

機関番号：81303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591903

研究課題名 (和文) アンドロゲンシグナリング修飾による精子成熟機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the sperm maturation mechanism by androgen signaling modulation

研究代表者

鈴木 吉也 (SUZUKI KICHIYA)

宮城県立がんセンター (研究所)・主任研究員

研究者番号：30422116

研究成果の概要 (和文)：

男性ホルモン(アンドロゲン)とアンドロゲンレセプター(以下AR)は精巣における精子形成(spermatogenesis)と精巣上体における精子成熟(sperm maturation)に重要な役割を果たしていることは広く知られている。そこで我々は、アンドロゲンシグナリングを精巣上体特異的に修飾することにより、精巣におけるアンドロゲンおよび精子産生を阻害することなく、男性特異的に精巣上体機能(受精能獲得)を破壊できるのではないかと考え、Cre-loxPシステムを利用して、精巣上体特異的にアンドロゲンレセプターを破壊された遺伝子改変マウスの作製および機能解析を行い、精子成熟機構に関与する遺伝子群を同定する事を最終目的とした。すでに精巣上体特異的にタモキシフェン作動性Creを発現するトランスジェニックマウスの作製を行い計8ライン作出完了した。これらのマウスがCreリコンビナーゼをタモキシフェン制御下に発現するか確認するためにROSA26-EGFPと掛け合わせた。米国JACKSON研究所より購入したROSA26-EGFPマウスはCre発現領域に一致してEGFPを発現するように遺伝子改変したマウスである。さらに、このマウスと精巣上体特異的Cre発現マウスから産出されたマウスが8週令に達し次第タモキシフェン投与した後精巣上体を取り出しEGFP発現を調べところ、予想外に精巣上体尾部にEGFPの発現を認めた。このタモキシフェン作動性Creマウス(8ライン中3ライン)と東京大学加藤茂明教授より供与されたコンディショナルARノックアウトマウスとを掛け合わせて精巣上体内精子を解析したが、これまでのところ精子運動能等の変化は認めていない。

研究成果の概要 (英文)：

In order to examine androgen-signaling pathway in the epididymis, we have attempted to establish a conditional knock out mice of the androgen receptor gene in the initial segment of the epididymis. We first generated a transgenic mouse carrying a tamoxifen-regulated Cre recombinase gene driven by the epididymis-specific lipocalin gene promoter. When the mice was crossbred with a ROSA26-EGFP mice to confirm the Cre expression in the epididymis, unexpectedly the EGFP expression was recognized in the cauda epididymis. Although the Cre mice was crossbred with a mice carrying a conditional androgen receptor allele to generate a conditional androgen receptor knock out mice in the epididymis, the mice demonstrated a normal sperm concentration and mobility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学・生殖医学

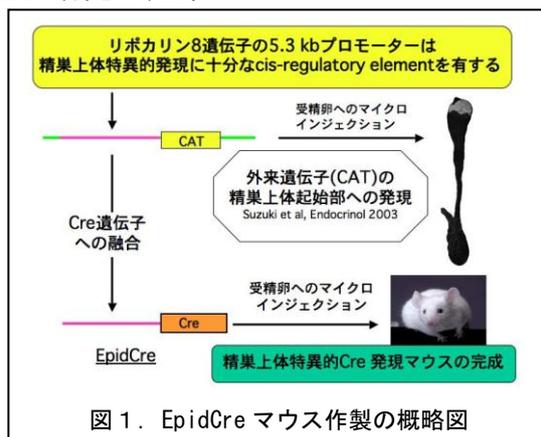
キーワード：精巣上体、精子成熟、アンドロゲンレセプター、コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

精巣上体は男性特有の臓器で、精子成熟は精子貯蔵と並び精巣上体の重要な機能であるが、これは米国 Vanderbilt 大学の Orgebin-Crist らにより 1960 年代に発見された。正常な精子は精巣において精子形成過程を終了した後、精巣上体内を通過中に管腔内の連続した環境変化に暴露されることにより精子表面が様々に修飾されることにより、最終的に運動能と受精能を獲得する(図 1)。精巣上体における遺伝子発現は頭部から尾部にかけて高度に分化しており、これが精子成熟に重要であると考えられている。精巣上体内で発現し精子成熟過程に関与している重要な分子として AR が知られており、実際、精巣-輸精管-精巣上体-射精管に全域に渡り強く発現している。

そこで我々は、アンドロゲンシグナリングを精巣上体特異的に修飾することにより、精巣におけるアンドロゲンおよび精子産生を阻害することなく、男性特異的に精巣上体機能(受精能獲得)を破壊できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的



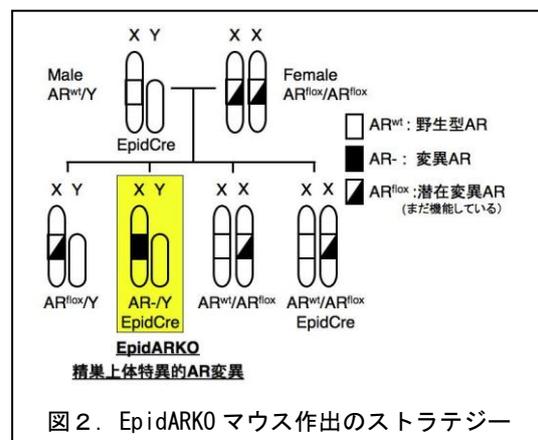
本研究では Cre-loxP システムを利用して、精巣上体特異的に AR を破壊された遺伝子改変マウスの作製および機能解析を行い、精子成熟機構に関与する遺伝子群を同定する事を最終目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、Cre-loxP システムを利用して、精巣上体特異的に AR を破壊された遺伝子改変マウスを作製し精子成熟機構に関与する遺伝子群を同定する事を最終目的として、研究計画をデザインし遂行した。

研究計画 1. Cre-loxPシステムを用いた精巣上体AR変異マウス(EpidARKO)作製

方法：EpidARKOを作製するために、①精巣上体特異的プロモーターにより制御されたCreリコンビナーゼを精巣上体に発現する遺伝子改変マウス (EpidCreマウス)



ス) ②AR遺伝子のエクソン1の両端にloxP配列を挿入したAR変異マウス (AR^{flx}/Yマウス) が必要である。EpidCreは図 1 に従

いRajewskyらより供与されたCreベクターを用いて作製したが同ベクターを用いた数々の報告が存在する(Guy et al., Nature Genet 2001, Zhou et al., Genesis 2001)。7ラインの作出を完了したが、その後、McMahonらよりタモキシフェン制御型のCreベクター(CreER)の供与を受け、さらに8ラインを作出した。②は本申請書の連携研究者である加藤らのグループが作製したAR変異マウス(AR^{fllox}/Y)用い、図2の如くCre-lox Pシステムを応用することで、AR遺伝子を潜在的に破壊した雌マウスにEpidCreを発現する雄マウスを交配する事で約25%の割合で精巣上体AR変異オスマウス(EpidARKO)が得られた。

研究計画2. EpidARKOの精子運動能解析および病理組織学的解析 方法:成熟EpidARKOマウスと野生型マウス(WT)の精巣上体尾部より精子を採取し、精子濃度と運動能測定を行った。さらに精巣上体および精巣をホルマリンまたはBouin's固定液中で固定後パラフィン包埋標本作製しHE染色で形態学的変化を解析した。

4. 研究成果

我々は精巣上体特異的にタモキシフェン作動性 Cre を発現するトランスジェニックマウスの作製を行い計8ライン作出完了した。これらのマウスが Cre リコンビナーゼをタモキシフェン制御下に発現するか確認するために ROSA26-EGFP と掛け合わせた。米国 JACKSON 研究所より購入した ROSA26-EGFP マウスは Cre 発現領域に一致して EGFP を発現するように遺伝子改変したマウスである。さらに、このマウスと精巣上体特異的 Cre 発現マウスから産出されたマウスが8週令に達し次第タモキシフェン投与した後精巣上体を取り出しEGFP発現を調べると、予想外に精巣上体尾部にEGFPの発現を認めた。このタモキシフェン作動性 Cre マウス(8ライン中3ライン)と東京大学加藤茂明教授より供与されたコンディショナル AR ノックアウトマウスとを掛け合わせて精巣上体内精子を解析したが、これまでのところ精子運動能等の変化は認めていない。

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6件)

Martinez-Ferrer M, Iturregui JM, Uwamariya C, Starkman J, Sharif-Afshar AR, Suzuki K, Visedsindh W, Matusik RJ, Dmochowski RR, Bhowmick NA. Role of nicotinic and estrogen signaling during experimental acute and chronic bladder inflammation. *Am J Pathol* 172:59-67. 2008

Hayasaka S, Terada Y, Suzuki K, Murakawa H, Tachibana I, Sankai T, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, motor recruiter myosin Va, VIIa-Rab27a/b interacting protein, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis. *Asian J Androl* 10:561-8. 2008

Terada Y, Hasegawa H, Ugajin T, Nabeshima H, Suzuki K, Yaegashi N, Okamura K. Independent spatial and temporal functions of human sperm centrosomes after dispermic microinjection into bovine oocytes. *J Androl*. 30:559-65. 2009

De Graff DJ, Yu X, Sun Q, Mirosevich J, Jin RJ, Wang Y, Gupta A, Nandana S, Case T, Paul M, Huang HY, Shapiro E, Logan S, Suzuki K, Orgebin-Crist MC, and Matusik RJ. The Role of Foxa Proteins in the Regulation of Androgen Receptor Activity. In *Androgen Action in Prostate Cancer*, Tindall D. and Mohler J. eds, Springer Science, 587-615. 2009

Labus JC, Rodríguez CM, Suzuki K, Orgebin-Crist MC, Hinton BT. Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, transcriptional activity is regulated by osmotic stress in epididymal cells. *Mol Reprod Dev*. 77:114-125. 2010

Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Nabeshima H, Suzuki K, Yaegashi N. The Shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. *J Assist Reprod Genet*. 27:75-81. 2010

〔学会発表〕（計3件）

International Session, Modulator,
Reproduction section, 第60回日本産科
婦人科学会学術講演会 於 パシフィ
コ横浜 2008年4月13日

教育講演 男性生殖器官に発現するリポ
カリン遺伝子群の発現制御機構 宮城県
立がんセンターセミナー 於 宮城県名
取市 2010年5月28日

シンポジウム 第1回統合産婦人科学研
究合同シンポジウム 男性生殖器官に発
現するリポカリン遺伝子群の発現制御機
構 東北大学医学部大会議室 2011年2
月22日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：