

平成22年5月19日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791123
 研究課題名（和文） 停留精巣組織で特異的発現をする遺伝子群の精巣分化・発生における役割
 研究課題名（英文） The Roles of Differentially Expressed Genes in Human Cryptorchid Testes on testicular differentiation and development
 研究代表者
 水野 健太郎（MIZUNO KENTARO）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号：70448710

研究成果の概要（和文）：

妊孕性を改善するため、停留精巣に対して早期の精巣固定術が推奨されているが、早期手術を行っても前駆細胞から精原細胞への分化が障害されている症例ではその後の造精機能低下が認められる。停留精巣における生殖細胞分化プロセスを明らかにするため、特異的発現する遺伝子群の探索を行った。その結果、TPT1, EEF1A1, NuMA1 という3遺伝子を同定し、これらは精原細胞に局在することを明らかにした。これらの遺伝子は細胞増殖・分化に関わっており、こうした遺伝子変化は、将来の妊孕性の指標とできる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Purpose: In order to restore fertility, current consensus recommends early orchiopexy for cryptorchidism. Despite early orchiopexy, however, it is reported that transformation of gonocytes into adult dark spermatogonia is already impaired at the time of operation and consequently affects future fertility. To elucidate the biological processes occurring during germ cell maturation in the cryptorchid testes, we identified the genes affected by testicular maldescent using PCR-based suppression subtractive hybridization, and investigated differentially expressed genes in order to determine they are related to cell differentiation and spermatogenesis. **Materials and Methods:** Testicular tissues were excised from 24 boys who underwent orchiopexy or hydrocelectomy in our hospital (12-59 months old). Between their tissues from age-matched boys with ipsilateral cryptorchidism and descended testis, two-way subtraction was performed. Differential expression was validated by real-time RT-PCR. Furthermore, to clarify the distribution of candidate genes, immunohistochemistry and western blot analysis were performed. **Results:** We obtained 84 clones corresponding to transcripts representing differential expression. BLAST searches revealed 32 different known genes with 98-100% similarity. Among these, we further investigate three genes, TPT1, EEF1A1 and NuMA1, that were significantly more highly expressed in cryptorchidism than in descended testes, and were detected in the spermatogonia from immature to adult testes. **Conclusions:** TPT1, EEF1A1 and NuMA1 have cell growth-related functions, suggesting that they play certain roles in germ cell differentiation and maintenance of stem cell potential. Changes in the expression levels of these genes expressions in the testes might enable novel evaluation of spermatogenic failure caused by cryptorchidism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：医歯薬学

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：アンドロロジー、停留精巣、Subtraction 法、細胞分化、精子形成

1. 研究開始当初の背景

私達はこれまでに、小児泌尿器科領域、とりわけ性分化異常症などの疾患の診療に携わる傍ら、その原因についての基礎的研究を行ってきた。すなわち、始原生殖細胞からどのようにして精巣や卵巣が分化するのか、また分化した精巣組織がどのように成熟し、受精可能な精子まで発生するのか、等について下記のような検討を行ってきた。

(1) 停留精巣ラットモデルにおける精巣組織の検討(*Int J Urol*. 14: 67-72, 2007.)

(2) 性分化異常症患者性腺での SRY 遺伝子に関する分子生物学的検討(*Int. J. Urol.* 12: 673-6 2005)

(3) 尿道下裂ラットモデルを使用した尿道形成に関する検討(*J Urol*. 171: 1362-6, 2004)

(4) テストステロン遮断で作成したマウスの精子形成・性行動・妊孕性の検討(*J Urol*. 167:1532-7, 2002)

その中でも停留精巣は出生直後の頻度が 1.0~5.7%とされ、泌尿器科領域では最も頻度の高い先天異常疾患である(文献1)。たとえ思春期前に精巣固定術を行っても、片側例では 25-87%、両側例では 0-55%の妊孕率にとどまり(文献2)、男子不妊症の原因の一つとなっている。また、正常人に比べ精巣の悪性腫瘍の発生率が 15-33 倍と高いという報告もされている(文献3)。

