

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18791116

研究課題名（和文） 精子形成細胞の死が促す新たな精子形成機構の解析

研究課題名（英文） The mechanism of spermatogenesis induced by apoptosis of germ cells

研究代表者

永長 一茂（KAZ NAGAOSA）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：70401891

研究成果の概要：セルトリ細胞によるアポトーシス精子形成細胞の貪食を阻害により精子数が減少することから、「貪食依存に発現誘導される精子形成促進因子」が存在するとの仮説を立て、この検証を試みた。その結果、アポトーシス細胞を貪食したセルトリ細胞で発現量が顕著に増加する遺伝子 A が見出された。現在、A もしくは A が発現や機能を制御する分子が精子形成を促進させるか否かを検証中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：発生・分化、細胞・組織、生体成分、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

精子は精巣内に存在する小管、精細管の中で作られる。精子のもととなる精原細胞は、自己増殖をすると共にその一部は減数分裂を伴う分化段階に入り、精細管内の管壁側から内腔側へと移動しながら精子細胞へと分化する。精子形成細胞と呼ばれるこれらの細胞群は、分化過程でその 7 割以上がアポトーシスを起こして死ぬことが知られている

が、その意義はわかっていない。

精子形成細胞の分化には、精細管内上皮細胞のセルトリ細胞の存在が必須である。培養皿上で精子形成細胞を単独で培養すると分化は進まないが、セルトリ細胞との共培養により、ある程度の分化が再現されることから明らかである。研究代表者の所属研究室ではこれまでに、精子形成細胞の分化にはセルトリ細胞との接着が必要なこと、アポトーシス精子形成細胞がセルトリ細胞により貪食

除去されること、この貪食反応を阻害すると作られる精子数が減少することを示してきた。

セルトリ細胞がアポトーシス精子形成細胞を貪食するには、生きた細胞と死んだ細胞を見分ける必要がある。アポトーシスを起こした細胞は、細胞の表層にリン脂質のホスファチジルセリン (PS) を露出させる。マクロファージなどの食細胞は細胞表面の PS を目印に生きた細胞とアポトーシス細胞を見分け、アポトーシス細胞のみを貪食する。セルトリ細胞と精子形成細胞の間にも同様な仕組みが備わっている。セルトリ細胞の場合、クラス B スカベンジャー受容体タイプ I (SR-BI) が PS と直接結合することによりアポトーシス細胞を識別して貪食することが、情報伝達経路を含め、分子レベルで明らかになっている。一方、マクロファージが PS を認識すると、抗炎症性サイトカインの TGF- β 産生を促進することが知られている。精巣において、TGF- β は精子形成を促進するといわれており、アポトーシス細胞を貪食した、或いはアポトーシス細胞表層の PS を認識したセルトリ細胞が同様な物質の発現量を制御し、精子形成を促進することが期待される。

以上の知見から、「アポトーシス細胞をセルトリ細胞が貪食することにより発現が誘導される精子形成促進因子」が存在するとの仮説を立て、これを検証しようと着想するに至った。

2. 研究の目的

新規精子形成促進機構を見つけ出して男性不妊症の治療へ繋げることが本研究の構想であり、本研究課題ではそのような因子の存在を明らかにすることを目的とした。具体的には、「アポトーシス細胞をセルトリ細胞が貪食することにより発現が誘導される精子形成促進因子」が存在するとの仮説を分子レベルで示すことを目指した。

3. 研究の方法

(1) 精子形成回復促進モデルマウスの作成

精細管内のアポトーシス精子形成細胞が精子形成を促進することを *in vivo* で明らかにするためのモデルマウスの作成を試みた。

抗がん剤のブスルファンをマウス腹腔に投与すると、8 週間後には、精細管中のほとんどの精子形成細胞が消失し、ごくわずかの精原細胞とセルトリ細胞が残るのみとなる。このまま飼育を続けると、残った精原細胞が徐々に増殖・分化を行い、12 週間後には半数程度の精細管で精子形成が回復する。回復直前の、つまり抗がん剤投与 8 週間後の精細管内に精子形成促進物質または阻害物質を注入し、傷口を縫合した動物を 4 週間飼育した。その後マウスを安楽死させて精巣を取り出し、精巣組織切片作成した。これを染色し、形態観察により、精子形成が試料試料注入特異的に促進または阻害されたかを調べた。

(2) 精子形成促進因子候補の特定

解析に十分足りる数のセルトリ細胞とアポトーシス精子形成細胞の調製が可能な、20 齢ラットを材料に以下の実験を行った。精巣より調製した初代培養セルトリ細胞とアポトーシス精子形成細胞を共培養し、アポトーシス細胞の存在特異的にセルトリ細胞で発現量が増加するタンパク質群を二次元電気泳動で探索した。質量分析によりタンパク質のアミノ酸配列を同定し、これらをコードすると予想される遺伝子群を特定した。続いて、特定した遺伝子群の発現量の変化を、半定量的 RT-PCR で調べ、アポトーシス精子形成細胞依存にセルトリ細胞で発現の増加する遺伝子、すなわち精子形成促進因子候補を特定した。

