

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月22日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08937

研究課題名(和文) 抗癌治療後の男性生殖機能障害に対する漢方治療法の確立

研究課題名(英文) The effect of traditional medicine on busulfan- and/or irradiation-induced aspermatogenesis

研究代表者

曲寧 (QU, Ning)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70527952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：化学療法や放射線療法などの抗癌治療の副作用として精子形成障害が起こることがある。近年、抗癌治療副作用の軽減に漢方薬が注目されているが、抗癌治療後の精子形成障害の改善効果に関する報告は未だ少ない。申請者らは、抗癌剤投与或いは放射線照射後のマウス精子形成障害に対する牛車腎気丸の治療効果を調べた。抗癌剤投与や放射線照射後のマウス精子形成障害に牛車腎気丸が共に有効な治療効果をもつことが明らかとなった。また液性因子や細胞因子への影響について明らかにし、牛車腎気丸による精子形成障害の改善作用機序を明らかにした。補中益気湯および八味地黄丸による精子形成障害の改善効果も比較検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法や放射線療法による精子形成障害に対する治療は、薬剤に頼る以外に選択肢が無く、ホルモン製剤、代謝改善剤、酵素剤、そしてビタミン製剤が併用されている。その治療効果は低く、精子形成障害は難治性慢性疾患となっている。本研究で、抗癌剤投与或いは放射線照射後のマウス精子形成障害に対して、牛車腎気丸と八味地黄丸・補中益気湯が有効な治療効果を示すことを見出した。さらに抗癌治療による精子形成障害の改善作用機序への液性因子・精巣内細胞の関与を明らかにし、抗癌治療後の男性不妊症に対する漢方治療の学術的基盤を作ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Sterility is a frequent side effect in men after cancer treatment such as alkylating agents and irradiation. However, there is little information about therapy on male infertility after cancer treatment. We determined the Goshajinkigan, an oriental medicine, can recover the spermatogenesis in cancer-treatment induced infertility. Male mice were received busulfan or irradiation and then fed on the Goshajinkigan-including diet. Although the damages of spermatogenesis and the testicular immunology after busulfan- or irradiation-treatment are different, Goshajinkigan can completely cure the severe aspermatogenesis after busulfan- or irradiation-treatment in mice. The results suggest that the supplementation of TJ107 exerts a therapeutic effect on cancer-treatment induced testicular dysfunction. Furthermore, Hachimijiogan and/or Hochuekkito were already determined in busulfan-treatment induced aspermatogenesis in mice and showed the different therapeutic effect on reproductive toxicities.

研究分野：内科系臨床医学・東洋医学

キーワード：精子形成 抗癌治療 漢方薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学療法や放射線療法などの抗癌治療の副作用として精子形成障害が起こることがあり、この治療には、ホルモン製剤やビタミン製剤などが用いられるが、その治療効果は低く、精子形成障害は難治性慢性疾患となっている。近年、抗癌治療副作用の軽減に漢方薬が注目されているが、抗癌治療後の精子形成障害の改善効果に関する報告は未だない。

2. 研究の目的

漢方薬としては、牛車腎気丸の他に、補中益気湯と八味地黄丸を用い、これらの漢方薬による改善効果と作用機序について、主に、液性因子としてホルモンやサイトカイン、細胞として精巣間質マクロファージの関与について比較検討する。3つの漢方薬が、異なる作用機序で精子形成障害の改善効果を発揮している可能性も高く、これらの漢方の作用機序を明らかにすることより、新しい精子形成機構の解明に繋がる可能性も高い。

- (1) 漢方薬の抗癌治療による精子形成障害の改善効果
- (2) 漢方薬の抗癌治療による精子形成障害の改善作用機序への液性因子の関与
- (3) 漢方薬の抗癌治療による精子形成障害の改善作用機序への精巣内細胞の関与

3. 研究の方法

本研究ではブスルファンの抗癌剤治療による精子形成障害マウスモデルを用いて、漢方薬としては、牛車腎気丸と補中益気湯、八味地黄丸を用い、これらの精子形成障害の改善効果とその作用機序について明らかにする。作用機序としては、主に、液性因子としてテストステロンなどのホルモンや TNF- α などのサイトカイン、細胞としてセルトリ細胞や精巣間質マクロファージなどの関与について、漢方薬投与マウスと非投与マウスの精巣での mRNA や蛋白発現、精巣内での局在を、リアルタイム RT-PCR、ELISA、免疫組織学的解析やフローサイトメーターを用いて検討する。

(1) 抗癌治療による精子形成障害の改善効果

ブスルファン (40 mg/kg) を腹腔注射あるいは放射線 6Gy 照射したマウスにコントロール餌、3種類の漢方製剤を含有させた餌 (牛車腎気丸、八味地黄丸、補中益気湯: ヒト投薬量を体重換算して 1, 3, 5 倍を餌に含有) 自由摂食させた後に経時的に精巣を摘出し組織学的解析を行う。また漢方薬治療により回復したマウスの受精能力を調べる。

