

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861436

研究課題名(和文) 精子幹細胞の機能解析による造精機能障害の発症メカニズムの解明と不妊治療への応用

研究課題名(英文) The solution of the dysfunction of the spermatogenesis using the spermatogonial stem cell function, and the application to male infertility.

研究代表者

阪野 里花 (Banno, Rika)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20600753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造精機能障害モデル動物から精子形成に関係する遺伝子に精子幹細胞関連であるUTF1遺伝子に注目した。作成したモデルラットの精巣から精子幹細胞にはUTF1陽性細胞と陰性細胞の存在が確認できた。次に、精巣停留精巣と下降精巣間でのmicroarrayを試みた。その中でKdm5aの遺伝子が高発現していることが判明した。そこで、GC-1細胞を使ってKdm5aとの共培養を試みH3K4me3の発現低下が判明した。

研究成果の概要(英文)：We made the model animal that had the dysfunction of the spermatogenesis. We investigated stem cell activity in spermatogonial stem cells (SSCs) by using the cryptorchid rat model and stem cell marker "Utf1" (undifferentiated embryonic transcription factor 1). SSCs were the UFT1 positive cell(Active form) and the UFT1 negative cell(Potential form). Next, we investigated the microarray between descended testes and undescended testes. We detected highly the Kdm5a gene. Therefore, we cultured the mouse spermatogonial cell(GC-1) and Kdm5a-Gfp expression vector. We detected lower the H3K4me3 gene by PCR and Western blotting.

研究分野：泌尿器科

キーワード：精子幹細胞 造精機能障害 男性不妊症

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の出生率低下は喫緊の課題であり、その一因である男性不妊症の治療成績を向上させることは重要である。私たちは、これまで造精機能障害をきたすモデル動物を確立し、UTF1 や TPT1 など複数の遺伝子が精子形成にかかわることを明らかにしてきた。これらの遺伝子は精子幹細胞関連遺伝子であることから、私たちは精子幹細胞と造精機能障害の関係に注目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、精子幹細胞の単離培養法を確立し、遺伝子導入により、それぞれの遺伝子の機能解析を行う。さらに造精機能障害のモデル動物精巣とヒト不妊症精巣を用い、精巣内遺伝子の発現変化を明らかにし、精子幹細胞の活性カスケードを解明する。これらのことから造精機能障害の予測因子および治療ターゲットとしての臨床応用を目標にする。

## 3. 研究の方法

以下の3工程で研究を予定した。

- (1) 造精機能障害における精子幹細胞活性の検討: 精子幹細胞活性が精細胞分化に及ぼす影響を UTF1 の発現にて検討し、造精機能障害の on-set と幹細胞の動態を解明する。
- (2) 造精機能を制御する遺伝子群の検討: PCR-Subtraction 法により造精機能障害で発現変化する遺伝子群の抽出を行い、定量 RT-PCR や免疫染色にて発現量や局在を検討する。
- (3) 精子幹細胞の培養系の確立と造精機能を制御する遺伝子群カスケードの解明: 精子幹細胞のみを取り出して純粋な培養系を確立し、上記で検討した遺伝子群につき強制発現もしくはノックダウンすることで、これらの機能解析を行う。同様の検討を停留精巣でも行う。これらの結果をヒト不妊症精巣で再検証し、造精機能障害の発症メカニズムを解明する。

### (1) 造精機能障害における精子幹細胞活性の検討

#### 停留精巣モデルラットの作成

造精機能障害を呈する代表的疾患である停留精巣のモデルラットを使用する。これまでに私たちは妊娠 S-D ラットに抗アンドロゲン剤であるフルタミドを一定期間投与することで、雄仔の 90% に停留精巣が発生することを報告している。薬剤投与による影響を検討から排除するため、いずれの検討でも片側停留精巣個体のみを扱い、対側下降精巣および薬剤未投与の正常精巣と比較検討す

ることとする。なお胎生期ならびに出生直後に、精巣の位置のみで停留精巣を判別することは曖昧さが残るため、精巣の位置、精巣導帯の付着位置や厚さ、組織像に明らかな左右差があるものを片側停留精巣と判定する。

### 精子幹細胞活性の検討

これまでの研究で、本モデルにおける組織学的な精子形成障害は、生後 9 日から生じていることが明らかになっている。そこで同日齢周囲の精巣における精子幹細胞活性を検討するためマーカーとして UTF1 を用いる。UTF1 は幹細胞機能のなかでも、自己複製能・多能性に影響していると考えられている。定量 RT-PCR・Western Blotting・免疫染色にて、停留精巣における精子幹細胞の局在および幹細胞活性の測定を行う。

### (2) 造精機能を制御する遺伝子群の検討 PCR-Subtraction 法による遺伝子群のスクリーニング

私たちは、UTF1, EEF1A1, TPT1 などの遺伝子が精子形成および精子幹細胞活性に関与することを明らかにしてきた。そこで造精機能障害にみられる遺伝子変化をより網羅的に解析するため PCR-Subtraction 法によるスクリーニングを行う。具体的には Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit を使用する。生後 9 日の停留精巣ラットの精巣から合成した double strand cDNA を tester とし、正常精巣から合成したものを driver として用いる。レーザーマイクロダイセクション・FACS などで精子幹細胞を選択的に集め核酸濃度を調節後、cDNA ライブラリーを制限酵素で切断・断片化する。ここにアダプターを付加し、サーマルサイクラーで PCR を行う。増幅された tester と driver とを hybridization させ、hybridize しなかったもののみを抽出することで tester と driver 間の発現差のある cDNA を得る。

### 候補遺伝子のクローニング

Subtraction 法で得られた cDNA をプラスミドベクターに組み込み、宿主大腸菌 (Competent cell) に transformation させ、インキュベーターで培養し増幅させる。各コロニーから DNA を抽出し、シーケンスを行いインサートの塩基配列を決定する。得られた塩基配列を元にデータベース上でホモロジー検索を行い、候補遺伝子を同定する。

(3) 精子幹細胞の培養系の確立と造精機能を制御する遺伝子群カスケードの解明

精子幹細胞の培養系の確立

ラットでは生後 9 日前後に精子幹細胞が出現する。同日齢で幹細胞の分離培養を行いたい、細胞の絶対数が少ないため、まず 4 週齢ラットの精巣を用いて培養系の確立を目指す。具体的には、摘出精巣をホモジネートし細胞を分散させる。I 型コラーゲンコートした培養皿で継代培養すると、体細胞は培地に定着するため、浮遊液中にコラーゲンと結合しない精子形成細胞を得られる。この浮遊液をラミネンコートした培養皿で培養すると、ラミネンに接着した精子幹細胞が分離され、高率に精巣幹細胞を回収できると考えている。これに各種細胞表面マーカー (6-integrin、1-integrin、c-kit、Oct4、Ngn3 等) の発現解析で幹細胞かどうかを確認する。安定した培養手技を確立し、幼若期精巣で同様の培養を行う。

候補遺伝子の発現量の確認と機能解析

下降精巣と停留精巣でそれぞれ幹細胞培養し、その 2 者間で PCR-Subtraction 法を行い、より精子幹細胞特異的な遺伝子発現変化のスクリーニングを行うとともに上記(2)で得られた遺伝子群との一致性を検討する。これらについて、精子幹細胞の培養系を用いて、目的タンパク質発現ベクターを作成し、培養細胞へ遺伝子導入させ、強制発現および siRNA を用いたノックダウンを行い、精細胞分化を検討する。なお精巣への遺伝子導入は、精細胞系とセルトリ・ライディッシュ細胞に選択的に行えるアデノウィルスベクター法を用いる。ここまで明らかとなった遺伝子についてモデルラット精巣およびヒト不妊症精巣において in situ hybridization や免疫染色を行い、臨床的な造精機能障害のマーカーとなるかを検討する。

4. 研究成果

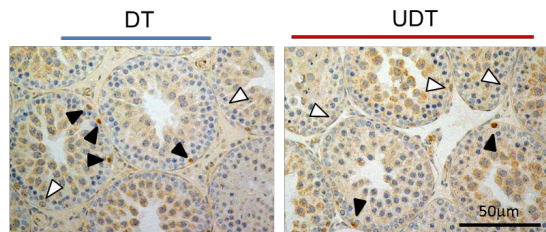
作成した停留精巣モデルラット (下写真)



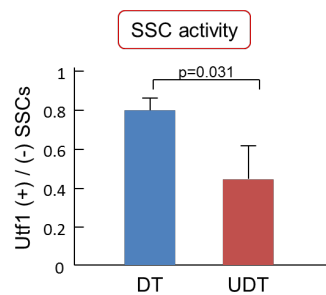
モデルラットからの精巣の検討

精子幹細胞(spermatogonial stem cells: SSC)には Utf1 陽性細胞 (Active form) と陰性細胞 (Potential form) の存在が確認できた (下図)。

【 Utf1 IHC (4 wks age) 】



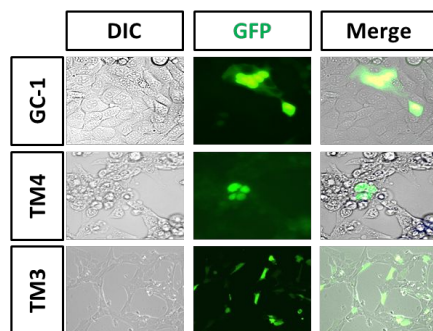
▲ : active SSC    △ : potential SSC



DT: descended testes    UDT: undescended testes

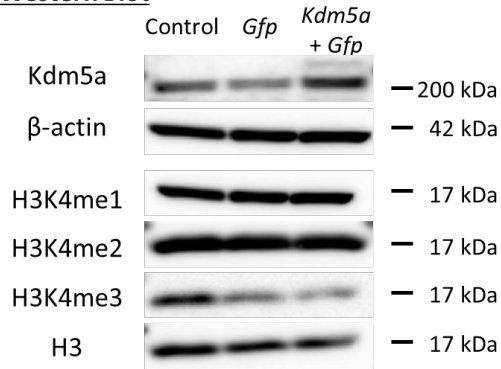
ここで精子幹細胞の機能をより正確に測定するために、精巣組織からの分離を試みた。しかし精巣組織からの純粋な分離には最終的に成功しなかった。このため精巣停留精巣と下降精巣間での microarray を試みた。その中で Kdm5a の遺伝子が高発現していることが判明した。そこで精巣組織分離できないため cell line である GC-1 細胞を使って Kdm5a との共培養を試み発現遺伝子を PCR、western blot にて確認した (下図)。

Kdm5a expression vector transfection



なし

### Western Blot



その結果、H3K4me3 の発現低下が判明した。これは Jarid1a 遺伝子に相当し、この遺伝子変化はヒストンのメチル化に関係しているため今後これらの変化を検討する予定である。

### 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1件)

1. 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採取の検討。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 他 (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

阪野 里花 (BANNO Rika)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20600763

#### (2)研究分担者

なし

#### (3)連携研究者