

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10645

研究課題名(和文) 精巣内シグナル伝達機構の解明と男性不妊症の治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of signal transduction mechanism in the testis and its application to treatment of male infertility.

研究代表者

梅本 幸裕 (Umemoto, Yukihiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80381812

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)： Sertoli 細胞における機能の違いの確認のため、造精機能が低下している高度乏精子症患者と造精機能が正常である閉塞性無精子症患者の精巣組織におけるanti-mullerian hormoneの免疫染色を行った。その結果高度乏精子症において強い染色性を示した。Sertoli 細胞の機能においてanti-mullerian hormoneが関与しており可能性が示唆された。

パーコール法による細胞分離を行った。Sertoli 細胞の分離は難しいが、Leydig細胞は高率に分離することができた。

研究成果の概要(英文)： We investigated the functions of Sertoli cells in severe oligozoospermia and in a patient with obstructive azoospermia as normal spermatogenesis testis. We performed immunohistochemical staining of anti-mullerian hormone (AMH). In immunohistochemical staining of Sertoli cells, there were all positive reactions in the oligozoo group, and one positive reaction in the MESA group in AMH staining. Functional analysis of CK18- and AMH-positive Sertoli cells may facilitate the elucidation of spermatogenesis dysfunction.

Isolation is required to investigate the role of testicular somatic cells, such as Leydig and Sertoli cells, in spermatogenesis. Despite difficulty in testicular isolation of Sertoli cells using DSA lectin and Percoll, Leydig cells could be isolated efficiently.

研究分野：泌尿器科

キーワード：男性不妊症 Sertoli細胞 Leydig細胞 遺伝子導入 SCO anti Mullerian hormone パーコール法

1. 研究開始当初の背景

不妊治療を求めて海外渡航を行う夫婦、平成 22 年度の「子ども手当法」施行、社会保障充実のための消費税増税といったことは、不妊症・少子化問題が背景に存在する。少子化問題の対策と解決は国家的急務であるといえる。近年の補助生殖医療 (assisted reproductive technology; ART) 技術の発達により、不妊症に悩むカップルの挙児が達成できるようになってきた。顕微鏡下精巣内精子採取術 (microdissection testicular sperm extraction; MD-TESE) の導入により精子採取率の飛躍的向上が認められている。今までは絶対不妊といわれた病態の男性不妊症に対して、精子を採取することが可能になってきた。

しかし現実には採精できない症例が MD-TESE を施行したおよそ 50~70% に認められる。これでは治療として満足する結果とはいえない。このため ART の効率を高めることの必要性も同時に痛感していた。精巣内においては精細胞と Sertoli 細胞および Leydig 細胞の相互の働きにより精子形成が行われる。私達はこの Sertoli 細胞、Leydig 細胞の精細胞への働きを機能解析することにより、造精機能解明へのきっかけになると考えた。精巣では、Sertoli 細胞を足場として各分化段階の精細胞が存在する。しかし、その分子メカニズムの大部分は未解明であるため、無精子症の病態の多くも未解明である。このことが、ART の技術発達とは裏腹に無精子症の治療成績の向上を困難なものとしている原因の最たるものであると考えられる。

私たちはこれまで、およそ 300 人の非閉塞性無精子症患者に対して、MD-TESE を施行し、約 30% の患者から精子採取が可能であった (文献 3)。手術の際、精巣組織の一部を病理検査に供し、Sertoli cell only (SCO) syndrome、maturation arrest (MA)、hypospermatogenesis (HS) に分類してきた。

その結果、MD-TESE により精子の採取ができなくても、20% の患者の精巣組織は MA もしくは HS であり、精細胞の存在が認められた。また男性不妊症患者に対しゴナドトロピン製剤投与により精子形成が誘導されたという報告がある。このことより精子形成には精巣内の体細胞である Sertoli 細胞および Leydig 細胞の働きを改善することが必要である。

以上より 精細胞、体細胞それぞれの存在下でのオートクライン、パラクラインを調べることで造精機能障害の解明につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

男性不妊症治療においては精細胞ではなく、Sertoli 細胞および Leydig 細胞をターゲットとした治療が必要と考えた。また最近この病態を解明すべく男性不妊症モデルラットを私たちが世界で初めて樹立することに成功した。本研究では、精細胞と Sertoli 細胞および Leydig 細胞の相互のシグナル伝達経路および精子形成に関連する遺伝子を同定することを目的とする。これにより精子形成の分子メカニズムの解明と、新たな男性不妊症治療法の開発に繋げる。

3. 研究の方法

多様な細胞が混在している精巣組織から各細胞、具体的に Sertoli 細胞、Leydig 細胞、そして精細胞を分離する必要がある。これには蛍光抗体を使用してのフローサイトメトリーあるいはパーコール法による方法がある。また様々な造精機能障害モデル動物の作成も必要になる。

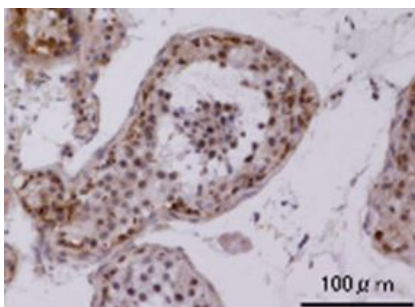
正常精巣から分離した Sertoli 細胞、Leydig 細胞をフィーダー細胞として、造精機能障害モデルの精細胞を共培養する。これにて得られる培養液中からのサイトカイン、ホルモンの測定を行い、正常精巣、造精機能障害精巣

内におけるサイトカイン、ホルモンの違いを明らかにする。また造精機能障害モデルの精巣からの Sertoli 細胞、Leydig 細胞も分離し、正常精巣からの体細胞間において網羅的に遺伝子解析を行い、この違いに關する遺伝子を検索する。これにより精細胞を“育てる”体細胞のオートクライン、パラクラインに關連する遺伝子群が同定できる。

4. 研究成果

Sertoli 細胞の機能

Sertoli 細胞における機能の違いの確認のため、造精機能が低下している高度乏精子症患者と造精機能が正常である閉塞性無精子症患者の精巣組織における免疫染色を行った。Sertoli 細胞の成熟度を確認するため、抗体として anti-mullerian hormone (AMH), androgen receptor (AR), および cytokeratin 18 (CK18)を使用した。AR および CK-18 の染色性はいずれにおいても染色性に差が認められなかった。一方で AMH については高度乏精子症において強い染色性を示した。

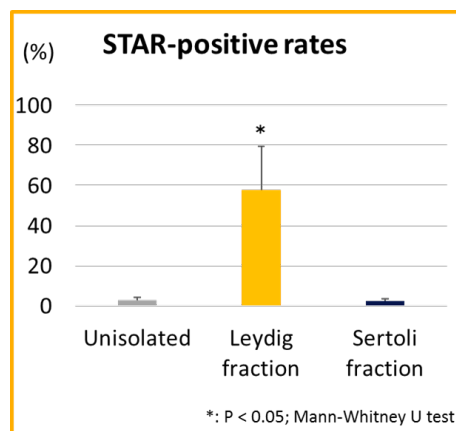


このことから Sertoli 細胞の機能において

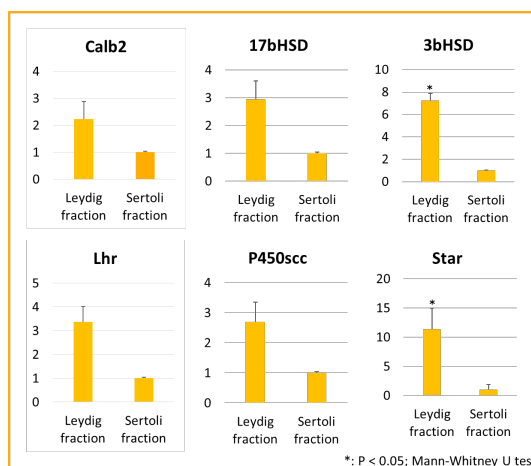
anti-mullerian hormone が關与しており可能性が示唆された。

体細胞の細胞分離

フローサイトメトリーおよび MACS による細胞分離を試みたが、一定の分離が確立しないため、パーコール法による細胞分離を行った。Leydig 細胞の確認のため免疫染色を行った。抗体としては STAR 抗体を用いた。Leydig 細胞と考えられる層には STAR 抗体陽性細胞が高率に確認できた。



次に PCR を用いて Leydig 細胞を遺伝子レベルでも確認した。



その結果体細胞である Leydig 細胞はおよそ 70% という高率に分離可能であることが判明した。一方 Sertoli 細胞の分離は同様な方法でも一定ではないことが判明した。これはどうしてもコンタミを分けることができず、結果が一定にならない。このため現在は体細胞の中でも Leydig 細胞に着目して不妊症モデルマウス作成を続けている。

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2件)

1. Iwatsuki Shoichiro, Sasaki Shoichi, Taguchi Kazumi, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Umemoto Yukihiro, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro: Effect of obesity on sperm retrieval outcome and reproductive hormone levels in Japanese azoospermic

men with and without Klinefelter syndrome. *Andrology*, 5(1):82-86, 2017(doi: 10.1111/andr.12281)

2. Nozaki Satoshi, Naiki Taku, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Iida Keitaro, Kawai Noriyasu, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro: A case of delayed radiation myelopathy of the thoracic vertebrae following low dose radiation therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urology Case Reports*, 11:66-68, 2017(doi: 10.1016/j.eucr.2017.01.005.)

〔学会発表〕(計5件)

1. Nozaki Satoshi, Takeda Tomoki, Iwatsuki Shoichiro, Hamakawa Takashi, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Kubota Hiroki, Kamiya Hiroyuki, Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro: Low sample volume cases have high sperm retrieval rates in microdissection testicular sperm extraction. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017.5.12-16, Boston, USA
2. Iwatsuki Shoichiro, Umemoto Yukihiro, Takeda Tomoki, Nozaki Satoshi, Takada Hideki, Kubota Hiroki, Itoh Yasunori, Sasaki Shoichi, Yasui Takahiro: Damage to seminiferous tubules in patients with sertoli cell only syndrome progresses with aging. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017.5.12-16, Boston, USA
3. Iwatsuki Shoichiro, Umemoto Yukihiro,

Takeda Tomoki, Nozaki Satoshi, Takada Hideki, Kubota Hiroki, Itoh Yasunori, Sasaki Shoichi, Yasui Takahiro: Damage to seminiferous tubules in patients with Sertoli cell-only syndrome progresses with aging. 第105回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市

4. Nishio Hidenori, Mizuno Kentaro, Kato Taiki, Moritoki Yoshinobu, Umemoto Yukihiro, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro: Gene function analysis of Kdm5a, a histone demethylase, in testicular dysfunction. 第105回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市
5. Takeda Tomoki, Iwatsuki Shoichiro, Hamakawa Takashi, Kamiya Hiroyuki, Umemoto Yukihiro, Kubota Hiroki, Kubota Yasue, Sasaki Shoichi, Yasui Takahiro: Chromosomal anomalies and sperm retrieval rate of patients with nonobstructive azoospermia. American Urological Association Annual Meeting 2016, 2016.5.6-10, San Diego, USA

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
梅本 幸裕 (UMEMOTO, Yukihiro)
名古屋市立大学大学院医学研究科
高度医療教育研究センター 教授
研究者番号: 80381812

(2)研究分担者

窪田 裕樹 (KUBOTA, Hiroki)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科学分野 研究員
研究者番号：10347403

佐々木 昌一 (SASAKI, Shoichi)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科学分野 研究員
研究者番号：50225869

水野健太郎 (MIZUNO, Kentaro)
名古屋市立大学大学院医学研究科
小児泌尿器科学分野 講師
研究者番号：70448710

岩月正一郎 (IWATSUKI, Shoichiro)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科学分野 研究員
研究者番号：70595397

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()