

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09736

研究課題名(和文)非閉塞性無精子症における再生医療への取り組み

研究課題名(英文)Approach to regenerative medicine for non-obstructive azoospermia

研究代表者

梅本 幸裕 (Umemoto, Yukihiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：80381812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：造精機能障害モデルを作成した。精巣を摘出し、細胞分離を行った。体細胞である Sertoli 細胞と Leydig 細胞の分離を試みた。パーコール法による分離を行った。Leydig 細胞はおよそ 70% の確率で分離ができたが、Sertoli 細胞はコンタミが多く、一定した分離にならなかった。Microdissection 法にて精細管を分離できるかどうか試みた。精細管は分離可能であったが、1 cell あるいは極少量の細胞での PCR 技術が確立できなかった。

精子形成が行われていない精細管と造精機能が保たれている精細管の区別することが重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子形成不全の患者は原因不明が 50-70% 存在する。その原因は造精機能に関わる未知の遺伝子が欠損あるいは働かないことが容易に推測できる。この遺伝子を同定すること、その中でも体細胞に関わる遺伝子が同定されれば、治療に直接つながる可能性がある。精細胞に直接遺伝子を改変したり導入することはその外来遺伝子を伝えることになるため、体細胞に存在する遺伝子を究明することが多くの不妊症患者の治療につながる事が予想される。そのためには造精機能障害モデル動物から関連する遺伝子を同定することが今後の原因不明の男性不妊症への治療法になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A spermatogenesis dysfunction model was created. Testes were excised and the cell separation in seminiferous tubules was performed. I tried to separate Sertoli cells and Leydig cells. Separation was performed by the Percoll method. Leydig cells were separated with a probability of approximately 70%, but Sertoli cells were highly contaminated and inconsistent. An attempt was made to see if the seminiferous tubules could be separated by the microdissection method. The seminiferous tubules could be isolated, but the PCR technique for one cell or a very small amount of cells could not be established. It is important to distinguish between seminiferous tubules in which spermatogenesis is not occurring and seminiferous tubules in which spermatogenesis is maintained.

研究分野：泌尿器科

キーワード：Sertoli cell Leydig cell 遺伝子導入 男性不妊症 精巣内精子採取術 造精機能障害 非閉塞性無精子症

1. 研究開始当初の背景

21世紀に入り、男性不妊症、特に非閉塞性無精子症の治療は飛躍的に進歩した。現在の標準治療は顕微鏡下精巣内精子採取術(micro-TESE)である。しかし治療成績は30-50%と低く、満足のいくものではない。戦後年間270万人の出産数が、2017年は94万人となり不妊治療は国家的な急務といえる。しかし非閉塞性無精子症の治療としてmicro-TESEを超える治療がおよそ20年経過しても存在しない。正常な父母から生まれてきた男性がなぜ非閉塞性無精子症となるのか。一つの可能性として、造精機能をつかさどる遺伝子の欠損か機能異常がその原因として考えられる。

もし造精機能をつかさどる遺伝子の再生が可能となれば、この遺伝子を精巣内に導入することで、非閉塞性無精子症の精巣に造精機能が宿ることになる。これが真にmicro-TESEを超える新たな治療戦略につながっていくこととなる。

2. 研究の目的

私達は、男性不妊症に対する遺伝子治療を目標に、一貫して独自に研究を行ってきた。その中で精巣および精子への遺伝子導入技術を確認し、実験動物を用いておこなってきた。その結果lipofection法、electroporation法、アデノウイルスベクター法による、遺伝子導入効率と安全性についてそれぞれの特徴を証明した。これらは現在、臨床応用に向けて研究を進めている。

生殖医療では精子、卵子といった真に生物そのものとなる細胞を扱うこととなる。これには倫理面はもとより技術的に確実な方法が期待される。またこの細胞に対する遺伝子治療を考える際には、次世代への伝播されることが問題となる。そこで、造精機能のサポートとなるべき体細胞であるSertoli細胞およびLeydig細胞への治療を施すとなれば、たとえ外来遺伝子を扱ったとしても次世代への伝播の心配はない。今回私たちが確立した遺伝子導入法を用い、体細胞に存在するキーとなる遺伝子を見つけ、その遺伝子を精巣内の体細胞に導入する。これが実現すれば今までにない独自性と創造性を兼ね備えた治療といえる。

