

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592447

研究課題名(和文) 男性不妊症に対する内分泌療法開発についての基礎研究

研究課題名(英文) Establishment of hormonal therapy for male infertility

研究代表者

白石 晃司 (SHIRAIISHI, Koji)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00535255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：非閉塞性無精子症(NOA)であっても内分泌療法により明らかに精巣内テストステロン(ITT)上昇を来たしうることが示されたが、spermiogenesisをはじめ精子形成促進に至適な濃度は不明であった。ITT上昇により精粗細胞のアポトーシスが促進されることはなく、その上昇によりSertoli細胞のアンドロゲンレセプター(AR)を介した精粗細胞におけるDNA合成が促進されたと考えられた。ARの発現はNOAにおいて高く、FSH製剤の使用により亢進したことより、FSHがARの発現制御に関与している可能性がある。
今後FSH製剤を中心とした内分泌療法の開発を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In patients with non-obstructive azoospermia (NOA), salvage hormonal therapy increased intratesticular testosterone (ITT) level, resulting the restraint of spermiogenesis. However, an appropriate concentration of ITT for spermatogenesis remains still unknown. Elevation of ITT also caused the increased expression of androgen receptor in Sertoli cells. This elevation was promoted by the administration of recombinant human FSH.
Based on these results, we are establishing a new protocol, mainly by using recombinant human FSH, to stimulate the spermatogenesis in NOA men.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：無精子症 内分泌療法

1. 研究開始当初の背景

不妊治療において顕微授精(intracytoplasmic sperm injection; ICSI)をはじめとする補助生殖技術の進歩は華々しいが、顕微鏡下精巣内精子採取術(micro-TESE)にて精子が採取できなかった非閉塞性無精子症(non-obstructive azoospermia; NOA)症例については治療法はない。我々はそのような患者に対しサルベージ内分泌療法(hCG/FSH療法)を行い、約20%の症例で2回目のmicro-TESEにて精子採取が可能であった(Shiraishi K. 2012)。同様な治療を行っている施設は世界中でも少なくともどのような機序で造精機能が改善するかといった臨床および基礎研究はなされていない。無精子症患者に対するhCG/FSH療法の精子形成に及ぼすメカニズムを明らかにすることによりその治療法の妥当性、治療法の改善および患者選択について大いに役立つものと考えられ、男性不妊症治療のブレイクスルーになりえる。

2. 研究の目的

NOA症例に対してサルベージ内分泌療法前後に施行されたmicro-TESE時に得られた精巣組織や精巣内fluidを用いて、精巣内の内分泌療法に伴う変化を検討する。

主に精細胞のDNA合成能や精巣内内分泌環境について、精巣のパラフィン切片や精巣内fluidを用いて検討する。

また、研究期間中に全国多施設前向き研究を行い、サルベージ内分泌療法の効果を検証する。

3. 研究の方法

NOAにてmicro-TESEにて精子採取不可能であった症例で、内分泌療法を施行し初回およびsecond micro-TESEにて精巣生検および精巣内fluid採取を施行した20例。閉塞性無精子症18例をコントロール群とした。HE染色

による組織像の評価を行い、DNA合成の指標としてproliferating cell nuclear antigen(PCNA)による免疫染色にて精粗細胞におけるPCNA-labelling index(PCNA-LI)を算出し、アポトーシスの評価としてTUNEL法を、ELISA法にて精巣内fluid中のテストステロン濃度(ITT)の測定を行った。これらの結果と患者背景や精子採取の有無との関連について検討した。

アンドロゲンレセプター(AR)はテストステロンをリガンドとし、精子形成において重要な役割を演ずる。ヒト精巣内のARの発現を検討し、サルベージ内分泌療法による発現や局在の変化について免疫組織学的に検討する。

サルベージ内分泌療法の全国多施設前向き研究としてmicro-TESEの経験の豊富な3施設(リプロダクション大阪、国際医療福祉大学、山王病院リプロダクションセンター)および山口大学泌尿器科から申し出があり、共同研究を行った。

4. 研究成果

11例にFSH製剤を併用したところ、3例(15%)においてsecond micro-TESEにて精子採取可能であった。PCNA-LIはNOA症例においてコントロール群と比較し有意に低下しており、内分泌療法により有意に増加した。特にsecond micro-TESEにて精子採取可能であった症例やFSH製剤使用症例においてはその増加は顕著であった。ITTは内分泌療法にて 274 ± 134 ng/ml から 1348 ± 505 ng/ml へ有意に増加したが、PCNA-LI、精子採取率および血清テストステロン濃度との相関は認められなかった。内分泌療法によりLeydig cell hyperplasiaが顕著となった。TUNEL陽性細胞はコントロール群、内分泌療法前後において1精細管中平均0.2個であり有意差は認められなかった。

精巣内ARの発現はSertoli細胞>>

Leydig 細胞および peritubular myoid cell に認められた。NOA においては OA に比べ有意に AR の発現が高かった。NOA において AR の発現と年齢、精巣容積、LH、FSH、血清テストステロン、Johnsen score および精子の有無との有意な相関は認められなかった。NOA において early maturation arrest において Sertoli cell only (以下、SCO) や late maturation arrest に比較し有意に AR の発現が低かった。Salvage 内分泌療法により AR の発現が、特に FSH 製剤を用いた症例において顕著に亢進した。

高用量 hCG にて NOA 症例であっても明らかに ITT 上昇を来たしうることを示されたが、spermiogenesis をはじめ精子形成促進に適な濃度は不明である。ITT 上昇により精粗細胞のアポトーシスが促進されることはなく、その上昇により Sertoli 細胞のアンドロゲンレセプターを介した精粗細胞における DNA 合成が促進されたと考えられたが、FSH 刺激も重要であることが示された。今後、early maturation arrest 症例においては FSH を中心とした内分泌療法のプロトコルを検討するとともに ITT 上昇の程度やタイミングについて再考する必要があると考えられる。AR の発現は NOA において高く、FSH 製剤の使用により亢進したことより、FSH が AR の発現制御に関与している可能性がある。

Early maturation arrest における AR の発現低下が造精機能低下の原因の 1 つである可能性もあり、FSH 製剤の使用による精子形成と AR の変化について症例を重ねて検討中である。

全国多施設共同研究においては、全ての症例において血清テストステロン上昇を認め、有害事象は認められなかった。2 例 (9%) において精子採取が可能であった。2 例の初回手術時の組織は maturation arrest であり、Sertoli cell only (SCO) の症例においてはサルベージ内分泌療法の有効性は認められ

なかった。現在の内分泌療法はある程度成熟した精細胞が存在する症例において有効であり、今後 SCO や early maturation arrest に対しては新規治療法の開発が必要である。サルベージ内分泌療法前後の精巣組織を用いた 2 次元電気泳動と N-terminal sequence によるタンパク解析にて、新規ヒストンの発現亢進を認め、九州大学エピジェネティクス研究室より報告されていた精巣特異的に発現するヒストン 3.5 (H3.5) であることが判明した。この新規ヒストンについて九州大学および早稲田大学との共同研究を開始し、その分子生物学的特長について解析中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Yuri Kato, Koji Shiraishi, Hideyasu Matsuyama. Expression of testicular androgen receptor in non-obstructive azoospermia and its change after hormonal therapy. *Andrology* 2(5), 734-740, 2014. (査読あり)
- 2) Koji Shiraishi, Hideyasu Matsuyama. Microdissection testicular sperm extraction and hormonal treatment in patients with post-chemotherapy azoospermia. *Urology* 83(1), 100-106, 2014. (査読あり)
- 3) Eriko Shinjo, Koji Shiraishi, Hideyasu Matsuyama. Effect of hormonal therapy on spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia. *Andrology* 1(6), 929-935, 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 白石晃司、松山豪泰、岩本晃明、石川智基. 非閉塞性無精子症に対するサルベージ内分泌療法の有効性に関する多施設共同研究. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 2015

年 4 月 21 日. 石川県立音楽堂ほか (石川県・金沢市)

2) 白石晃司、岡 真太郎、松山豪泰. シンポジウム: Microdissection-TESE の進歩 非閉塞性無精子症 ~ 内分泌療法に伴う精巣内の変化 ~. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会. 2014 年 12 月 4 日. 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

3) Koji Shiraishi, Tomomoto Ishikawa, Noriko Watanabe, Teruaki Iwamoto, Hideyasu Matsuyama. Salvage hormonal therapy after failed microdissection testicular sperm extraction: A multi-institutional prospective study. 70th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. 2014 年 10 月 21 日. Honolulu (USA)

4) 白石晃司、加藤優里、岡 真太郎、松山豪泰. 非閉塞性無精子症における精巣内アンドロゲンレセプターの発現と内分泌療法による変化. 日本アンドロロジー学会第 33 回学術大会. 2014 年 6 月 12-13 日. 軽井沢プリンスホテルウエスト (長野県・北佐久郡軽井沢)

5) Shiraishi K, Shinjo E, Kato Y, Matsuyama H. The effect of hormonal therapy on intratesticular testosterone level, androgen receptor expression and spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia. American Urological Association 2014. 2014 年 5 月 20 日. Orlando (USA)

6) 白石晃司. TESE とホルモン療法と spermatogenesis の基礎的知見. 第 6 回日本生殖医療研究会. 2014 年 3 月 30 日. 東京医科歯科大学水道橋校舎 13 階ホール (東京都・千代田区)

7) 白石晃司、新庄英梨子、松山豪泰. 非閉塞性無精子症に対する salvage 内分泌療法による精巣内テストステロン、精粗細胞にお

ける DNA 合成およびアポトーシスの関連. 日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会. 2013 年 7 月 26-27 日. グランキューブ大阪 (大阪府・大阪市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

白石 晃司 (SHIRAISHI, Koji)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00535255

(2) 研究分担者

なし