

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791515

研究課題名（和文） 造精機能獲得における Sertoli 細胞の遺伝子変化の解明

研究課題名（英文） The analysis of the genetic alteration in Sertoli cells when the spermatogenesis occurred.

研究代表者

梅本 幸裕 (UMEMOTO YUKIHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80381812

研究成果の概要（和文）：造精障害モデルとして停留精巣ラットを使用した。3つの遺伝子に着目した結果、精巣での protamine2、WNT5A、clusterin の発現を免疫染色にて確認した。protamine2 の発現は陰嚢内に下降した精巣では精子細胞において陽性に反応した。しかし停留精巣においては全く発現していなかった。WNT5A は leydig cell において健側、患側精巣ともに陽性を示した。clusterin は sertoli cell において発現を認めたが、患側である停留精巣側の精細管内に強く発現を認めた。

研究成果の概要（英文）：As a rat model of spermatogenesis dysfunction, we developed a cryptorchidism model rat and have reported this model rat. The quantity of Clusterin did not differ between the testes at all periods, while WNT5A were significantly decreased in the undescended testis compared to the normal testis at all periods. Immunohistological staining of Clusterin and WNT5A revealed no difference between the normal and the undescended testes at all periods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：mRNA、clusterin、protamine2、WNT5A、造精機能、sertoli cell、leydig cell、停留精巣

1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療の発達により、かつては絶対不妊といわれたカップルに挙児が得られるようになってきている。しかしこれは、精子が

存在してはじめて可能になることである。実際の臨床の現場において、多くの患者に maturation arrest あるいは Sertoli cell only syndrome といった造精機能障害のため

精子がまったく見つからない場合が存在する。精巣内とくに精細管内には精細胞および Sertoli 細胞が存在し精子形成が行われている。その中で精細胞は Sertoli 細胞という支持細胞なくして発達不可能であることは周知の事実であるが、その具体的な働きについてはほとんど不明である。当研究では、精細胞が発達しない病態および精細胞における様々な遺伝子発現について、Sertoli 細胞に着目しその役割を検討することで造精機能の解明につながると考えられる。精細胞は様々な精細管の各 stage で存在するため、遺伝変化がとらえにくい。しかし今回精細管の支持細胞である Sertoli 細胞を分離し、遺伝子変化を検討することによって生理的な変化ではない遺伝子変化が同定され、その遺伝子が造精機能に深くかかわっていると考えている。そこで、様々な条件の精細管内の Sertoli 細胞単独の分離を行うことが必要になる。具体的には造精機能の障害を起こさせた精細管と正常な精細管での Sertoli 細胞の違いをみる必要がある。遺伝子の違いが測定できれば、その遺伝子が造精機能に関与し、精細管の発達つまりは造精機能の解明および治療につなげるきっかけとしたい。

2. 研究の目的

これまでは、特発性男性不妊症の発症原因を明らかにするために、遺伝子変異や精子形成のメカニズムを実験的に研究する手法がとられていた。その中で、特に男性不妊症患者における精巣の遺伝子発現プロファイリングを行う目的で、精巣組織におけるマイクロアレイ解析の報告が散見されている。しかし、これらの結果は様々な stage における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。このため必ずしもピンポ

イントで遺伝子を検索することができていないことが現状である。私達の研究は、精巣そのものではなく精細胞の支持細胞である Sertoli 細胞に着目し、その特異的遺伝子解析を行うというものである。何千、何万の遺伝子のいずれが造精機能に関与しているか定かではないなかで、2004年に精子に6種類の mRNA が同定されたことでより重要な遺伝子群の関連が期待される。さらに、この遺伝子解析の結果から、造精機能低下している精細管に選択的に投与する遺伝子選択マーカーを作製し、不妊治療に役立てたいと考えている。

3. 研究の方法

精巣組織からの Sertoli 細胞の分離が重要である。様々な造精障害モデル動物を作製のうち、この精巣から Sertoli 細胞を分離する。正常動物の精巣由来の Sertoli 細胞と比較することで変化のあった遺伝子が検索される。判明した遺伝子を、当教室が行ってきた遺伝子導入方法で造精障害モデルの精巣に導入し、造精機能回復の有無を検討する。また、正常精巣に判明した遺伝子の RNAi を投与することで造精機能障害が引き起こされるか検討する。

Sertoli 細胞の分離が難しい場合は、TM3 (市販の Sertoli 細胞) 細胞に様々な条件を与えて遺伝子の変化を検討し、本研究を遂行する。

(1) Sertoli 細胞の分離

精巣内にはあらゆる stage での精細胞および Sertoli 細胞、Leydig 細胞といった体細胞が存在しまずはこれらの細胞を分離できるかを検討しなければならない。マウス陰嚢より精巣を摘出し、精巣白膜を除去したうえで精巣内の細胞を分離、ここから Sertoli 細胞を抽出し各種測定

を行っていく。

(2) 男性不妊症モデルマウス(以下モデルマウス)の準備

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・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。) このモデルラットを 4 週齢、6 週齢、12 週齢それぞれにおいて精巣および精巣上体精子からの mRNA 抽出。ラットでのプライマーである clusterin, protamine2, WNT5A の 3 種の mRNA 測定を行った。

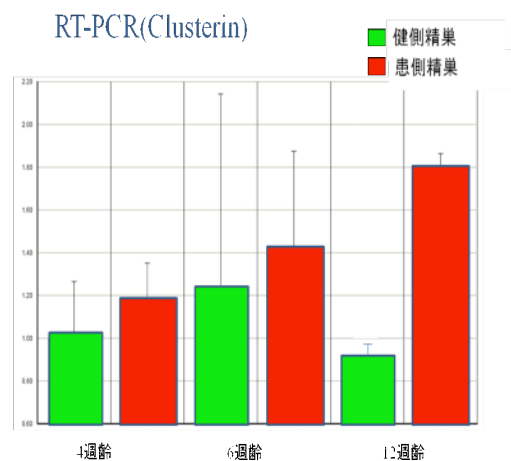
また、clusterin, protamine2, WNT5A の 3 種類において免疫染色も行い、存在部位について検討した。

4. 研究成果

(1) Sertoli cell の単離は細胞薬剤の影響で遺伝子変化を起こす可能性があり、現時点では不可能であった。このため精巣組織での検討とした。

(2) 停留精巣モデル患側精巣からは造精機能が均一に週齢とともに傷害され、12 週齢では Johnsen's score 7 であった。健側においては造精機能に異常は認めなかった。また精巣組織での mRNA の発現変化も同時に検討を行った。Clusterin の発現については 6 週齢までは患側、健側と変化は認めなかったが、12 週齢で左右差を認めた。protamine2, WNT5A については停留精巣において全期間発現の低下を認めた。精巣での protamine2, WNT5A, clusterin の発現を免疫染色にて確認した。protamine2 の発現は陰嚢内に下降した精巣では精子細胞において陽性に反応した。

しかし停留精巣においては全く発現していなかった。WNT5A は leydig cell において健側、患側精巣ともに陽性を示した。clusterin は sertoli cell において発現を認めたが、患側である停留精巣側の精細管内に強く発現を認めた。



これらの結果から WNT5A が造精機能に關与していることが示唆された。

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 2 件)

- ① Kubota H, Sasaki S, Kubota Y, Umemoto Y, Yanai Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Cyclooxygenase-2 protects germ

cells against spermatogenesis disturbance in experimental cryptorchidism model mice. Journal of Andrology, 査読有, 32:77-85, 2011

- ② Umemoto Y, Sasaki S, Kohri K. Azoospermia patient with quadruplicate DAZ genes. Int J Urol, 査読有, 16:768, 2009

[学会発表] (計2件)

- ① 梅本幸裕、佐々木昌一、岩月正一郎、小島祥敬、水野健太郎、神谷浩行、矢内良昌、窪田裕樹、窪田泰江、池内隆人、林祐太郎、郡健二郎 造精機能に関する mRNA の検討について。第98回日本泌尿器科学会総会、平成22年4月29日、岩手市
- ② Umemoto Y, Sasaki S, Iwatuki S, Mizuno K, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K WNT5A is the mRNA carried by sperm, and may take part in spermatogenesis. The 4th Greatwall International Andrology Forum, 2010年3月1日, Shenzhen (China)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅本 幸裕 (UMEMOTO YUKIHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80381812