そもそもヒト精巣は妊娠 5 週ごろから未分化生殖腺として発生が始まり、性決定の後、妊娠 28 週ごろまでに後腹壁から深鼠径輪まで下降する。その後鼠径管を通過して陰嚢内に下降するのだが、その分子的機構の全容は未だに解明されていない。これまでも、①腹腔内圧や精巣導帯による物理的な牽引、②テストステロンや黄体形成ホルモンなどの内分泌システムによる誘導、③脊髄あるいは鼠径部の神経から分泌される誘導因子など、様々な要因が精巣下降に関与することが報告されてきている。そのような中で、精巣下降に関連する遺伝子群についても近年報告が増えてきた。

すなわち、発生に関わる転写因子であるホメオボックス遺伝子の Hoxa-10・Hoxa-11(文献4)、また Leydig 細胞で産生される Insl3 遺伝子(文献5)やそのレセプターである Lgr8/Great 遺伝子(文献6)などである。ただ临床上、ヒト停留精巣症例においてこれらの遺伝子異常が報告されることは非常に稀であり、これら以外の因子の存在が推測され

ている。

また一方で研究を難しくしているのは、単一の遺伝子が精巣の下降を支配しているのではなく、複数の遺伝子によって多段階的に制御されているためと考えられる。そのため、これまでのような主にノックアウト動物を用いた機能阻害実験による解析では限界があるものと考えられる。

このような研究状況の中で、私達はアンドロゲン遮断による停留精巣モデルを樹立することに成功した。このモデル動物を用い、遺伝子の網羅的な解析により精巣下降のメカニズムを明らかにしていきたいと考えている。また当教室では、長年にわたり小児泌尿器科診療に携わる傍ら多数のヒト停留精巣組織を患者への十分な説明および承諾と、倫理委員会の承認のもとに保存している。動物実験で得られた知見をもとに、ヒト精巣でも正常との比較・解析を行っていきたく考えている。

(参考文献)

1. Berkowitz GS, et al., *Pediatrics* 92: 44-49, 1993.
2. Kogan SJ: Cryptorchidism. In: *Clinical Pediatric Urology* edited by Kelalis PP, King LR, Belman AB. WB Saunders, Philadelphia, pp1050-1083, 1992.
3. Benson RC, et al., *Proc. Mayo Clin.* 66, 372-8, 1991.
4. Satokata I, et al., *Nature* 374: 460-3, 1995.
5. Nef S, et al., *Nat Genet*, 22: 295-9, 1999.
6. Ivell R, Bathgate RA. *Biol Reprod.* 67: 699-705, 2002.

2. 研究の目的

停留精巣に早期手術を施しても造精機能障害に陥る症例が存在するが、その原因は明らかでない。私達はヒト停留精巣で A 型精原細胞が減少していることに着目し、停留精巣では前駆細胞から幹細胞への分化異常が起きるため、幹細胞が将来にわたって維持されないのではと考えた。この仮説を検証するために、本研究ではヒト停留精巣組織に特異的発現する遺伝子を探索し、精原細胞の特性を解明するとともに、これらが精子形成や細胞分化に関与するかどうか検討を行った。

3. 研究の方法

停留精巣(15例、生後12~59ヶ月)と対

照群として精巣水腫（9例、生後21～59ヶ月）の精巣組織を手術時に同意を得て採取した。各々からmRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成した後、Subtraction法を用い、両群間で発現差を示す遺伝子を同定した。得られた遺伝子の発現量を定量RT-PCRで確認し、有意差を認めた遺伝子について免疫組織化学・Western blotting法により、精巣組織での局在と発現量を検討した。尚、本研究は学内ヒト遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