(3) 遺伝子 A のセルトリ細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの作成

セルトリ細胞特異的に目的の遺伝子を失わせる、いわゆるコンディショナルノックアウトマウスの作成を試みた。10xP 配列に

挟まれた配列は、配列特異的組換え酵素 Cre に切り取られる。この仕組みを利用するために、遺伝子 A の第一エキソンの両端に loxP 配列を持たせたマウスを作成した。続いて、セルトリ細胞特異的に発現する遺伝子 anti-müllerian hormone (AMH) のプロモーター領域およびその下流に cre 遺伝子を持つ配列を挿入したトランスジェニックマウスと同マウスを交配し、生まれた動物の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 精子形成回復促進モデルマウスの作成

ブスルファンを腹腔投与して精細管内の精子形成細胞を消失させたマウス精細管内へ、精巣毒性がすでにわかっている化学物質のブスルファンおよびピンクロゾリン、精子形成を促進すると期待した生体成分とその関連物質、サイトカインの活性化と抑制を期待した生体成分や細菌、およびその構成成分などを注入した。一定期間飼育後に安楽死させたマウスより摘出した精巣の組織切片を観察した結果、ブスルファン、ピンクロゾリン、細菌では期待通りに精子形成回復の抑制が観察された。なお、本研究の主目的からはやや外れるが、この結果が基となり、精細管内では化学物質の精巣毒性が飛躍的に高まることを明らかにした（発表論文①）。

一方、他のいずれの試料でも、精子形成回復程度の促進は観察されなかった。このことから、同動物での自発的な精子形成回復速度はすでに十分早く、例えばアポトーシス細胞を注入しても精子形成回復がこれ以上促進されることは無いと判断し、モデル動物作成は諦めた。なお、本研究の主目的からはやや外れるが、この結果が基となり、細菌が精細管内へ侵入した場合に起る免疫応答の詳細を初めて明らかにした（発表論文③）。

(2) 精子形成促進因子候補の特定

初代培養セルトリ細胞とアポトーシス精子形成細胞の共培養により、セルトリ細胞によるアポトーシス精子形成細胞の貪食が観

察された。共培養または単独培養したセルトリ細胞抽出液、およびアポトーシス精子形成細胞に対して二次元電気泳動を行った結果、共培養依存に発現量が顕著に増加する 6 種類のセルトリ細胞由来タンパク質が見出された。質量分析で同定されたこれらアミノ酸配列から予想される遺伝子の発現量変化を RT-PCR で調べたところ、遺伝子 A（未発表データにつき公表せず）がアポトーシス細胞の存在下で最も顕著に発現量を増加させることが明らかとなった。なお、本研究の主目的からはやや外れるが、これらの解析に関連して、アポトーシス細胞と食細胞が共に存在する場におけるシグナル伝達因子と転写因子の活性化の仕組みの一端を明らかにした（発表論文②）。

(3) 遺伝子 A のセルトリ細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの作成

遺伝子 A をホモで欠損するマウスは致死なので解析が行えない。そこで、Cre-loxP システムを利用してセルトリ細胞特異的に遺伝子 A を欠損する、いわゆるコンディショナルノックアウトマウスの作成を試みた。この仕組みを利用するための、遺伝子 A の第一エキソンの両端に loxP 配列を持たせたマウスの作成に成功したので、次に、セルトリ細胞特異的に発現する遺伝子 AMH のプロモーター領域およびその下流に cre 遺伝子を持つ配列を挿入したトランスジェニックマウスと同マウスを交配し、生まれた動物の解析を行った。セルトリ細胞でのみ AMH がホモで欠損していると予想されるマウス精巣組織切片を観察したところ、精細管内細胞分布、および精細管内のアポトーシス細胞存在程度には明白な違いは見られないことがわかった。しかし、同マウスのセルトリ細胞で本当に遺伝子 A が欠損しているか否かは検証できていないため、タンパク質 A が精子形成の促進には大して重要でないかは不明なままである。これを明らかにした後に遺伝子 A の精子形成への関与の有無を詳しく検証する予定である。

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 3 件)

① Nagaosa, K., Nakashima, C., Kishimoto, A., and Nakanishi, Y. Immune response to bacteria in seminiferous epithelium. *Reproduction*, 査読あり, 137, 879-888 (2009).

② Nagaosa, K., Aikoshi, I., Hasegawa, Y., and Nakanishi, Y. Activator Protein 1-Mediated Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Cultured Rat Luteal Cells. *Molecular Reproduction and Development*, 査読あり, 75, 1077-1084 (2008).

③ Nagaosa, K., Kishimoto, A., Kizu, R., Nakagawa, A., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. Perturbation of spermatogenesis by androgen antagonists directly injected into seminiferous tubules of live mice. *Reproduction*, 査読あり, 133, 21-27 (2007).

[学会発表] (計 4 件)

① 永長 一茂, 精細管内への細菌侵入時におけるケモカイン発現誘導と好中球浸潤, 日本生化学会北陸支部第 26 回大会, 2008 年 5 月 31 日, 金沢.

② 永長 一茂, 精細管内の細菌に対する免疫応答の解析, 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月 14 日, 横浜.

③ 永長 一茂, 黄体退行の機構: AP-1 によるラット黄体細胞での MCP-1 発現の誘導, 日本生化学会北陸支部第 25 回大会, 2007 年 5 月

26 日, 金沢.

④ 永長 一茂, 精細管内への微量注入法を用いた化学物質の精巣毒性評価法の開発, 第 25 回日本アンドロロジー学会学術大会, 2006 年 7 月 16 日, 山中温泉.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永長 一茂 (NAGAOSA KAZ)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 70401891

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし