

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791674

研究課題名(和文) 幹細胞研究を主体とした男性不妊症の解明

研究課題名(英文) The breakthrough of male infertility by stem cell research

研究代表者

小林 秀行 (KOBAYASHI, Hideyuki)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：10408875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クラインフェルター症候群患者の精巣組織を採取し、繊維芽細胞を樹立した。センダイウイルスを用いて、Oct4, Sox2, Klf4, C-mycを導入し、iPS細胞の誘導を試みた。多能性を確認するため、in vitroおよび、in vivoにて解析をおこなった。in vivoでは、免疫不全マウスの精巣内にこられの細胞を移植し、3カ月後に奇形種の形成を確認した。in vitroにて心筋細胞への分化誘導を試みて、拍動性のもつ細胞を確認し、心筋細胞への誘導を確認した。高品質のiPS細胞の誘導に成功し、今後は、男性不妊症の疾患iPS細胞を誘導および、解析にて男性不妊症の解明を目指していきたい。

研究成果の概要(英文)：Klinefelter syndrome (KS) is associated with infertility due to non-obstructive azoospermia (NOA). The mechanism underlying NOA is still poorly understood. The generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from KS patients may be useful for studying the disease mechanism and identifying novel therapies. Cells from KS patients were transduced with Sendai viral vectors encoding four transcription factors, OCT4, SOX2, KLF4, and C-MYC, and the transduced cells were analyzed for in vitro and in vivo pluripotency. KS patient-derived iPS cells were successfully generated and shown to produce teratomas in the testes of SCID mice. In vitro cardiac differentiation of the iPS cells was confirmed by the presence of clusters of beating cells. High quality KS patient-derived iPS cells with cardiomyocyte-differentiating ability were established.

研究分野：男性不妊

キーワード：男性不妊 幹細胞 iPS

1. 研究開始当初の背景

1 匹の成熟精子でさえ、採取することが困難である非閉塞性無精子症の治療は困難であり、次世代の治療法が待ち望まれている。男性不妊症における非閉塞性無精子症は、最も難治性の疾患である。現在、非閉塞性無精子症に対する治療としては、micro TESE (顕微鏡下精巣内精子採取術) が唯一の方法であるが、精子採取率は、30%未満であり満足と言える結果ではない。我々は、micro TESE に取って変わる治療法の模索を幹細胞研究により行なってきた。

2. 研究の目的

これまでに精巣組織に含まれる精原幹細胞に着目し幹細胞研究を行なってきた。しかし、ヒト精原幹細胞の培養は困難を極める。また、精原幹細胞の証明方法は、精巣内に移植し、そこで精子形成の有無を見る必要がある。これまでに、マウスを中心に研究が行われているが、ヒトでは、倫理的に精巣内移植法はできないため、研究が立ち止まっている。そこで iPS 細胞研究に着目した。iPS 細胞は、患者自身の組織に特定の因子を導入し、ES 細胞と同様に多能性のある細胞を人工的に誘導した細胞である。男性不妊症患者から iPS 細胞を誘導し、詳細に解析することにより、精子形成のメカニズムや男性不妊症の解明を予定した。

3. 研究の方法

男性不妊症患者から採取した精巣組織をコラゲナーゼ及び DNAase 処理し、全量をプレートにまき、培養を行なう。14 日間培養を行ない、精巣由来繊維芽細胞を樹立する。その後、センダイウイルスを用いて、Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc を導入し、iPS 細胞を誘導する。さまざまな男性不妊症患者の精巣組織から iPS 細胞を誘導する。樹立した iPS 細胞からさまざまな組織分化の誘導の検討を行なった。また、非閉塞性無精子症患者からの iPS 細胞の RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて、遺伝子検索を行ない、特徴的な遺伝子の発現の状況を調べる。コントロールは閉塞性無精子症の iPS 細胞を用いる。

(1) ヒト精巣組織の採取および取り扱い

東邦大学医学部倫理委員会の承認を得て、ヒト精巣組織を実験に用いる。東邦大学医療センター大森病院リプロダクションセンターを受診する患者を対象とする。その中でも精巣生検が必要な患者に限定し、口頭および書面を用いて、採取した精巣組織の一部を研究に用いる旨の説明を行なう。同意を得た患者からの精巣組織を研究に用いる。採取した精巣組織は、HEPES 溶液または、1XHBSS 溶液に浸し、迅速に実験に用いる。

