

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16806

研究課題名(和文) 男性不妊症治療へ向けた精巣へのin vivo及びex vivo遺伝子導入法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Gene Transfer Technique into Testis in vivo and ex vivo

研究代表者

岩月 正一郎(Iwatsuki, Shoichiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：70595397

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)：本研究では、マウス精巣への遺伝子導入技術をヒト精巣組織へ応用することを目的として、ラット精巣への遺伝子導入と、精巣の器官培養法の確立および培養組織への遺伝子導入を試みた。

ラット精巣へin vivoでの遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。しかし器官培養した精巣組織への遺伝子導入は、培養条件の設定が困難であり、十分な成果を得ることができなかった。しかし、器官培養下においては、精細管障害の進行とともに、Leydig細胞の増殖が起こることが明らかとなった。この結果については、ヒト精子形成障害の病態を解明することへの一助となる結果であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、これまでに私たちが確立したマウス精巣への遺伝子導入技術を応用し、より大型のラット精巣への遺伝子導入が可能であることを示した。さらにこの技術・条件を応用することで、ヒト精巣組織への遺伝子導入へつなぐことができると考えている。また偶発的ではあるが、精巣組織の器官培養下でLeydig細胞が増生することが明らかとなった。この過程を詳しく解明することで、未解明の部分が多い精子形成障害の病態を解明することへの、大きな一歩となると期待される。

本研究成果をもとに、より多くの不妊症患者の問題を解決することへつなげることを目標として、今後も研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Previously, we had established in vivo gene transfer technique into mouse testis. In this study, we used this technique for gene transfer into rat testis which is larger than mouse one. We also tried to organ culture of mouse testis and ex vivo gene transfer into cultured mouse testicular tissue.

We confirmed successful gene transfer into rat testis. However, ex vivo gene transfer into cultured mouse testis was hard to achieve because of difficulty in setting of culture condition.

Unexpectedly, we found that co-cultured Leydig cell line with testicular tissue resulted in significant proliferation of Leydig cells as seminiferous tubule degeneration progress. This result can provide clues as to the underlying cause of spermatogenic failure.

研究分野：男性不妊症

キーワード：男性不妊症 精子形成 遺伝子導入

## 1. 研究開始当初の背景

少子化は、わが国の最も重大な問題であり、その対策は国家的急務である。一方、わが国において不妊に悩むカップルは6組に1組とされ、少子化対策としてその治療の成績向上が課題である。

不妊症の原因の半分が男性不妊症で、その中で最も治療に難渋する非閉塞性無精子症 (nonobstructive azoospermia; NOA) に対する治療は、顕微鏡下精巣内精子採取術 (microdissection testicular sperm extraction; micro-TESE) である。しかし、micro-TESE は NOA の唯一の治療であり、その治療の限界である。したがって、NOA の治療成績を向上させるためには、micro-TESE に代わる方法や、これを補う新たな治療法の開発が望まれている。

これまで私たちは、新たな治療法開発への応用を目指して、マウス精巣に対して、*in vivo* で遺伝子を導入する方法を確立した (Umemoto et al. J Androl, 2005)。

一方、臨床面において、私たちは2004年から現在まで、NOA患者にmicro-TESEを施行してきた。その際にすべての患者に精巣生検を行い、患者の精子形成能を組織学的に評価した。その結果、非閉塞性無精子症患者の60.1%には精祖細胞が全くないため精子形成を期待するのは非常に困難と考えられた。一方で、31.2%の患者には精祖細胞は認めるものの、精子までの分化が途中で障害されている (maturation arrest) ことが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

これまでの研究結果を踏まえ、私たちは、NOA患者に対して、何らかの遺伝子導入を行うことにより、途中で分化停止している精祖細胞を精子へと分化させる、という新たな治療戦略を着想するに至った。そこで臨床応用を考え、次の2点を解決すべき問題と考えた。

- ・ 精巣容積の違い：マウス精巣容積は1mLにも満たないが、不妊症患者の精巣は数mL前後であるため、より大きな精巣への効率的な導入法の確立が必要である。
- ・ 遺伝子導入の安全性：意図しない細胞へ遺伝子が導入される可能性があるため、他の細胞や組織への影響を最小限にする導入法の確立が必要である。

そこで本研究では、より大型(約2mL)のラット精巣組織に*in vivo*で、もしくは、生体より採取した精巣組織を器官培養のうえ、*ex vivo*で遺伝子導入する実験を計画した。ヒト精巣への*in vivo*遺伝子導入を想定して、さらに大型の精巣組織に遺伝子導入するとともに、micro-TESEによりヒトから採取した組織片を想定して、ラット精巣組織を細切した組織を一定期間器官培養し、*ex vivo*で遺伝子導入する。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット精巣へのGFP発現ベクターの*in vivo*導入法の確立

CMVプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてGFPを組み込んだベクタープラスミドに、生理的に影響しない遺伝子配列をインサートしたものを作成する。

8週齢オスラットを、以下の4群に分け、

- ・ Group A: GFP発現ベクタープラスミドを導入し、電気刺激をおこなう群
- ・ Group B: 溶媒のみ注入し、電気刺激をしない群
- ・ Group C: 電気刺激のみをおこなう群
- ・ Group D: ネガティブコントロール(無処置)群

精巣に注入、精巣に矩形波電流をパルス状に流すことにより遺伝子導入を行う。

### (2) 遺伝子導入に適した精巣器官培養法の確立

臨床において施行しているmicro-TESEによる組織採取を想定して、ラット精巣より組織を採取する。採取した組織は、種々の培養液において一定期間培養後に組織片を回収する。回収した組織の組織学的変化を検討し、アポトーシスの評価を行う。用いる培養液は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、やKSR mediumの他、精巣

由来細胞（セルトリ細胞やライディッヒ細胞など）株の培養に用いる F10 medium や DMEM/F12 (1:1) medium を使用する。

### (3) 精巣組織片への ex vivo 遺伝子導入法の確立

ラット精巣より採取した組織片に GFP 発現ベクタープラスミドを遺伝子導入し、14 日間培養する。

## 4. 研究成果

### (1) ラット精巣への GFP 発現ベクターの in vivo 導入法の確立

はじめに、作成したベクタープラスミドが GFP を発現するかどうか、in vitro で遺伝子導入を行い、GFP の発現を確認した（図 1）。

次にラット精巣へ in vivo で遺伝子導入することを試みた。様々な条件を検討した結果、作成したプラスミド 50  $\mu$ g を精巣に注入し、矩形波電流、100 V、1 Hz で 18 回刺激を行う場合に最も効率が良いことがわかった。実際に導入した精巣の写真を図 2 に示す。精祖細胞、精母細胞、精子細胞の一部に GFP を発現している細胞を見ることができ、遺伝子導入されていることがわかる。

しかし、導入効率は決して高くはなく、ラット精巣への in vivo 遺伝子導入は、マウス精巣への導入と比較すると、より困難であることが明らかとなった。

### (2) 遺伝子導入に適した精巣器官培養法の確立

麻酔下にマウス精巣組織を 3mm 四方切除し、DMEM/F10 メディウムを用いて器官培養することを試みた。当初はラットの器官培養を予定していたが、今後の研究への発展を考慮して、マウス精巣で試みることにした。培養開始 0, 1, 2, 3, 5, 7 日後に組織を回収し、組織を観察した。その結果、経時的に精巣組織障害が悪化し、2 日目ごろに精細管組織の空胞化が最大となり、そ

の後は精細管組織の壊死が進行することが分かった。さらに精巣組織片の間質における細胞構成の変化が明らかとなった。代表的な組織写真を図 3 に示す。

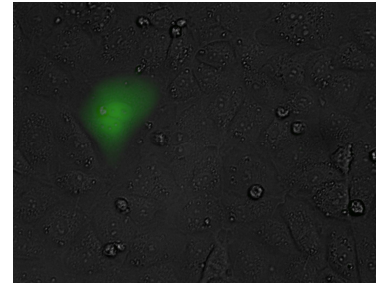


図 1 GFP 発現ベクタープラスミドの効果確認

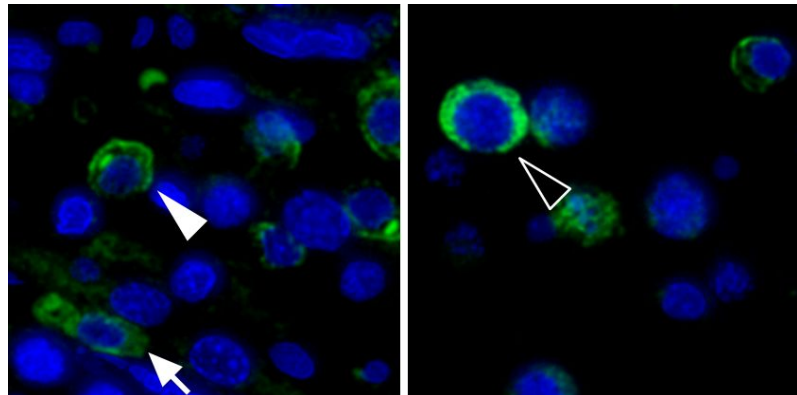


図 2 ラット精巣への in vivo 遺伝子導入 精祖細胞（矢印）、精母細胞（黒矢頭）、円形精子細胞（白矢頭）で GFP の発現が認められており、遺伝子導入されていることがわかる。青；核染色 (DAPI)、緑；GFP。