(2) 漢方薬の抗癌治療による精子形成障害の改善作用機序への液性因子の関与

精子形成改善効果のある既知の液性因子の関与: 以前の研究による TNF- α や IL-35 の精子形成への関与が示唆されたので、TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカイン発現や、逆にこれらの機能を抑制する抑制性サイトカイン IL-10 や IL-35 の発現についても同様に検討する。

精子形成改善効果のある液性因子の同定: 各群マウスの精巣から mRNA および蛋白を抽出し、マイクロアレイや 2次元電気泳動後スポット蛋白抽出と質量分析解析により差異のある分子を網羅的にスクリーニングし同定をする。

(3) 漢方薬の抗癌治療による精子形成障害の改善作用機序への精巣内細胞の関与

精子形成改善効果のある精巣間質と精細管内細胞の関与: ブスルファンを腹腔注射あるいは放射線照射したマウスの精巣から mRNA を抽出し、生殖細胞やセルトリ細胞、ライディッヒ細胞の関連遺伝子について調べる。

精子形成改善効果のある精巣間質マクロファージの関与: 精巣間質へのマクロファージ浸潤低下が精子形成改善に関与している可能性が考えられ、上記の改善効果のある漢方薬を投与群と非投与群で、精巣間質に多く存在するマクロファージなどの精巣内での浸潤細胞や常在性細胞について調べる。

4. 研究成果

(1) 抗癌治療による精子形成障害の改善効果

ブスルファンによるマウスの精子形成障害に対する牛車腎気丸の効果を精巣・精巣上体の組織学的解析により検討した。4週齢 C57BL/6j 雄マウスにブスルファンを腹腔内投与し、60日後から牛車腎気丸を含め飼料 (漢方飼料群) と牛車腎気丸を含めない通常の飼料 (通常飼料群) を60日間自由摂取させた。ブスルファン処置60日目のマウスの精巣重量は 0.041 ± 0.008 g、精巣上体の精子数は $1.575 \pm 0.308 \times 10^5$ cells であった。120日目の通常飼料群のマウスでは、精巣重量 (0.017 ± 0.0019 g) と精巣上体精子数 ($0.22 \pm 0.0189 \times 10^5$ cells) が60日目により有意に減少した。一方、120日目の漢方飼料群では、精巣重量 (0.10 ± 0.0062 g) と精巣上体精子数 ($21.68 \pm 1.705 \times 10^5$ cells) はともに有意に増加し、ノーマルマウスのレベルまでに回復した。さらに、10例中10例が自然交配により仔が生まれた。

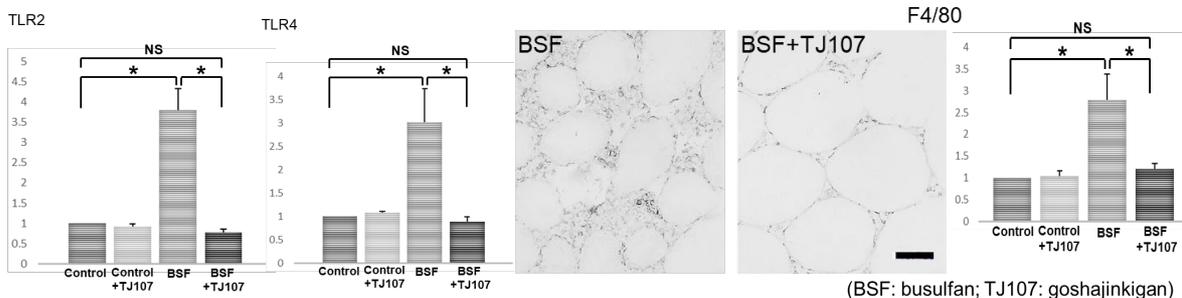
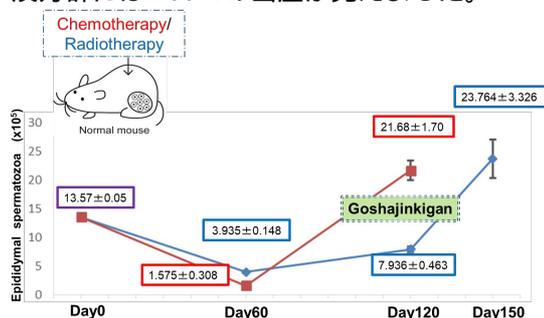
4週齢 C57BL/6j 雄マウスに放射線 6Gy を1回照射し、照射後60日から牛車腎気丸を含め飼料を与えた群 (漢方飼料群) と牛車腎気丸を含めない通常の飼料を与えた群 (通常飼料群) に分け、それぞれ60日間自由摂取させた。120日目で各群マウスの体重・精巣重量・精巣上体精子数と精巣内の細胞増殖・細胞死などを調べた。また正常雌マウスと交配させ、150日まで妊娠率と出産率を調べた。放射線照射後60日目マウスの精巣重量は減

		Control	Goshajinkigan	Irradiation	Irradiation+Goshajinkigan
epididymal	120D	19.6 \pm 1.90	26.3 \pm 2.79	3.99 \pm 0.588	8.86 \pm 0.391
spermatozoa (x 10 ⁵)	150D	22.6 \pm 0.533	25.8 \pm 0.871	3.52 \pm 0.548	23.7 \pm 2.04
birth rate		100% (10/10)	100% (10/10)	40% (4/10)	100% (10/10)

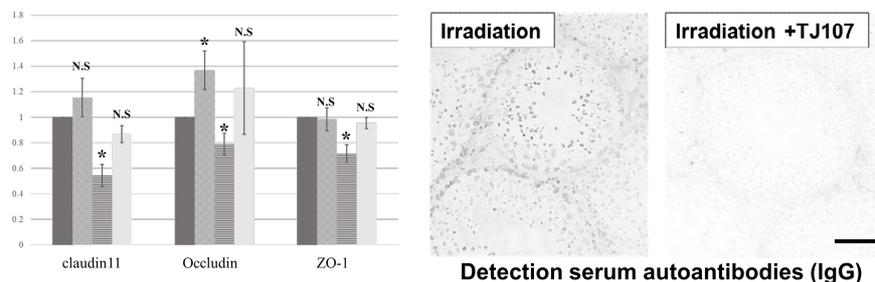
少し、120 日目には漢方群と放射線群が回復しましたが、コントロール群より有意に低下しました。120 日目漢方群の精巣上体精子数は放射線群の 2 倍になり、150 日目は劇的な回復が見られた。また、放射線群の出産率 40% に対して、漢方群には 100% の出産が見えました。

放射線照射後の精巣上体精子数の回復は 30 日の遅れがあり 150 日目ノーマルマウスのレベルまでに上昇・回復した結果より、化学療法と放射線治療による精巣の微小環境変化の機序が違うことが考えられ、二つの治療後の男性不妊に牛車腎気丸が共に有効な治療効果をもつことを明らかにした。

(2) 漢方薬の抗癌治療による精子形成障害の改善作用機序への液性因子と精巣内細胞の関与
 プスルファン処置後の生殖細胞の障害により、Toll-like receptor 2・4 の経路で精子形成を支持するセルトリ細胞のサイトカインの分泌が上昇し、これにより精巣間質にマクロファージの浸潤が増え、精巣内炎症反応により精子形成障害がさらに進む悪循環が証明された。牛車腎気丸投与による Toll-like receptor 2・4 の低下および間質のマクロファージ浸潤の低下、精細管内精子形成の回復が見られた。



一方、放射線照射マウスでは萎縮した精細管と生殖細胞に自己抗体の上昇が見られ、血液精巣関門を構成する上皮タイト結合蛋白 Claudin11 の低下が示された。牛車腎気丸群では Claudin11 の回復により生殖細胞の抗体反応が抑えられ、同時に精細管内に精子形成の回復が確認された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Qu N, Itoh M, Sakabe K. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis: The role of testicular immunology. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 22;20(4). pii: E957. doi: 10.3390/ijms20040957. Review. (査読有)

Qu N, Takahashi K, Nagahori K, Kuramasu M, Hirayanagi Y, Hayashi S, Ogawa Y, Hatayama N, Terayama H, Suyama K, Sakabe K, Itoh M. The traditional Japanese medicine Goshajinkigan makes a recovery from irradiation-induced aspermatogenesis in mice. 2019; manuscript under review.

Qu N, Kuramasu M, Hirayanagi Y, Nagahori K, Hayashi S, Ogawa Y, Terayama H, Suyama K, Naito M, Sakabe K, Itoh M. Gosha-Jinki-Gan recovers spermatogenesis in mice with busulfan-induced aspermatogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 3;19(9). pii: E2606. doi: 10.3390/ijms19092606. (査読有)

Qu N, Terayama H, Hirayanagi Y, Kuramasu M, Ogawa Y, Hayashi S, Hirai S, Naito M, Itoh M. Induction of experimental autoimmune orchitis by immunization with xenogenic testicular germ cells in mice. *J Reprod Immunol*. 2017 121: 11-16. (査読有)

Qu N, Itoh M, Terayama H, Suyama K, Sakabe K. Male infertility after anticancer treatment and oriental medicine therapy----Gosha-jinki-gan recovers the intact spermatogenesis in busulfan-induced aspermatogenesis in mice. *Jpn J Clin Ecol*. 2017 26(2):85-90. Review.

Terayama H, Hirai S, Naito M, Qu N, Katagiri C, Nagahori K, Hayashi S, Sasaki H, Moriya S, Hiramoto M, Miyazawa K, Hatayama N, Li Z, Sakabe K, Matsushita M, Itoh M. Specific autoantigens identified by sera obtained from mice that are immunized with testicular germ cells alone. *Sci Rep* 18;6:35599, 2016. doi: 10.1038/srep35599. (査読有)

Hirayanagi Y, Qu N, Hirai S, Naito M, Terayama H, Hayashi S, Hatayama N, Kuramasu M, Ogawa Y, Itoh M. Busulfan pretreatment for transplantation of rat spermatogonia differentially affects immune and reproductive systems in male recipient mice. *Anatomical Science International*. 90(4):264-74. 2015. (査読有)

Hirai S, Naito M, Kuramasu M, Ogawa Y, Terayama H, Qu N, Hatayama N, Hayashi S, Itoh M. Low-dose exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice. *Reproductive Biology*. 15(3):163-71. 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

曲寧, 倉升三幸, 永堀健太, 小川夕輝, 寺山隼人, 伊藤正裕, 坂部貢. The different effect of traditional medicine alone or in combination on busulfan-induced aspermatogenesis. 第 124 回日本解剖学会学術大会. 2019

曲寧, 伊藤正裕, 平柳淑恵, 寺山隼人, 坂部貢. Gosha-jinki-gan recover the intact spermatogenesis in busulfan-induced immunotoxicology and aspermatogenesis in mice. American-Sino Joint Meeting of Reproductive Immunology (ASRI-CSI). 2018; (国際学会)
Ning Qu, Miyuki Kuramasu, Kenta Nagahori, Shogo Hayashi, Yuki Ogawa, Hayato Terayama, Kou Sakabe and Masahiro Itoh. Gosha-jinki-gan recover the intact spermatogenesis in busulfan-induced aspermatogenesis in mice. 日本アンドロロジー学会 第 37 回学術大会. 2017

Ning Qu, Miyuki Kuramasu, Kenta Nagahori, Yoshie Hirayanagi, Shogo Hayashi, Yuki Ogawa, and Masahiro Itoh. Goshajinkigan recover the intact spermatogenesis in busulfan-induced aspermatogenesis in mice. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017

曲寧, 伊藤正裕, 寺山隼人, 永堀健太, 倉升三幸, 小川夕輝, 坂部貢. ブスルファン処置後の精巣免疫毒性と精子形成障害における牛車腎気丸の治療効果. 第24回日本免疫毒性学会学術年会. 2017

曲寧, 永堀健太, 寺山隼人, 倉升三幸, 小川夕輝, 坂部貢, 伊藤正裕. ブスルファン処置マウスの精子形成障害における牛車腎気丸の治療効果. 第 26 回日本臨床環境医学会学術集会. 2017

曲寧, 伊藤正裕, 寺山隼人, 坂部貢. ブスルファン処置マウスの精子形成障害における牛車腎気丸の治療効果 病態生理学的考察. 第 27 回日本病態生理学会大会. 2017

曲寧, 高橋薫平, 永堀健太, 倉升三幸, 平柳淑恵, 平井宗一, 林省吾, 宮宗秀伸, 小川夕輝, 伊藤正裕. 放射線処置マウスの精子形成傷害における牛車腎気丸の治療効果. 第 31 回日本生殖免疫学会学術集会. 2016

曲寧, 寺山隼人, 平井宗一, 林省吾, 畑山直之, 倉升三幸, 小川夕輝, 坂部貢, 伊藤正裕. 精巣におけるマクロファージの免疫寛容機構. 第 121 回日本解剖学会・全国学術集会. 2016; (特別講演)

Qu N, Hirayanagi Y, Hayashi S, Hirai S, Hatayama N, Kuramasu M, Ogawa Y, Naito M, Itoh M. Goshajinkigan completely recover the severe aspermatogenesis after busulfan treatment in mice. 第 120 回日本解剖学会・全国学術集会 第 20 回日本生理学会大会 合同大会. 2015

〔図書〕(計 1 件)

曲寧, 伊藤正裕. 「実践 臨床生殖免疫学 章 2. 男性不妊症と免疫—精子形成」中外医学社. 2018, 215-219. 2018003048

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊藤正裕
ローマ字氏名：ITOH, Masahiro
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：主任教授
研究者番号（8桁）：00232471

研究分担者氏名：善本隆之
ローマ字氏名：YOSHIMOTO, Takayuki
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：80202406

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。