(2) ヒト精巣由来繊維芽細胞の樹立

あらかじめコラゲナーゼ処理及び DNase 処理したヒト精巣組織溶液を 10cm 0.1%ゼラチン結合 dish に全量まく。7%FBS+DMEM にて 14 日

間培養を行なう。ほぼコンフルエントになるまで培養を行ない、繊維芽細胞を樹立する。このとき、dish にゼラチン処置を行わないと、まいた細胞が凝集を起こすことをすでに前実験にて結果を得ている(未発表データ)。(3) レンチウイルスの作成およびセンダイウイルスの使用

前日に 293FT 細胞を 10cm dish 4 枚に培養し、翌日にそれぞれ、pLenti6.3/V5 Oct4, pLenti6.3/V5 Sox2, pLenti6.3/V5 Klf4, pLenti6.3/V5 c-Myc および、ViraPower Packaging Mix をトランスフェクションさせる。7%FBS・DMEM にて培養を行う。24, 48, 72 時間後の上清をレンチウイルス溶液として実験に用いる。また、センダイウイルスに iPS 細胞の誘導に必要な 4 因子を組み込んだものがコマースナルベースで販売されており、このキットも使用した。実験に用いた培養液、プレート、チップなどは、オートクレーブ処理した上で、SD ボックスに廃棄する。

(4) ヒト精巣由来繊維芽細胞への Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc の導入

樹立した精巣由来繊維芽細胞に上記の 24, 48, 72 時間後のレンチウイルス含有上清液を加える。合計 3 回、ウイルスを作用させる。作用時間は各 24 時間とする。

(5) ヒト精巣由来 iPS 細胞の誘導

ウイルス作用後、7%FBS・DMEM にて 4-5 日間の培養を行なう。その後、MEF 細胞上に、ウイルスを作用させた精巣由来繊維芽細胞を 5×10^4 /10cm dish になるようにまき直す。培養は ES 培養液および bFGF にて行なう。実験開始後より、16 日目以降より、扁平状のコロニーが出現する。22 日目くらいに、これらのコロニーをピックアップし、MEF 細胞上で、培養を続ける。培養液の交換は毎日行い、コロニーが分化しないようにする。

(6) ヒト精巣組織と ES 細胞様コロニーが同一組織である証明方法

ヒト精巣組織と培養にて出現したコロニーが同一であるかどうかを調べるために STR 法を用いる。この方法を用いることにより、精巣組織と同一の由来であることを調べることができる。

この実験は非常に重要で、ES 様細胞のコロニーがコンタミネーションでないことを証明する唯一の方法である。

(7) RT-PCR や免疫染色による ES 細胞様コロニーの遺伝子発現様式

多能性幹細胞にみられる遺伝子の発現を RT-PCR や免疫染色で調べる。RT-PCR では、Nanog, Oct4, STELLAR, GDF3, DAZL, VASA を調べる。さらに、免疫染色では、Alkaline phosphatase, Nanog, Oct4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 を染色する。

(8) ES 細胞様コロニーの in vitro および in vivo での機能解析

免疫不全マウスである 8 週齢の SCID マウスの精巣に麻酔下にて ES 細胞様コロニーを接種し、奇形腫を形成するかどうか検討する。

3ヶ月間、飼育を続ける。また、胚葉体形成を行ない、in vitroにて三胚葉に分化させる。これらの実験を行うことにより、精巣組織から誘導されたES様細胞が多能性を有するかどうか証明することができる。

(9) 精子採取が不可であった非閉塞性無精子症患者由来iPS細胞と閉塞性無精子症患者由来iPS細胞でのマイクロアレイによる遺伝子発現の違い

上記の両者の大きな違いは、成熟精子の有無である。両者のRNAをマイクロアレイにて遺伝子発現の違いを比較をすることにより、精子形成に関わる遺伝子発現の違いがみられることが予想される。これまでに、両者での精巣組織でのマイクロアレイの検討は行なわれてきたが、iPS細胞での遺伝子発現の比較は行なわれておらず、精子形成に関わる遺伝子が解明されるかもしれない。

(10) ヒト精巣由来繊維芽細胞への生殖細胞発現遺伝子の導入によるダイレクトリプログラミング法による人工生殖細胞誘導の試み

上記での方法で樹立した精巣由来繊維芽細胞にレンチウイルスを用いて VASA, DAZL, DAZ および BOULE を導入し、生殖細胞が誘導できるかどうか検討を行なう。この4つの遺伝子に着目した理由として、VASAは無精子症の患者の精巣組織では発現しておらず、生殖細胞に最も重要な遺伝子と考える。DAZL, DAZ および BOULE に関しては、ヒトES細胞に DAZL, DAZ, BOULE を強制発現させることにより、減数分裂や半数体の形成を誘導したとの報告があり (Kehkooi K et al. 2009)、生殖細胞に必須と考えるからである。iPS細胞を経由せず、直接に生殖細胞へ分化誘導するダイレクトリプログラミング法は、男性不妊症の解明や治療に対してブレイクスルーを起こすものと考えられる。しかし、この4つの遺伝子でうまくいかないことも予想され、iPS細胞の誘導に必要な4つ遺伝子をさらに導入することも試してみる。

4. 研究成果

非閉塞性無精子症であるクラインフェルター症候群の患者に micro TESE を施行した際に、精巣組織を採取し、そこから繊維芽細胞を樹立した。センダイウイルスを用いて、Oct4, Sox2, Klf4, C-myc を導入し、iPS細胞の誘導を試みた。実験開始後より、3週間後に、ES細胞によく似た扁平状のコロニーがみられ、ES細胞と同じ条件下で培養することができた。細胞の性質を調べるために、RT-PCRや免疫染色をおこない、多能性のマーカーの発現を確認した。また、多能性を確認するため、in vitro および、in vivoにて解析をおこない、invitroでは、三胚葉の分化を確認した。また、in vivoでは、免疫不全マウスの精巣内にこれらの細胞を移植し、3カ月後に奇形種の形成を確認。病理検査にて三胚葉の分化を確認した。また、in

vitroにて心筋細胞への分化誘導を試みて、実験開始より、2週間後に、拍動性のもつ細胞を確認し、心筋細胞への誘導を確認した。クラインフェルター症候群由来のiPS細胞から心筋細胞への分化は、世界でも報告がなく、我々が世界に先駆けて行なった結果である。これまでの研究にて、高品質のiPS細胞の誘導に成功し、今後は、男性不妊症の疾患iPS細胞を誘導および、解析をおこなうことにより、男性不妊症の解明を目指していきたい。

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 5 件)

1. Kobayashi H, Tai T, Nagao K, Nakajima K: The Minipig-A new tool in stem cell research. Pluripotent stem cell biology advances in mechanisms, methods and models. 査読有 vol.1 p198-209, 2014
2. 小林 秀行, 山辺 史人, 永尾 光一, 中島 耕一 泌尿器科診療ベスト NAVI 臨床泌尿器科 第67巻 増刊号 精索捻転症 査読有 p131-132, 2013
3. Kobayashi H, Nagao K, Nakajima K: Human testis-derived pluripotent cells and induced pluripotent stem-cells. Pluripotent stem cells. 査読有 Vol.1 p117-130, 2013
4. Kobayashi H, Nagao K, Nakajima K: Therapeutic advances in the field of male infertility: Stem cell research. Advances Studies in Medical Sciences 査読有 vol.1, no.1, p39-54, 2013
5. Kobayashi H, Nagao K, Nakajima K: Genetic factors of male infertility. Infertility: Genetic Factors, Treatment Risks and Benefits, Social and Psychological Consequences, Nova Sciences Publishers, 査読有 vol.1, p95-106, 2013

[学会発表](計 17 件)

1. 小林 秀行: 当院における MicroTESE の実際. 第59回日本生殖医学会学術講演会, 京王プラザホテル(東京都新宿区), 2014. 12.4
2. 小林 秀行, 田井 俊宏, 永尾 光一, 中島 耕一. 閉塞性無精子症と非閉塞性無精子症における精巣組織のDNAメチル化パターンについての検討. 第59回日本生殖医学会学術講演会, 京王プラザホテル(東京都新宿区), 2014. 12.4
3. 小林 秀行, 田井 俊宏, 永尾 光一, 中島 耕一: 精子再生への取り組み~精原幹細胞のこれからの可能性~. 第32回日本受精着床学会総会, ハイアットリー

- ジェンシー東京（東京都新宿区），2014. 8.1
4. 小林 秀行，田村 公嗣，青木 洋，中西 雄亮，齋藤 雅亨，永田 雅人，田井 俊宏，山辺 史人，田中 祝江，青木 九里，永尾 光一，中島 耕一：無精子症患者における精巣組織のゲノムワイドな DNA メチル化パターンについての検討 .第 33 回日本アンドロロジー学術総会，軽井沢プリンスホテルウエスト（長野県北佐久郡），2014. 6.12
 5. 小林 秀行，鶴木 勉，青木 洋，清水俊博，中島 陽太，田井 俊宏，永田 雅人，山辺 史人，上村 修一，田中 祝江，青木 九里，永尾 光一，中島 耕一：マイクロミニプタ由来 iPS 細胞の in vitro における組織分化の検討 .第 102 回日本泌尿器科学会総会，神戸国際会議場（兵庫県神戸市），2014. 4.24
 6. 小林秀行，小磯泰裕，鶴木勉，青木洋，清水俊博，中島陽太、永田雅人，山辺史人，上村修一，田中祝江，鈴木九里，永尾光一，中島耕一：新規治療クロミフェンおよびアロマトーゼ阻害薬併用療法における安全性 第 24 回性機能東部総会，TKP 品川コンファレンスセンター（東京都品川区），2014. 2.22
 7. 小林秀行，田井俊宏，永尾光一，中島耕一：非閉塞性無精子症患者に対するホルモン療法の検討 .第 58 回日本生殖医学会学術総会，神戸国際会議場（兵庫県神戸市），2013.11.15
 8. 小林秀行，小磯泰裕，鶴木勉，青木洋，清水俊博，中島陽太、永田雅人，山辺史人，上村修一，田中祝江，鈴木九里，永尾光一，中島耕一：センダイウイルスを用いたマイクロミニプタ iPS 細胞の誘導 .第 32 回日本アンドロロジー学術総会，グランキューブ大阪（大阪府大阪市），2013. 7.26
 9. Kobayashi H，Tai T，Nagao K，Nakajima K:Clinical application of spermatogonial stem cells and induced pluripotent stem (iPS) cells. The 14th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Sexual Medicine, ANA Crowne Plaza Kanazawa (Kanazawa, Japan), 2013.5.31(symposium)
 10. Kobayashi H，Matsui Y，Nakajima Y，Shimizu T，Aoki H，Tai T，Nagata M，Yamabe F，Kamimura S，Tanaka N，Aoki K，Nagao K，Nakajima K:Frequency of sex in Japanese men with infertility and sexual dysfunction. The 14th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Sexual Medicine, ANA Crowne Plaza Kanazawa (Kanazawa, Japan), 2013.5.31
 11. 小林秀行，松井幸英，中島陽太，岡祐輔，田井俊宏，山辺史人，高杉啓一郎，上村修一，田中祝江，鈴木九里，永尾光一，中島耕一：薬剤性誘導レンチウイルスを用いたヒト精巣由来繊維芽細胞からの iPS 細胞の誘導 .第 101 回日本泌尿器科学会総会，さっぽろ芸術文化の館(北海道札幌市)，2013. 4.28
 12. 小林秀行，田井 俊宏，尾崎 由美，永尾 光一，中島 耕一：男性不妊症および性機能障害患者における性交回数 of 検討 .第 23 回日本性機能東部総会，東北薬科大学（宮城県仙台市），2013.3.8
 13. 小林秀行，田井 俊宏，永尾光一，中島 耕一：非閉塞性無精子症患者に対する HCG 療法の試み .第 57 回日本生殖医学会学術講演会・総会，長崎ブリックホール（長崎県長崎市），2012. 11.8
 14. 小林秀行：ヒト精原幹細胞とヒト精巣組織由来 iPS 細胞について .第 31 回日本アンドロロジー学会総会，神戸国際会議場（兵庫県神戸市），2012. 6.29
 15. 小林秀行：幹細胞研究を基盤とした男性不妊症のメカニズムの解明および新規治療の開発 .第 100 回日本泌尿器科学会総会，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市），2012. 4.23
 16. 小林秀行，笠原瑞希，岡祐輔，山辺史人，高杉啓一郎，上村修一，田中祝江，鈴木九里，永尾光一，中島耕一：非閉塞性無精子症患者に対する HCG 療法による高 FSH 値の改善 .第 100 回日本泌尿器科学会総会，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市），2012. 4.23
 17. 小林秀行，胡 劍麟，田井 俊宏，尾崎由美，永尾 光一：精索静脈瘤手術と補助的生殖医療 .第 100 回日本泌尿器科学会総会，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市），2012. 4.22
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 小林 秀行:生殖医療ポケットマニュアル 医学書院 2014 男性不妊に対する治療 薬物療法 p142-144
 2. 小林 秀行:生殖医療ポケットマニュアル 医学書院 2014 勃起障害・射精障害に対する治療 p156-159
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
- 取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 秀行 (KOBAYASHI, Hideyuki)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：10408875