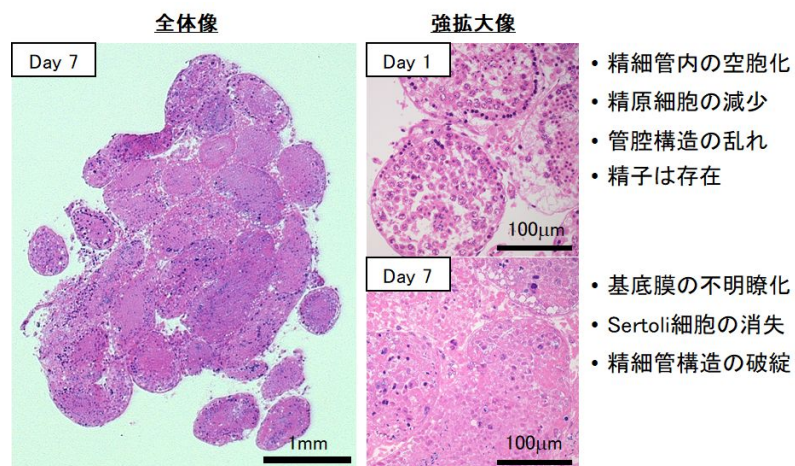


図 3 マウス精巣組織器官培養 培養開始後 1 日目、7 日目の組織所見と、特徴を示す。培養翌日から精細管の障害が生じ、7 日目には精巣構造が破綻してきていることがわかる。

さらに、この組織変化と、精巣間質における重要な細胞である、Leydig 細胞との共培養を試みた。共培養後、3、6、9 日後に Leydig 細胞数を調べた。その結果、精巣組織と Leydig 細胞を共培養したときのみ、Leydig 細胞の増殖が生じていることがわかった(図 4)。Leydig 細胞の増殖は、実臨床において不妊症の精巣組織でしばしば観察されることから、精細管の障害の際に、何らかの因子により Leydig 細胞が増殖することが示唆される。

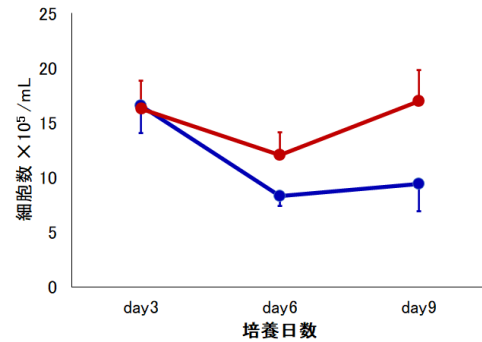


図 4 マウス精巣組織器官培養と Leydig 細胞との共培養下における Leydig 細胞の増殖培養開始後 6 日目から、精巣組織の障害とともに Leydig 細胞の増殖が生じていることがわかる。

しかしながら、マウス精巣組織の安定した器官培養系の確立は困難であることも合わせて明らかとなった。精巣組織と Leydig 細胞の共培養下における Leydig 細胞の増殖に関する知見は、本研究をすすめるうちに、予想外に得られたことである。しかし精子形成障害の病態解明に役立つ知見であるものと考えられるため、今後継続して検討を進めていく予定である。

#### 実臨床における精細管障害と間質増生の関連

実際の男性不妊症の精巣生検組織の精子形成障害と間質の炎症所見に着目し、臨床検体の検討を行った。その結果、精子形成障害の進行とともに間質への炎症細胞の浸潤が生じ、精細管の径の狭小化、基底膜の肥厚が増悪することがわかった。さらにこの組織変化は年齢とともに増悪することが明らかとなった(図 5)。これにより男性不妊症も年齢とともに増悪する可能性がある疾患であることを、臨床検体から証明することができ、社会へ男性不妊症の早期診断・早期治療の必要性を発信するエビデンスを得られることとなった。

#### (3) 精巣組織片への ex vivo 遺伝子導入法の確立

本研究では安定した精巣組織の器官培養の条件を得ることができなかった。このため本来予定していた、器官培養組織への遺伝子導入(ex vivo 遺伝子導入)の試みまで至ることが困難であった。