3. 研究の方法

1. 細胞分離法

本研究ではまずは精巣内の細胞を分離することが重要になる。各細胞に分離することによりその細胞に発現されている遺伝子検索が可能になる。精巣からの分離方法を3つの方法を検討した。

(1) FACSによる細胞分離

精巣白膜を除去後、精細管をホモジネイトする。そこにSertoli細胞およびLeydig細胞、精細胞に特異的な抗体を結合させ、FACSに通すことで、各種細胞を回収する。

(2) パーコール法による分離

上記(1)と同様に精巣をホモジネイトする。十分細胞が離れたところでパーコール液を超遠心機にて遠心分離を行う。各層に分離したところに Sertoli 細胞および Leydig 細胞、精細胞が分離してくる。この分離した層を回収して各種細胞とする。

(3) Microdissection 法

凍結切片とした精巣組織を顕微鏡下に Sertoli 細胞および Leydig 細胞、精細胞として切り取ってくる。

以上のようにそれぞれの特色を生かして細胞分離を行い、各種細胞を回収する。

2. 造精機能障害モデル動物の作成

様々な造精機能障害を考慮して以下のようなモデル動物を作成する。

(1) 先天異常モデル：

フルタミド(抗アンドロゲン剤)を胎児(母体内)投与することによる停留精巣作製する。停留精巣モデルマウスは非ステロイド性抗アンドロゲン剤である flutamide を、妊娠マウスに15 mg/日・連日腹腔内投与し、生まれてきた仔を停留精巣モデルマウスとして用いる。(実際には約80%の雄ラットが停留精巣モデルとなる。)(文献1,2)

(2) ホルモン異常モデル：

LH-RH analogue を成獣マウスに投与することによる男性不妊症モデル作製する。酢酸リュープロレリンを成獣マウスに皮下注射し、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造精機能低下が引き起こされる。薬剤投与後2~3ヶ月後に精巣を採取する。

(3) 精巣毒性モデル：

ブズルファンを成獣マウスに投与することによる男性不妊症モデルを作製する。抗癌剤を皮下注射し、直接造精機能を低下させる。この方法では細胞周期そのものの障害による造精機能低下が引き起こされる。薬剤投与後2~3ヶ月後精巣を採取する。

3. 精細胞、Sertoli細胞およびLeydig細胞からの遺伝子検索

上記2. で得られた各モデル動物と正常動物の精巣内に存在するmRNAの違いを測定する。具体的には次世代シーケンサーにより定量(RNAシーケンス)する。男性不妊症モデル精巣から分離したSertoli細胞、Leydig細胞を用いて3'-RNA増幅を行う。次にV1タグを付けたdTプライマーを用いて、逆転写反応を行う。ついでmRNAの除去を行うとともにcDNAの3'側にポリAを付加する。最後にPCRによる増幅を行う。

4. ヒト検体との遺伝子異常の違いの検討

上記3. で判明した男性不妊症の候補遺伝子について、実際の自験例での手術検体で検討する。具体的には実際の臨床現場では、micro-TESEにより精子の採取ができない場合、様々な病理結果が認められる。Sertoli cell only (SCO) syndrome、maturation arrest (MA)、hypospermatogenesis (HS)というように造精機能障害は一通りではない。このため上記2. で作成したモデル動物がSCO、MA、HSいずれと一致しているかを検討することで、より臨床に近い病態が考えられる。

3. の各モデルから検出された不妊症候補遺伝子を実際の臨床での病理検体の標本に発現

しているか、欠損しているかを検討する。

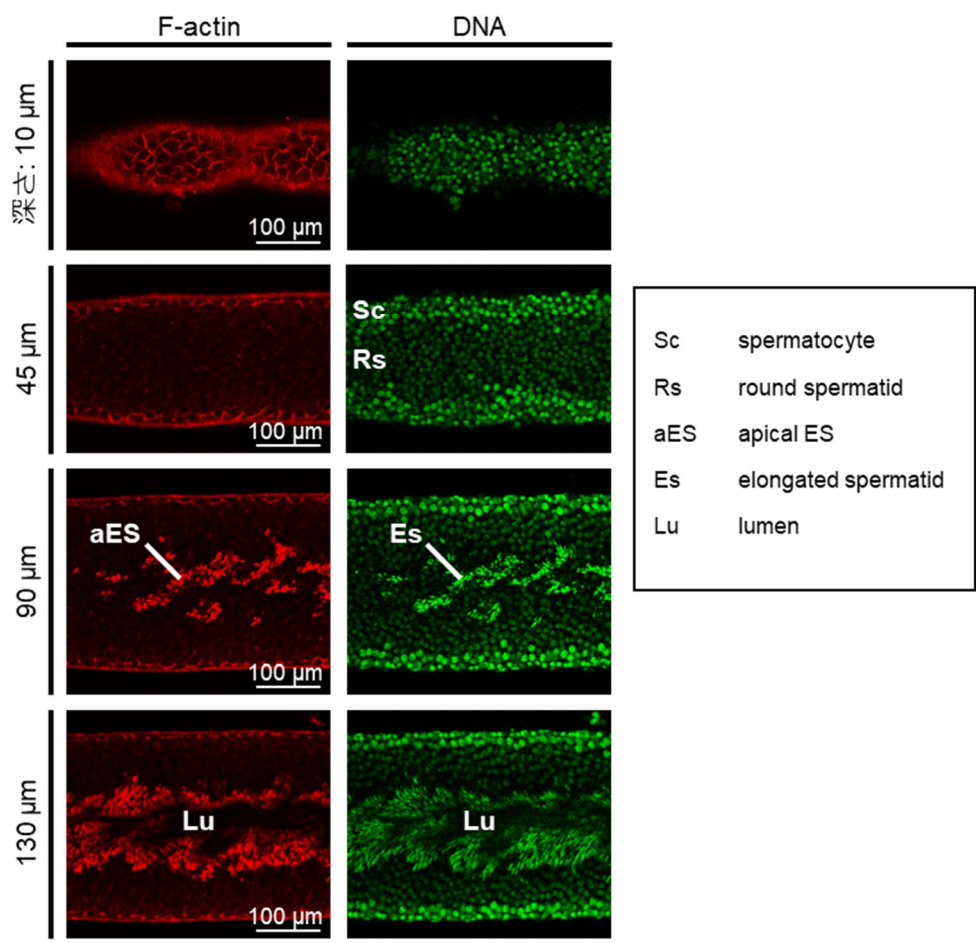
5. モデル動物精巣への遺伝子導入

これまでに判明した Sertoli 細胞および Leydig 細胞の遺伝子をアデノウィルスベクター法、あるいはエレクトロポレーション法にて、男性不妊症モデル精巣に導入を試みる(文献 1,2)。この遺伝子導入で造精機能障害が改善されるかどうかを観察する。改善が得られた場合、その導入遺伝子こそが、Sertoli 細胞および Leydig 細胞に存在し、かつ造精機能に關与する遺伝子と考えられる。

4. 研究成果

モデル動物を作成し、造精機能障害モデルを作成した。

ホルモン異常モデルとして酢酸リユープロレリンを皮下注して造精機能障害モデルを作成した。また停留精巣モデル動物の作成も行った。それぞれ精巣を手摘出し、細胞分離を行った。体細胞である Sertoli 細胞と Leydig 細胞の分離を試みた。まずはパーコール法による分離を行った。精巣をホモジネイトし、十分細胞が離れたところでパーコール液を超遠心機にて遠心分離を行った。各層に分離したところに Sertoli 細胞および Leydig 細胞、精細管が分離してくる予定であった。すると Leydig 細胞はおよそ 70%の確率で分離ができたが、Sertoli 細胞はコンタミが多く、一定した分離にならなかった。次に Microdissection 法にて精細管を分離できるかどうかを試みた。精細管は分離可能であったが、1 cell あるいは極少量の細胞での PCR 技術が確立できなかった。このため細胞数を増やすことが必要で現在この分離を行っている。ここで造精機能が下がっている、つまり精子形成が行われていない精細管と造精機能が保たれている精細管の区別することが必須となった。そこで精子とセルトリ細胞の接着因子である F-actin と apical ES に着目することになった。現在この F-actin と apical ES 蛍光染色を行い、精細管の区別をすることに現在取り組んでいる。今後この造精機能の違う精細管から遺伝子の違いを検討する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅本幸裕
2. 発表標題 思春期における精索静脈瘤手術の有用性
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野崎 哲史、岩月 正一郎、内木 拓、恵谷 俊紀、武田 知樹、黒川 覚史、窪田 裕樹、神谷 浩行、梅本 幸裕、安井 孝周
2. 発表標題 LH-RHアゴニスト投与による精巣毒性の評価
3. 学会等名 日本アン드로ロジー学会第40回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田 知樹、岩月 正一郎、野崎 哲史、西尾 英紀、窪田 裕樹、神谷 浩行、水野 健太郎、林 祐太郎、梅本 幸裕、安井 孝周
2. 発表標題 蛍光標識剤と多光子顕微鏡を用いた精細管の深部組織イメージング
3. 学会等名 日本アン드로ロジー学会第40回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩月 正一郎、梅本 幸裕、武田 知樹、野崎 哲史、加藤 大貴、西尾 英紀、水野 健太郎、林 祐太郎、安井 孝周
2. 発表標題 無精子症患者における年齢または血清テストステロン値と男性更年期症状の関連
3. 学会等名 日本アン드로ロジー学会第40回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅本 幸裕、岩月 正一郎、濱川 隆、磯谷 正彦、高田 英輝、野崎 哲史、武田 知樹、西尾 英紀、水野 健太郎、神谷 浩行、佐々木 昌一、林 祐太郎、安井 孝周
2. 発表標題 再発予防に有効な精索静脈瘤手術への取り組み 思春期症例を中心に
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩月 正一郎、野田 祐介、武田 知樹、野崎 哲史、神谷 浩行、窪田 裕樹、窪田 泰江、梅本 幸裕、佐々木 昌一、安井 孝周
2. 発表標題 無精子症カップルの年齢にみるわが国の晩婚化の影響
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎 哲史、内木 拓、岩月 正一郎、恵谷 俊紀、内木 綾、武田 知樹、黒川 覚史、梅本 幸裕、高橋 智、安井 孝周
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素LSD1阻害剤による精巢毒性の検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田 知樹、岩月 正一郎、野崎 哲史、西尾 英紀、窪田 裕樹、神谷 浩行、水野 健太郎、最上 徹、林 祐太郎、梅本 幸裕、安井 孝周
2. 発表標題 精細管ステージ特異的なapical ectoplasmic specializationの遺伝子発現解析
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iwatsuki Shoichiro, Takeda Tomoki, Nozaki Satoshi, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Kamiya Hiroyuki, Uemoto Yukihiro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Annual trends of marriage age and duration of postponing parenthood in Japanese azoospermic couples
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nozaki Satoshi, Naiki Taku, Iwatsuki Shoichiro, Naiki-Ito Aya, Takeda Tomoki, Etani Toshiki, Kurokawa Satoshi, Takahashi Satoru, Uemoto Yukihiro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Selective lysine specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	武田 知樹 (Takeda Tomoki) (30814256)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究医 (23903)	
研究分担者	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	野崎 哲史 (Nozaki Satoshi) (50813432)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	水野 健太郎 (Mizuno Kentaro) (70448710)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	岩月 正一郎 (Iwatsuki Shoichiro) (70595397)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	

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