

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20103

研究課題名(和文) 男性不妊症における精子幹細胞の機能回復を目指したセルトリ細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of interaction between spermatogonial stem cell and Sertoli cell against male infertility

研究代表者

神沢 英幸 (Hideyuki, Kamisawa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00551277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：男性不妊症は我が国の喫緊の課題である。私たちはこれまでに精子幹細胞活性が将来の精子形成に影響を及ぼす可能性について報告してきた。本研究では将来に造精機能障害のリスクがある停留精巣をモデル疾患として幼少期精巣および男性不妊症精巣における精子幹細胞活性およびセルトリ細胞機能の変化を検討した。その結果、男性不妊症には先天的な精子幹細胞機能低下が生じている症例群がいることが明らかとなり、またそのような精巣では精子幹細胞活性の低下の原因としてセルトリ細胞の成熟異常により発現亢進する一連のカスケードにより精子幹細胞のアポトーシスが進行することが一因と推察された。

研究成果の概要(英文)：Male infertility is one of the most serious problem in our contry. We previously reported that spermatogonial stem cell (SSC) activity indicated future male fertility. However testicular histopathology and molecular mechanism against poor spermatogenesis were not elucidated. In this study, we performed human testicular biopsy and examined SSC funtion and Sertoli cells against risk disease of congenital male infertility. Our study showed that SSC's activity in cryptorchid testes which induced male infertility was already harmed in infant term. Moreover, in adult testes with past history of cryptorchidism might harm testicular function by SSCs activity loss, activation of apoptosis and disturbance of maturation of Sertoli cells.

研究分野：泌尿器科

キーワード：精子幹細胞 男性不妊症 停留精巣

1. 研究開始当初の背景

<本研究に関連する国内・国外の研究動向並び位置づけ>

不妊症の約半数は男性要因である。男性不妊症の約 70～90%は造精機能障害によるが、発症のメカニズムは明らかにされておらず根本的な治療法が存在しない。「造精機能障害は停留精巣、尿道下裂、精巣癌などと共通の病因を持つ」という testicular dysgenesis syndrome (TDS) 理論があり、近年いくつかの実証がされている。私たちが停留精巣を中心に TDS にかかわる研究を行ってきた。停留精巣は出生男児の 3.5%に認められ、造精機能障害をきたす代表的疾患である。私たちは停留精巣の動物モデルを開発し、本モデルおよびヒト停留精巣手術検体を用い研究を行ってきた。その結果、停留精巣の造精機能障害は、従来いわれてきた高温環境や環境ホルモンなどの外的要因のみでなく精子幹細胞活性の低下といった内在性要因が存在することを明らかにした。一方、精子形成には精子幹細胞だけでなく、精巣内の体細胞の 1 つであるセルトリ細胞が重要な役割を果たしている。セルトリ細胞は FSH やテストステロンと作用し精子形成を導く。私たちはこれまでに男性不妊症、停留精巣、尿道下裂術後患者の検討で、血清 FSH の異常高値と無精子症に相関があることを明らかにし、造精機能障害におけるセルトリ細胞の機能異常の可能性を示唆してきた。

<着想に至った経緯>

私たちは停留精巣モデルでの動物研究で、精細胞系の分化異常が出生前後の時点ですでに認められることを明らかにした⁽⁵⁾。幼若な精細胞である A 型精原細胞は、自己複製能・多能性・未分化性を保持する「精子幹細胞」として近年注目されている。精子幹細胞活性を評価するには、造精に強くかかわる精子幹細胞関連遺伝子の同定が重要だが、私たちはこれまでに UTF1、EEF1A1、TPT1 などが精子幹細胞の自己複製ならびに未分化性の維持に関わり、幹細胞活性の評価に有用なことを明らかにした^{(5) (7) (8)}。

ただし精子幹細胞は単独で精子形成できないことも知られている。その中で、私たちは停留精巣の既往をもつ男性不妊症患者の精巣ではセルトリ細胞単独症 (Sertoli Cell Only syndrome ; SCO) をしばしば認めることを臨床病理の結果からえた。すなわち停留精巣のような先天的に造精機能障害のリスクを内包する疾患の一部にはセルトリ細胞の機能異常があり、精細胞系の Apoptosis につながる可能性があるのではと着想した。

2. 研究の目的

男性不妊症はわが国の最重要案件の一つであるが、その研究・治療には改善の余地が大きい。私たちはこれまで男性不妊症の主因である停留精巣で精子幹細胞機能が低下することを明らかにしてきた。一方で精子幹細胞は単独で精子形成できず精細胞を支持するセルトリ細胞の機能も重要であることが分かっている。本研究では、これまでの成果をふまえ、ヒト精巣検体を用いて、男性不妊症での精子幹細胞の分化異常とセルトリ細胞の機能変動の関連を明らかにすることで造精機能障害の発症機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

<研究 1 > 男性不妊症モデル疾患における精細胞系分化と幹細胞活性の検討

ヒト精巣組織を用いた精子幹細胞活性の検討

私たちは将来的に造精機能障害を呈する停留精巣を男性不妊症モデル疾患と考え、動物実験を行ってきた。本研究はより実臨床に直結する結果を得るためヒト停留精巣での検討を行うこととした。

幼少期停留精巣検体を用いた先天的精子幹細胞活性の検討

私たちの施設では、病理組織学的検査目的に、小児における停留精巣の手術時に精巣組織を凍結保存している。これらを用い、ヒト

での停留精巣における精細胞系分化と A 型精原細胞の精子幹細胞活性を手術年齢ごとで検討した。コントロールとして精巣組織障害が存在しないと考えられる陰嚢水腫精巣を用いた。精子幹細胞活性を測定するマーカーとして UTF1 にて検討を行った。手術年齢による精子幹細胞活性の評価を行うことで年齢による精巣組織障害を検討した。具体的には SSC における UTF1 発現の有無や陽性・陰性細胞比などの検討は幹細胞活性の測定に重要と考える。

< 研究 2 > **成人男性不妊症における精子幹細胞機能とセルトリ細胞機能の相互関係の検討**

停留精巣の既往が成人期の精子形成に及ぼす影響の検討

男性不妊症は精路の交通不良により生ずる閉塞性無精子症と精路交通には問題がなく精子形成障害により生ずる非閉塞性無精子症が存在する。本研究では閉塞性無精子症 (OA : Obstructive Azoospermia) 患者を対象として停留精巣の既往の有無で患者群を分ける検討した。すなわち精路閉塞のみによる不妊症では精子形成自体は正常である。これに造精機能障害を呈する停留精巣の既往がある組織と精子幹細胞活性とセルトリ細胞機能の評価することで先天的に不妊症リスクを内包する精巣における異常が同定できると考えた。

成人期停留精巣における精子幹細胞活性とそれに関与するセルトリ細胞機能

男性不妊症のうち OA 患者で精巣内精子採取術 (MESA) が行われた患者を、停留精巣の既往をもつ群 (UDT 群) と既往のない群 (control 群) に分けた。両群において採取した精巣組織にて免疫染色を行い、精子幹細胞活性の評価 (UTF1)、精子幹細胞アポトーシスの評価 (Cleaved caspase 3)、幹細胞アポトーシスを惹起するセルトリ細胞異常の評

価 (FAS-L)、セルトリ細胞成熟異常の評価 (KRT18) を行った。

4 . 研究成果

精子幹細胞には活性型 (UTF1 陽性) と潜在型 (UTF1) 陰性の 2 種類が存在し、UTF1 陽性・陰性精子幹細胞比 (= 精子幹細胞活性) が将来の妊孕性予測に有用である。

研究 1 では停留精巣 (UDT 群) と陰嚢水腫精巣 (Control 群) の精子幹細胞活性について手術年齢を含め検討した。その結果、5 歳未満・5 歳以上いずれの検討においても UDT 群で有意に精子幹細胞活性が低下していることが明らかとなった。UDT 群で 5 歳未満・5 歳以上の精子幹細胞活性は有意差がなく、少なくとも 5 歳までには精子幹細胞の活性自体の障害が完成していることも明らかとなった。

研究 2 で男性不妊症モデルである停留精巣の既往を有する OA 患者の精巣組織を検討した。そこで UDT 群と Control 群の精子幹細胞活性を比較したところ、UDT 群で精子幹細胞活性が低下する傾向にあった。また UDT 群では Control 群と比較して、精子幹細胞のアポトーシスが亢進する傾向にあった。精子幹細胞のアポトーシスを誘導する物質としてセルトリ細胞から分泌される FAS-L が知られている。FAS-L の発現を UDT 群と Control 群を検討すると、UDT 群のセルトリ細胞において FAS-L が強発現していた。すなわち UDT 群ではセルトリ細胞の異常も生じていることが考えられ、その原因の一つとしてセルトリ細胞の成熟度を評価するため KRT18 (Cytokeratin 18) の発現を検討した。KRT18 (Cytokeratin 18) は未熟なセルトリ細胞に発現することが知られている。私たちは UDT 群と Control 群の比較で、UDT 群において有意に未熟なセルトリ細胞が増加していることを明らかにした。

男性不妊症は原因・病態が様々であるが、本研究により男性不妊症患者には先天的に造精機能障害のリスクを内包する集団が存在し、

そこでは精子幹細胞の機能自体が幼齢期から障害されていることが明らかとなった。それだけではなく、男性不妊症患者のなかにはセルトリ細胞の成熟異常を呈する集団があり、未熟セルトリ細胞から精子幹細胞のアポトーシスが惹起され造精機能障害に至ることも明らかとなった。

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)

Mizuno K, Nakane A, Nishio H, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Kato T, Ando R, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y. Involvement of the bone morphogenic protein/SMAD signaling pathway in the etiology of congenital anomalies of the kidney and urinary tract accompanied by cryptorchidism. BMC Urol.17:112, 2017

神沢英幸、林祐太郎：停留精巣・遊走精巣の診断および治療戦略。小児外科 49:1040-5, 2017

Nishio H, Mizuno K, Moritoki Y, Kamisawa H, Naiki T, Kurokawa S, Nakane A, Yasui T, Hayashi Y: Hemiscrotal agenesis: Pathogenesis and management strategies. Int J Urol, 23:523-6, 2016

神沢英幸：先天性および小児泌尿器疾患 停留精巣。臨床泌尿器科 69:345-8, 2015

神沢英幸：先天性および小児泌尿器疾患 非触知精巣。臨床泌尿器科 69:349-52, 2015

〔学会発表〕(計 4 件)

神沢英幸:(シンポジウム)遊走精巣の治療方針。第26回日本小児泌尿器科学会総会、2017年7月(愛知県)

神沢英幸:(シンポジウム)男性不妊症における精子幹細胞の機能異常と先天性要因の関与、日本アンドロロジー学会第35回学術集会、2016年6月(群馬県)

神沢英幸:(シンポジウム)小児陰嚢内疾患 本邦「停留精巣診療ガイドライン(2005)」が小児治療に果たしてきた役割、第24回日本小児泌尿器科学会総会、2015年7月(東京都)

神沢英幸:(シンポジウム)外来で遭遇す

る小児泌尿器疾患 -最低限これだけは知っておきたい最新情報- 停留精巣・遊走精巣、第65回日本泌尿器科学会中部総会、2015年10月(岐阜県)

〔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

神沢 英幸(KAMISAWA HIDEYUKI)
名古屋市立大学大学院医学研究科
研究員

研究者番号：00551277

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()