#### まとめ

本研究では、マウス精巣への遺伝子導入技術をヒト精巣組織へ応用することを目的として、ラット精巣への遺伝子導入と、精巣の器官培養法の確立および培養組織への遺伝子導入を試みた。

ラット精巣へ in vivo での遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。しかし器官培養した精巣組織への遺伝子導入は、培養条件の設定が困難であり、十分な成果を得ることができなかった。しかし、器官培養下においては、Leydig 細胞の増殖が起こることが、明らかとなった。この結果については、ヒト精子形成障害の病態を解明することへの一助となる結果であると考えられた。今後も研究を継続する方針である。

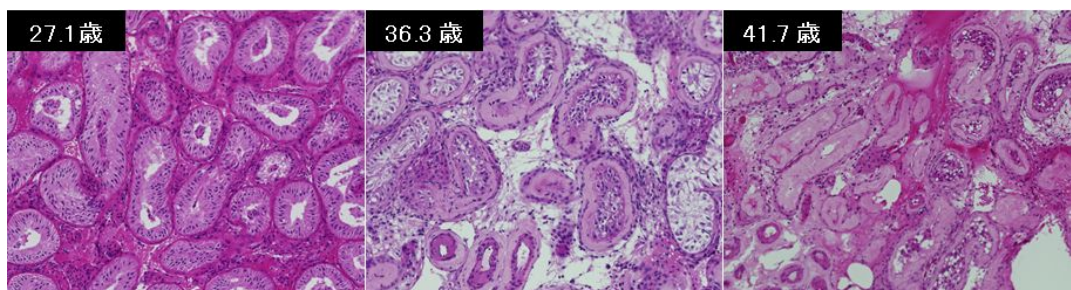


図 5 ヒトの不妊症精巣の間質の増生/細胞増殖と年齢の関連

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda T. Iwatsuki S. Hamakawa T. Mizuno K. Kamiya H. Umemoto Y. Kubota H. Kubota Y. Sasaki S. Yasui T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Chromosomal anomalies and sperm retrieval outcomes of patients with non-obstructive azoospermia: a case series.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 473-476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1111/andr.12338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Iwatsuki Shoichiro, Takeda Tomoki, Nozaki Satoshi, Kubota Hiroki, Kamiya Hiroyuki, Sasaki Shoichi, Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Decreased expression of P-type ATPase in pubertal rat cryptorchid testis and its relation to thermal environment
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwatsuki Shoichiro, Umemoto Yukihiro, Takeda Tomoki, Nozaki Satoshi, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Decreased expression of P-Type ATPases during puberty in rat cryptorchid testes and its relation to thermal environments.
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩月 正一郎、梅本 幸裕、武田 知樹、野崎 哲史、水野 健太郎、佐々木 昌一、林 祐太郎、安井 孝周
2. 発表標題 特発性非閉塞性無精子症における患者年齢と採精率の関連
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第37回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩月 正一郎、梅本 幸裕、武田 知樹、野崎 哲史、安井 孝周
2. 発表標題 無精子症患者のテストステロン活性に關与する因子
3. 学会等名 第18回日本Men's Health医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩月 正一郎、梅本 幸裕、武田 知樹、野崎 哲史、佐々木 昌一、安井 孝周
2. 発表標題 患者の年代別にみた顕微鏡下精巢内精子採取術 (Micro-TESE) の採精成績
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwatsuki Shoichiro Umemoto Yukihiro Takeda Tomoki Nozaki Satoshi Takada Hideki Kubota Hiroki Itoh Yasunori Sasaki Shoichi Yasui Takahiro
2. 発表標題 Damage to seminiferous tubules in patients with Sertoli cell-only syndrome progresses with aging.
3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwatsuki Shoichiro Umemoto Yukihiro Takeda Tomoki Nozaki Satoshi Takada Hideki Kubota Hideki Itoh Yasunori Sasaki Shoichi Yasui Takahiro
2. 発表標題 Damage to seminiferous tubules in patients with sertoli cell only syndrome progresses with aging
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩月 正一郎、梅本 幸裕、武田 知樹、野崎 哲史、水野 健太郎、林 祐太郎、佐々木 昌一、安井 孝周
2. 発表標題 無精子症患者における精細管障害の加齢変化
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第36回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩月 正一郎、佐々木 昌一、水野 健太郎、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 停留精巣において思春期に生じる精巣機能障害～モデル動物の遺伝子発現解析からの検討～
3. 学会等名 第26回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩月 正一郎、梅本 幸裕、武田 知樹、野崎 哲史、佐々木 昌一、安井 孝周
2. 発表標題 顕微鏡下精巣採取術における自科管理による腰椎麻酔の合併症
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考