢変化

5,10,15,21,35 日齢精巣から RNA を抽出し、AMH、AMHR2、Ngfr、Rhox5、Scp1、Rsb1、アンドロゲン受容体 (AR)、FSH 受容体 (FSHR) を測定した。定量 PCR は総て 49 日齢精巣での発現量を基準 (1.0) とした相対発現で示した。

AMH 分泌調節機構を確認する目的で、下垂体摘出ラットに CG/FSH を投与して AMH 発現を検討した。

(4) 抗体投与

AMH、AMHR2 抗体を 6 日齢から 21 日齢まで連日皮下投与し、21 日齢精巣を摘出して、精子形成の進行度を対照ラットと組

織学的に比較した。

4. 研究成果

(1) AMH、AMHR2 mRNA 発現の性成熟期における加齢変動

ラット精巣の AMH 発現は、5 日齢で 15 倍と高発現しており、10 日齢で減少した後、21 日齢で再度 15 倍と高発現し、その後 35 日齢にかけて減少した (図 1)。これはヒトと類似した加齢変動である。AMHR2 は 5 日齢では低発現で、その後増加し 21 日齢で 1.5 倍発現する (図 2)。AMHR2 発現は 10 日齢以降に増加し始めており、出生後 10 日齢までの AMH はその効果を発現していないと考えられる。AMHR2 の発現変動は今回初めて明らかにした。アンドロゲン受容体 (AR) は 5 日齢から 35 日齢まではほぼ一定で 1.5 倍発現していた。精巣から分離したセルトリ細胞においても 5 日齢から AR が発現していることを確認した。

7-35 日齢まで HCG/FSH を皮下投与すると、対照群精巣に比し AMH 発現は早期に減少し、精子形成は進行した。21 日齢で下垂体摘出したラット精巣の AMH 発現量は 49 日齢でも 21 日齢と同等の高発現であった。このラットに HCG を 14 日間投与しテストステロン分泌を増加させても AMH 発現は減少せず、HCG/FSH 投与により減少した。この間 AMHR2 発現は大きな変動を示さなかった。この結果はテストステロンが AMH 分泌を直接抑制していないことを示している。また、FSH が AMH 分泌を刺激するという従来の報告は、FSH の直接作用ではない可能性を示唆している。

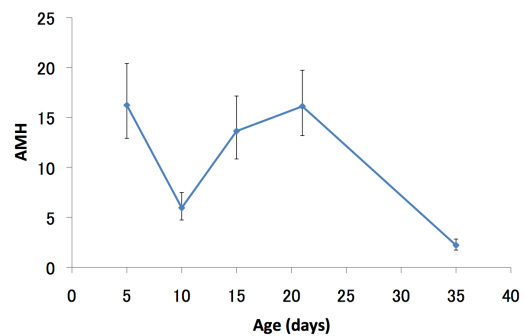


図 1 精巣 AMH 発現の加齢変化

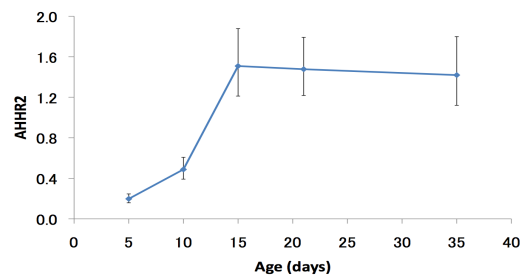


図 2 精巣 AMHR2 発現の加齢変化

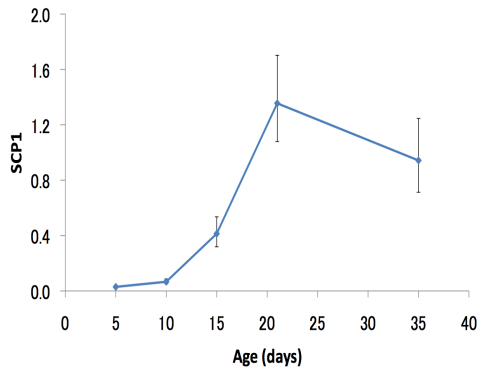


図3 精巣 Scp1 発現の加齢変化

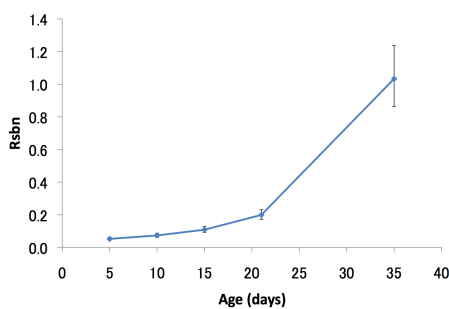


図4 精巣 Rsbm 発現の加齢変化

(2) AMH 精巣内発現と各種マーカーの発現との関連

Ngfr は5日齢で高発現しており(約8倍)、15日齢まで急速に減少し、15-35日齢は49日齢の2倍程度発現していた。Rhox5 は5日齢では発現せず10日齢以降に増加し、21日齢で49日齢相当に増加した。この結果は、15-21日齢にかけて成熟セルトリ細胞が増加するが、精巣成熟後も未成熟セルトリ細胞が存在することを示している。21-35日齢にかけて未成熟セルトリ細胞はほぼ一定に存在するにもかかわらず、AMH 発現は減少する。この間、テストステロン分泌は増加し、精巣のAR発現、FSH発現はほぼ一定であった。この結果はAMH分泌にFSH、テストステロンが直接関与している可能性が低いことを示している。これはFSHが直接AMH分泌を促進するという従来の報告とは異なり、さらなる検討が必要である。

精母細胞のマーカーであるScp1は15日齢から増加し始め21日齢で49日齢相当に増加した(図3)。円形精子細胞のマーカーであるRsbmは21日齢まで殆ど発現しておらず、21日齢ラット精巣では精子形成は精母細胞までしか進行していないことが明らかとなった(図4)。

(3) 10-21日齢精巣の in situ hybridization

と免疫染色

In situ hybridization は21日齢精巣、免疫染色は10, 15, 21日齢精巣で行った。In situ hybridization では精母細胞とセルトリ細胞でAMH, AMHR2 mRNAが陽性染色された。精粗細胞は陰性であった。10, 15日齢精巣のAMH, AMHR2免疫染色では、セルトリ細胞が陽性に染色され、精粗細胞は陰性であった。21日齢精巣では、出現し始めた精母細胞でAMH, AMHR2が強く染色され(図3,4)、セルトリ細胞も染色された。この結果は、精母細胞ではAMH, AMHR2 mRNAが発現し、蛋白が合成されていることを示している。さらに、これを確認するため、遊離生殖細胞からmRNAを抽出し、定量PCRを行い、AMH, AMHR2 mRNA発現を認めた。これは、精母細胞がAMH, AMHR2を発現していることを示す最初の報告であり、AMHがAMHR2を介して生殖細胞に作用していることが明らかとなった。

(4) 49日齢精巣のAMH, AMHR2発現

49日齢精巣は、精子形成の最終段階まで達しており、精子が形成されている。In situ hybridization では、21日齢精巣同様精母細胞で、AMH, AMHR2 mRNAが陽性に染色された。精祖細胞、精子細胞では陰性であった。免疫染色では、AMHは精母細胞と円形精子細胞が陽性で長形精子細胞は陰性であった。AMHR2は精母細胞と円形精子細胞、さらに長形精子細胞が陽性であった。精子細胞ではmRNAは発現していないことから、精母細胞で合成された蛋白が精子細胞に移行し発現していると考えられる。AMHR2は全ステージの精子細胞で発現しているが、とくにステージVIII-XIVで強く発現していた。AMHは円形精子細胞までしか発現していないことと合わせ、AMHは精子形態変化の初期の段階に関与している可能性が示唆された。

AMH-AMHR2はSmadを介して細胞内情報伝達を行っていることが報告されており、遊離生殖細胞をも地位でSmad 1,5,8の発現を検討した。49日齢生殖細胞はSmad 1,5,8を全て発現していた。

AMHが精子細胞で、Smad系を介してどのような効果を発揮しているかは不明であり、今後の検討課題である。

(5) AMHは精子形成を抑制するか

性成熟期のAMHの作用を検討する目的で、AMH, AMHR2抗体を6日齢から21日齢まで連日皮下注射し、21日齢精巣を摘出して、精子形成の進行度を対照ラットと組織学的に比較した。精巣はPAS染色した。抗体投与群の精巣では対照群に比べて精母細胞の出現が増加しており、AMHは性成熟過程の精子形成の進行を抑制していると推測された。このAMHの効果はセル

トリ細胞から分泌される AMH の効果と考えられるが、精粗細胞は AMHR2 を発現していないことから、生殖細胞への直接作用ではない。前述したライディヒ細胞の成熟とテストステロン産生に対する AMH の抑制効果によると推察している。

(6) まとめ

本研究は性成熟段階において、高濃度に分泌されている AMH が精子形成を抑制しているという仮説を立てて、実験を行った。しかし精粗細胞には AMHR2 が発現していないことから、AMH が直接精粗細胞に作用していないことが明らかとなった。抗体投与実験の結果から AMH が精子形成の進行を抑制することが示唆されたが、これはライディヒ細胞機能を介した間接作用と推測される。本実験の過程において精母細胞に AMH, AMHR2 の mRNA と蛋白が発現していることが明らかとなった。AMH と AMHR2 発現が精子形成サイクルで異なっており、AMH はパラクリン作用で精子細胞に作用していることが示された。

従来、AMH はセルトリ細胞からのみ分泌されると報告されていたが、本研究の結果精母細胞でも発現していることが明らかとなった。

<引用文献>

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, Torres G, Wallner BP, Ramachandran KL, Ragin RC, Manganaro TF, MacLaughlin DT, and Donahoe PK 1986 Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* **45**:685-698.

Vigier B, Watrin F, Magre S, Tra D, Josso N 1987 Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development* **100**:43-55

Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, Huhtaniemi I, Josso N, Di Clementi N. 1998 Receptors for Anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:549-559

Rouiller-Fabre V., Carmona S., Abo Merhi R., Cate R., Habert R. and Vigier B. (1998). Effect of anti-Müllerian hormone on Sertoli and Leydig cell function in fetal and immature rats. *Endocrinology* **139**:1213-

1220.

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 3 件)

- (1) Ohta M, Ohyama K, Asano A, Yokota S, Khalid AM, Yamano Y. Regulation of rat tetratricopeptide repeat domain 29 gene expression by follicle-stimulating hormone. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(8):1540-3. Epub 2012 Aug 7.
- (2) Khalid AM, Asano A, Hosaka YZ, Ohyama K, Ohta M, Yamano Y. Expression of a Novel Sphingosine 1-Phosphate Receptor Motif Protein Gene in Maturing Rat Testes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012; 76(9):120379-1-5.
- (3) Khalid AM, Asano A, Hosaka YZ, Ohta M, Ohyama K, Yamano Y. Rat stem cell leukemia gene expression increased during testis maturation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(11):2118-2123.

[学会発表](計 3 件)

- (1) Ohta M, Yagasaki H, Ohyama K Regulation and roles of AMH in the maturing rat testis. 9th International Joint Meeting of Pediatric Endocrinology Milano, Italy 2013.9.19-22
- (2) 大山建司, 太田正法, 田辺良子, 小林基章 抗ミューラー管ホルモンは精子形成を抑制する 第46回日本小児内分泌学会 2012.9.27-29,大阪府大阪市、大阪国際会議場
- (3) 大山建司, 田辺良子, 小林基章, 太田正法 ラット精巣における抗ミューラー管ホルモンとその受容体の発現変動 第48回日本小児内分泌学会、2014.9.25-27 静岡県浜松市、アクトシティ浜松、

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大山 建司 (OHYAMA, Kenji)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：80051861

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

太田 正法 (OHTA, Masanori)
山梨大学・総合研究部・医学研究員
研究者番号：80233146

佐野 友昭 (SANO, Tomoaki)
山梨大学・総合研究部・医学研究員
研究者番号：80447705

矢ヶ崎 英晃 (YAGASAKI, Hideaki)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：00377540