4. 研究成果

発現差を示す32個の遺伝子を同定した。

(1) 18 higher expressed genes

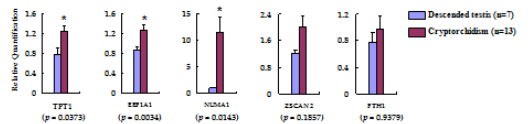
Gene symbol	Gene name	Function	Accession No.
TPT1	Tumor protein, translationally controlled 1	Anti-apoptosis	NM_003295
FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1	Cell proliferation	NM_002032
LOC441581	FSHD region gene 2 protein	Unknown	NM_001080988
ZSCAN2	Zinc finger and SCAN domain containing 2, transcript variant	Cell differentiation	NM_181877
EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Translational elongation	NM_001402
NuMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	Cell cycle	NM_006455.2
NBPF1	Neuroblastoma breakpoint family, member 1	Unknown	NM_017840
UBC	Ubiquitin C	Protein modification	NM_021009
NBPF14	Neuroblastoma breakpoint family, member 14	Unknown	NM_015383
MALAT1	Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1	Unknown	NF_002819
TTTV6	Testis-specific transcript, Y-linked 6	Unknown	AF32237
RPL2	Ribosomal protein L3, transcript variant 1	Translation	BC_107711
RPL7A	Ribosomal protein L7a	Translation	NM_000972
RPL32	Ribosomal protein L32	Translation	NM_000994
RPS9	Ribosomal protein S9	Translation	NM_001013
RPS14	Ribosomal protein S14	Translation	NM_001025071
RPS20	Ribosomal protein S20	Translation	NM_001023
RPS25	Ribosomal protein S25	Translation	NM_001028

(2) 16 lower expressed genes

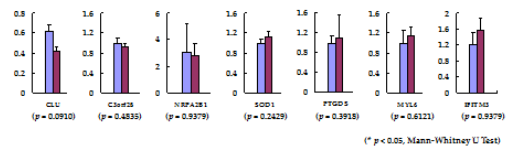
Gene symbol	Gene name	Function	Accession No.
HNRPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	RNA splicing	NM_002137.2
MYL6	Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	Muscle development	NM_021019.3
IFITM3	Interferon-induced transmembrane protein 3	Immune response	NM_021034.1
IFITM2	Interferon-induced transmembrane protein 2	Immune response	NM_006435.1
ZC3H13	Zinc finger CCHC-type containing 13	Nucleic acid binding	NM_001507072
C6orf28	Chromosome 3 open reading frame 28	Unknown	NM_014367.3
SOD1	Superoxide dismutase 1	Antioxidant activity	NM_000454.4
PTGD5	Prostaglandin G2-synthase 21 kDa	PGS2 synthesis	NM_000545.5
CLU	Clusterin, transcript variant 2	Anti-apoptosis	NM_203339.1
RPL7A	Ribosomal protein L7a	Translation	NM_000972.2
RPL17	Ribosomal protein L17	Translation	NM_001035006.1
RPL24	Ribosomal protein L24	Translation	NM_000986.3
RPL28	Ribosomal protein L28	Translation	NM_000991.3
RPS2	Ribosomal protein S2	Translation	NM_002952.3
RPS18	Ribosomal protein S18	Translation	NM_022581.2
RPS25	Ribosomal protein S25	Translation	NM_001026.2

Figure 1.

(1) Higher expression genes in cryptorchidism



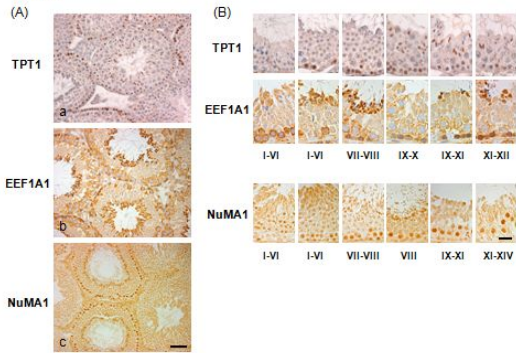
(2) Lower expression genes in cryptorchidism



このうち、定量RT-PCR法で発現量を確認したところ、TPT1、EEF1A1、NuMA1の3遺伝子で有意差を認めた。(Figure 1.)

停留精巣で高発現する遺伝子のうち、TPT1、EEF1A1、NuMA1遺伝子はいずれも精原細胞に発現することを確認した。マウス・ラットの成熟精巣で局在を検討したところ、同様の発現を認め、精子形成サイクル依存的に発現変化することも明らかとした。(Figure 2.)

Figure 2.



これら3つの遺伝子はいずれも細胞周期や増殖に関わっており、精巣において精子形成細胞の分化や、幹細胞の維持に関与すると考えられる。このことから停留精巣における精原細胞は正常と異なる遺伝子発現プロファイルを有しており、より未分化な状態であると考えられる。精子形成にも関与するため、こうした遺伝子発現量を指標とすることにより、停留精巣患者の妊孕性の予測因子として利用できる可能性が考えられた。

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 7 件)

- Mizuno K, Hayashi Y, Tozawa K, Iwatsuki S, Kojima Y, Kohri K. Single-Nucleotide Polymorphism in WT1 Gene in a Hyperplastic Intralobar Nephrogenic Rest With Botryoid Protrusion. *Urology*. 2009 Nov 13. [Epub ahead of print] (査読あり)
- Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Cryptorchid Testes Using Suppression Subtractive Hybridization. *J Urol*. 181: 1330-7; discussion 1337, 2009. (査読あり)
- Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic diagnosis and treatment of a phenotypic girl with a mosaic 45,XO/46,X, idic(Y) mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg*. 44: e1-3, 2009. (査読あり)
- Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF-kappaB associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model. *Urology*. 73: 389-93, 2009. (査読あり)
- Mizuno K, Kamisawa H, Hamamoto S, Okamura T, Kohri K. Bilateral single-system ureteroceles with multiple calculi in an adult woman. *Urology*. 72: 294-5, 2008. (査読あり)
- Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S,

Sasaki S, Kohri K. Early Orchiopexy Improve the Subsequent Testicular Development and Spermatogenesis in the Experimental Cryptorchid Rat Model. J Urol. 179: 1195-9, 2008. (査読あり)

7. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Influence for testicular development and histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. Int J Urol. 14: 67-72, 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

1. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Iwatsuki S, Kamisawa H, Shibata Y, Maruyama T, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Relationship between testicular location and the genetic characteristics of germ cells in cryptorchidism. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago, IL, USA.

2. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Iwatsuki S, Kamisawa H, Shibata Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Expression of the estrogen receptor alpha is decreased in the cryptorchid rat testes. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago, IL, USA.

3. 水野健太郎、小島祥敬、黒川覚史、岩月正一郎、神沢英幸、柴田泰宏、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：停留精巣における精巣位置と精子形成細胞の特性との関連性。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009. 4. 16-19、岡山市

4. 水野 健太郎：移動精巣(遊走精巣)：手術治療(組織学的アプローチによる遊走精巣および停留精巣の検討)。第 58 回日本泌尿器科学会中部総会、2008. 11. 14-16、大津市

5. 水野 健太郎、小島祥敬、黒川覚史、井村誠、丸山哲史、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：停留精巣における精原細胞特異的マーカー (TPT1・EEF1A1) の同定と将来の造精機能予測。第 17 回日本小児泌尿器科学会総会、2008. 7. 16-18、高松市

6. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Cryptorchid Testes using Suppression Subtractive Hybridization. AUA 2008.5.17-22, Orlando, FL, USA.

7. 水野 健太郎、小島祥敬、黒川覚史、井村誠、丸山哲史、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：ヒト停留精巣組織に特異的な遺伝子の同定と機能解析。第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008. 4. 16-19、横浜市

[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]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 健太郎 (MIZUNO KENTARO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70448710

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし