

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462542

研究課題名(和文) 精巣内遺伝子導入技術を用いた男性不妊症治療の新戦略

研究課題名(英文) New strategy in the male infertility treatment using gene transfer to testes

研究代表者

神谷 浩行 (Kamiya, Hiroyuki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00311910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、男性不妊症モデルラットを用い、障害を受けたSertoli細胞およびLeydig細胞における精子形成に関係する遺伝子を同定し、精巣内への遺伝子導入法を用いて障害を受けたSertoli細胞およびLeydig細胞にその遺伝子を導入し、機能解析を行うことを目的とした。

まずはSertoli細胞およびLeydig細胞の細胞分離を試みたが成功しなかった。そこで臨床検体にて高度乏精子症と閉塞性無精子症の精巣を比較検討した。その結果AMHとCK18においてSertoli細胞の染色性の違いが判明した。今後このSertoli細胞の機能解析を行うことで造精機能障害のメカニズムが解明されることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We used an experimental cryptorchid rat model as a spermatogenesis failure model, and we investigated the gene of Sertoli cell and Leydig cell involved in spermatogenesis. Next, we investigate the function of new gene in Sertoli cell and Leydig cell using the gene transfer to testes.

We tried to separate Sertoli cell and Leydig cell from the testes. But we could not separate the cells. Therefore, we investigated the testes of the male infertility patients, who were obstructive azoospermia(OA) and cryptozoospermia. To compare the function of Sertoli cells between the two groups, we performed immunohistochemical staining of anti-mullerian hormone (AMH) and cytokeratin 18 (CK18). In AMH staining of Sertoli cells, there were significant differences between the two. There were no significant differences in CK18 staining. Functional analysis of CK18- and AMH-positive Sertoli cells may facilitate the elucidation of spermatogenesis dysfunction.

研究分野：泌尿器科

キーワード：精細胞 Sertoli細胞 Leydig細胞 TM4 TM3 AMH cytokeratin18

#### 1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の治療対象は主に精細胞であったが未解決なことが多く治療として進んでいない。最近、思春期の精索静脈瘤患者において精細胞のみならず、体細胞である Sertoli 細胞および Leydig 細胞も障害が起こっていることを報告した。このことより不妊症においては精細胞のみならず、ターゲットを Sertoli 細胞および Leydig 細胞に目を向けるべきと考える。

#### 2. 研究の目的

本研究では、私たちが樹立した男性不妊症モデルラットを用い、網羅的解析により障害をうけた Sertoli 細胞および Leydig 細胞における精子形成に関連する遺伝子を同定する。ついでそれらの遺伝子を、すでに確立した精巣内への遺伝子導入法で、障害のある Sertoli 細胞および Leydig 細胞に導入し、その遺伝子の機能解析を行うことを本研究の目的とする。

#### 3. 研究の方法

精巣内における精細胞、Sertoli 細胞および Leydig 細胞を分離できるかを検討しなければならない。これには各細胞への標識マーカーの蛍光抗体を投与したうえで、精巣を摘出。ホモジナイドのうえ、フローサイトメトリーにて各細胞を回収する。この回収された細胞において各種遺伝子を測定する。

造精機能障害モデルとして以下の3パターンを作成する。

##### (1) 先天異常モデル:

フルタミド(抗アンドロゲン剤)を胎児(母体内)投与することによる停留精巣作製する。

停留精巣モデルマウスは非ステロイド性抗アンドロゲン剤である flutamide を、妊娠マウスに 15 mg/日・連日腹腔内投与し、生まれてきた仔を停留精巣モデルマウスとして用いる。(実際には約 80%の雄ラットが停留精巣モデルとなる。)

##### (2) ホルモン異常モデル:

LH-RH analogue を成獣マウスに投与することによる男性不妊症モデル作製する。

酢酸リュープロレリンを成獣マウスに皮下注射し、アンドロゲンを去勢レベルとする。こうすることで下垂体からのホルモンが抑制され、精巣自体直接刺激をすることなく造精機能低下が引き起こされる。薬剤投与後 2 ~ 3 ヶ月後に精巣を採取する。

##### (3) 精巣毒性モデル:

ブズルファンを成獣マウスに投与することによる男性不妊症モデルを作製する。

次に、各モデルマウスと正常マウスの精巣内に存在する mRNA の違いを測定する。

判明した Sertoli 細胞および Leydig 細胞の遺伝子をアデノウィルスベクター法、あるいはエレクトロポレーション法にて、男性不妊症モデル精巣に導入を試みる。この遺伝子導入で造精機能障害が改善されるかどうかを観察する。改善が得られた場合、その導入遺伝子こそが、Sertoli 細胞および Leydig 細胞に存在し、かつ造精機能に関与する遺伝子と考えられる。

#### 4. 研究成果

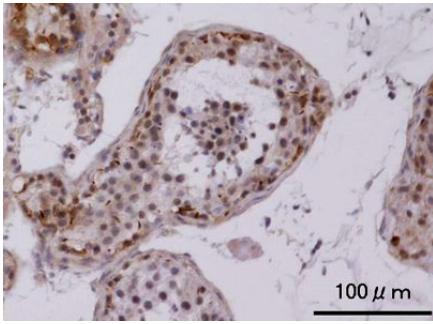
精巣内における精細胞、Sertoli 細胞および Leydig 細胞を分離を試みた。コンタミネーションの無い状態での分離は成功しなかった。

このため TM3、TM4 の培養細胞を利用して遺伝子解析を試みた。しかし既知の遺伝子以外は検出できなかった。

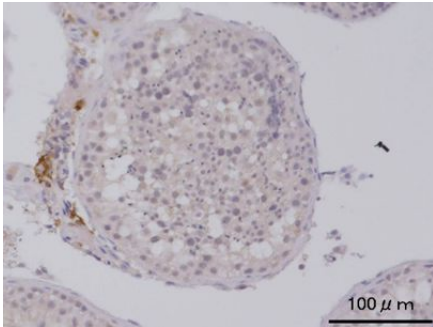
このため臨床検体に立ち返り、高度乏精子症を呈した症例と閉塞性無精子症の精巣病理検体を用いて再検討を行った。精細管の組織変化について H-E 染色および TUNEL 染色にて検討した。またセルトリ細胞の機能変化を比較するために anti mullerian hormone (AMH)、androgen receptor (AR)、cytokeratin 18 (CK18) の免疫染色を行い、両群で比較した。

Johnsen score は高度乏精子群では 2 から 7 と造精機能障害を認め、閉塞性無精子群では 8 から 10 と精子形成が認められた。TUNEL 染色では高度乏精子群では 40% で強陽性、閉塞性無精子群では 80% に強陽性を認めた。セルトリ細胞については、AMH 染色は高度乏精子群では 100% で陽性細胞を認め、閉塞性無精子群では 20% のみ陽性細胞を認めた。AR 染色は両群とも陽性細胞を認めた。CK18 染色は両群とも弱い陽性細胞を認めた。AR 染色と CK18 染色において両群間に差は認めなかった。

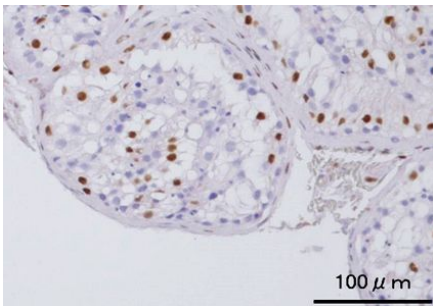
今回の結果から、造精機能障害を認める高度乏精子群において AMH 陽性細胞を認めた。CK18 および AMH は未熟なセルトリ細胞を示しているといわれている。AMH 染色の結果から高度乏精子症の原因にセルトリ細胞の未分化が原因と考えられた。CK18 での免疫染色において両群で陽性細胞の違いが無いことより、CK18 陽性セルトリ細胞と AMH 陽性セルトリ細胞では機能が異なっていると考えられた。今後この CK18 陽性と AMH 陽性のセルトリ細胞の機能解明が造精機能障害解明に繋がる可能性が示唆された。



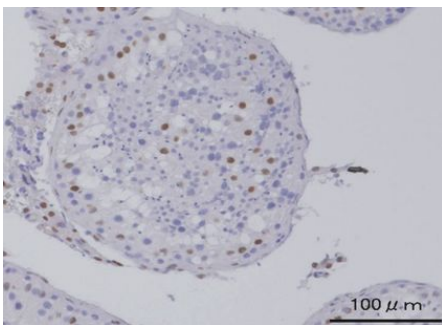
高度乏精子群：AMH 陽性



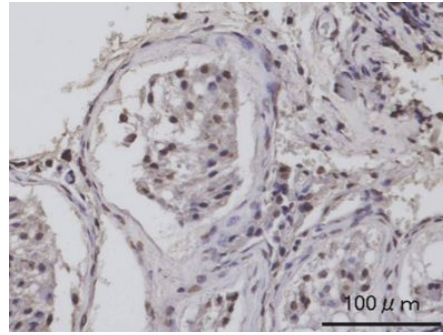
閉塞性無精子症群：AMH 陰性



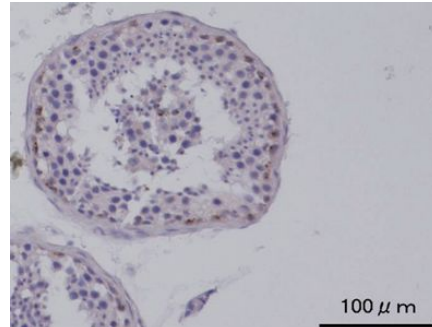
高度乏精子群：AR 陽性



閉塞性無精子症群：AR 陽性



高度乏精子群：CK18 陽性



閉塞性無精子症群：CK18 陽性

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Tomoki Takeda, Shoichiro Iwatsuki, Takashi Hamakawa, Hiroyuki Kamiya, Yukihiro Umemoto, Hiroki Kubota, Yasue Kubota, Shoichi Sasaki, Takahiro Yasui: Chromosomal anomalies and sperm retrieval rate of patients with nonobstructive azoospermia. AUA2016, 2016.5.5-10, San Diego, USA
2. 梅本 幸裕、佐々木 昌一、岩月 正一郎、武田 知樹、窪田 泰江、窪田 裕樹、神谷 浩行、田口 和己、神沢 英幸、郡 健二郎、安井 孝周：造精機能障害時におけるセルトリ細胞の機能変化について 第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台国際センター(宮城県仙台市)
3. 武田 知樹、永井 隆、梅本 幸裕、岩月 正一郎、窪田 泰江、神谷 浩行、窪田 裕樹、阪野 里花、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎、安井 孝周：高度乏精子症における精子際すの検討 第 65 回日本泌尿器科学会中部総会、2015.10.23-25、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

〔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

神谷 浩行 (KAMIYA Hiroyuki)

名古屋市立大学大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00311910

### (2) 研究分担者

郡 健二郎 (KOHRU Kenjiro)

名古屋市立大学・学長

研究者番号：30122047

佐々木 昌一 (SASAKI Shoichi)

名古屋市立大学大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50225869

梅本 幸裕 (UMEMOTO Yukihiro)

名古屋市立大学大学院医学研究科・講師

研究者番号：80381812

水野 健太郎 (MIZUNO Kentaro)

名古屋市立大学大学院医学研究科・講師

研究者番号：70448710

窪田 裕樹 (KUBOTA Hiroki)

名古屋市立大学大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10347403

小島 祥敬 (KOJIMA Yoshiyuki)

福島県立医科大学医学部・教授

研究者番号：60305539

(平成27年3月13日研究分担者より削除)