

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K16706  
研究課題名（和文）男性不妊症における体細胞異常の解明と次世代に伝播しない新たな遺伝子治療への応用  
研究課題名（英文）Elucidation of somatic testicular cell abnormalities in male infertility and their application to new gene therapy  
研究代表者  
野崎 哲史（NOZAKI, SATOSHI）  
名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員  
研究者番号：50813432  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：男性不妊症における補助生殖医療技術の進歩は著しく、顕微鏡下に精巣内精子を採取する手術は標準治療となった。しかし半数以上で精子は見つからず、新たな治療法の確立が必要である。そこで、私たちは生殖細胞でなく、精巣の体細胞に着目した。その結果、ライディッヒ細胞を分離することに成功し、ホルモン異常男性不妊症モデル動物における造精機能障害のメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
本研究成果により、精巣の体細胞であるライディッヒ細胞を効率よく分離することに成功した。また、LH-RH製剤を投与したホルモン異常男性不妊症モデル動物において、精巣間質の拡大とIL-6分泌の増加を明らかにした。今後、精巣間質の主体であるライディッヒ細胞をターゲットとする治療を行うことにより、次世代に伝播しない遺伝子治療が可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：Advances in assisted reproductive technology in male infertility have made remarkable progress, and surgery to collect intratesticular sperm under a microscope has become the standard treatment. However, sperm are not found in more than half, and it is necessary to establish a new treatment method. Therefore, we focused on testicular somatic cells rather than germ cells. As a result, we succeeded in isolating Leydig cells and clarified the mechanism of sperm dysfunction in hormonally abnormal male infertility model animals.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：ライディッヒ細胞 ホルモン異常 精巣毒性

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の合計特殊出生率は、平成 17 年の 1.26 を底に、緩やかに上昇していたが、平成 28 年には再び減少に転じ、出生数は過去最低の 100 万人を下回った。少子化は、わが国の社会経済に深刻な影響を与え、その対策は国家的急務である。一方、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成績の向上が課題である。

不妊症の原因の半数が男性側にあり、その中で最も治療に難渋する非閉塞性無精子症に対して、顕微鏡下精巣内精子採取術(Microdissection testicular sperm extraction; Micro-TESE)が標準治療となっている。しかし、Micro-TESE で精子が採取できなかった場合、解決方法は他人の精子を利用する非配偶者間人工授精しかない。したがって、無精子症の治療成績を向上させるためには、Micro-TESE に代わる方法や、新たな治療法の開発が望まれる。

これまで私たちはエレクトロポレーション法により、精巣内に *in vivo* で遺伝子導入を行う技術確立してきた。その結果、マウス精巣に LacZ 遺伝子を持つベクターを導入し、*in vivo* で LacZ を発現させることに成功した。しかしこの方法は、導入した遺伝子が精細胞にも取り込まれ、次世代に伝播する恐れがあり、臨床応用するには安全ではない。そのため、精細胞ではなく、体細胞である 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。

## 2. 研究の目的

男性不妊症患者の遺伝子発現に関する研究は、精巣組織全体を用いたものが主である。精子に分化していく様々な段階の精細胞が含まれており、各段階での遺伝子発現の影響が避けられない。このため、明らかになった遺伝子発現の違いが、必ずしも男性不妊症に関わる遺伝子の違いか特定されていないのが現状である。

そこで私たちは、体細胞である Sertoli 細胞と Leydig 細胞に着目した。精巣組織全体ではなく、体細胞である Sertoli 細胞のみ Leydig 細胞のみを分離することによって、次世代に伝播しない新たな治療法へ応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 精巣組織からの Sertoli 細胞および Leydig 細胞分離・精製方法の確立

精巣組織には、体細胞である Sertoli 細胞や Leydig 細胞の他に、精細胞やマクロファージ、血管上皮細胞などが混在している。この中から Sertoli 細胞および Leydig 細胞のみを分離する。12 週齢 C57BL/6J マウスの精巣を摘出し、顕微鏡下に精巣白膜を除去した。Collagenase、DNase、Trypsin で酵素処理を行い、細胞を分離した。Pellet を 55% Percoll に 20 分間静置し、上清を 4 20000G で 90 分間超遠心、Debris を除去したものが Leydig 細胞分画として回収された。DSA(Datura Stramonium: チョウセンアサガオ) から作られた lectin は、Sertoli 細胞に特異的に結合する。55% Percoll の下層に沈降した細胞を DSA でコーティングした培地で 1 時間培養する。DSA 培地に接着したものが Sertoli 細胞分画として回収された。

各分画に目的とする細胞が回収されているか、蛍光免疫染色での陽性率と定量 PCR での遺伝子発現量を確認した。蛍光免疫染色での抗体は、SOX9(Sertoli 細胞に特異的)、Star(Leydig 細胞に特異的)を用いた。定量 PCR では、SOX9, RhoX5, ZO-1(Sertoli 細胞に特異的)、Star, Cyp11a1, 3 HSD(Leydig 細胞に特異的)、Sycp3(Germ cell に特異的)の各遺伝子に対するプライマーを設計して用いた。

### (2) 男性不妊症の病態に応じたモデルマウスの作成

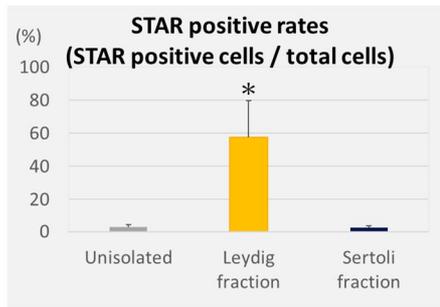
体細胞異常不妊モデル: LH-RH アナログを投与し、アンドロゲンを去勢レベルとする。こうすることで下垂体からのホルモンが抑制され、精巣自体直接刺激をすることなく Sertoli 細胞や Leydig 細胞に障害が生じる。8 週齢マウスに酢酸リユープロレリン 0.1  $\mu$ g を皮下注射し、薬剤投与後 4 週後に精巣を採取した。

### (3) 男性不妊モデルマウスにおける造精機能障害の評価

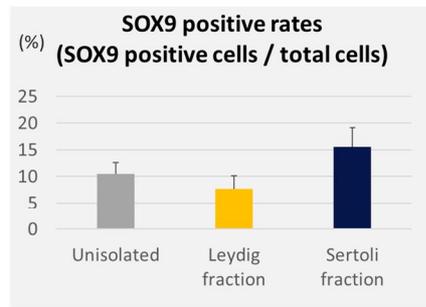
(2) で作成したモデルマウスを中心に、病理組織学的、分子生物学的評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 精巣組織からの Sertoli 細胞および Leydig 細胞分離・精製方法の確立【免疫組織化学】



STAR; Leydig cell-specific marker  
\*; P < 0.05, Mann-Whitney U test



SOX9; Sertoli cell-specific marker

##### 【qRT-PCR】



免疫組織化学の結果、Leydig 細胞分画で STAR 陽性細胞の割合が有意に高かった。また、RT-PCR の結果、3bHSD、Star の発現量が有意に増加していた。Leydig 細胞は効率よく分離することができた。

##### (2) LH-RH 投与マウスモデルの作成

精巣重量	4週	8週
Saline群	101.5 ± 1.1	103.6 ± 3.6
Leuprorelin群	79.7 ± 3.0**	81.4 ± 3.9**

精細管径	4週	8週
Saline群	182.5 ± 5.1	176.3 ± 2.2
Leuprorelin群	174.2 ± 3.5*	166.7 ± 4.1

(平均±SD, Welch T test \*; P < 0.05, \*\*; P < 0.01)

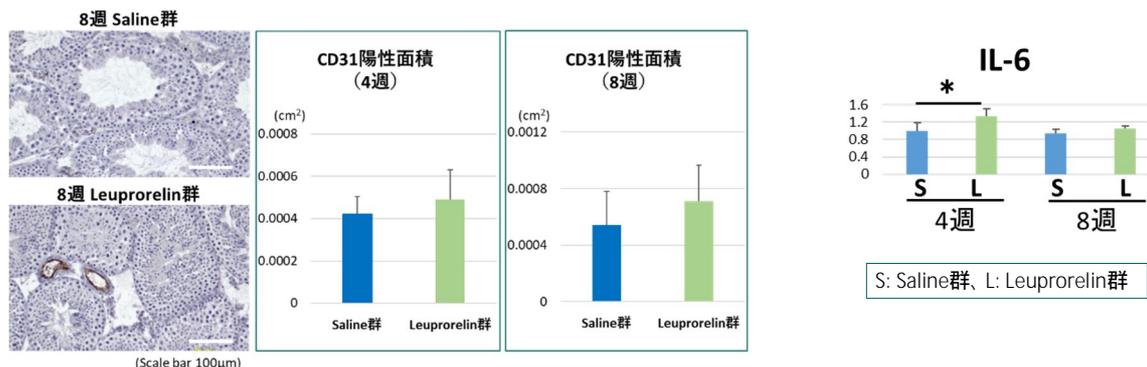
##### ステージの割合 (%)

	I - VI	VII - VIII	IX - XII	伸長精子細胞の消失
Saline群 4週	51.18	30.29	18.53	0
Leuprorelin群 4週	27.69	34.77	29.2	<b>8.3</b>
Saline群 8週	52.66	40.26	7.086	0
Leuprorelin群 8週	34.06	23.78	21.93	<b>20.2</b>

LH-RH 投与群では、精巣重量の縮小と精細管径の縮小をみとめた(上図左)。各精細管のステージを分類したところ、LH-RH 投与群で伸長精子細胞消失の割合が増加していた(上図右)。

##### (3) 男性不妊モデルマウスにおける造精機能障害の評価

間質の面積を測定したところ、LH-RH 投与群で、間質面積が拡大していた。間質の血管面積を CD31 免疫組織化学で測定したところ、CD31 陽性血管面積が増加していた(下図左)。



間質の面積の増加は、血管透過性因子の増加によるものと考え、血管透過性因子の RT-PCR を行ったところ、LH-RH 投与群で IL-6 の発現量が増加していた(上図右)。

本研究結果により、LH シグナルの抑制により、IL-6 の発現亢進をみとめ、間質の面積が拡大することが明らかとなった。現在、間質の主体である Leydig 細胞からの血管性サイトカイン分泌を解析中である。

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 Satoshi Nozaki, Taku Naiki, Aya Naiki-Ito, Shoichiro Iwatsuki, Tomoki Takeda, Toshiki Etani, Takashi Nagai, Keitaro Iida, Hiroyuki Kato, Takayoshi Suzuki, Satoru Takahashi, Yukihiro Umemoto, Takahiro Yasui	4. 巻 Nov;8(6)
2. 論文標題 Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1895-1906.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.12846.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Satoshi Nozaki, Shoichiro Iwatsuki, Tomoki Takeda, Hiroki Kubota, Hiroyuki Kamiya, Shoichi Sasaki, Yukihiro Umemoto, Takahiro Yasui
2. 発表標題 Isolation of testicular somatic cells using DSA lectin and Percoll
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 野崎 哲史、岩月 正一郎、武田 知樹、窪田 裕樹、神谷 浩行、佐々木 昌一、梅本 幸裕、安井 孝周
2. 発表標題 LHシグナルと精巣間質浮腫の関連性の検討
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Nozaki, Shoichiro Iwatsuki, Tomoki Takeda, Hiroki Kubota, Hiroyuki Kamiya, Shoichi Sasaki, Yukihiro Umemoto, Takahiro Yasui
2. 発表標題 LH signal in testis contributes to the maintenance of interstitial fluid homeostasis
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Nozaki, Shoichiro Iwatsuki, Tomoki Takeda, Hiroki Kubota, Hiroyuki Kamiya, Shoichi Sasaki, Yukihiro Uemoto, Takahiro Yasui
2. 発表標題 Isolation of testicular somatic cells using DSA lectin and Percoll
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関