

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791660

研究課題名(和文)精子幹細胞活性による造精機能障害メカニズムの解明と不妊治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of disturbance of spermatogenesis by spermatogonial stem cell activity

研究代表者

神沢 英幸(Kamisawa, Hideyuki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00551277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先天性の造精機能障害の発症機序を明らかにする事を目的とし研究を行った。男性不妊症モデル動物や患者精巣を用い、精子幹細胞(SSC)活性と精子形成の相関を検討した。その結果、精子幹細胞関連遺伝子であるUTF1遺伝子の発現パターンにより男性不妊症のリスク評価が可能とする知見に至った。また男性不妊症の最大要因の一つである停留精巣でSSC活性が低下していることを確認し、その成果を元にしてUTF1以外にもEEF1A1やKDM5Aなどが相互に関与しながら精子形成を制御することを明らかにした。さらに精原細胞株を用いた遺伝子導入実験にてKDM5Aの過剰発現が精子形成のエピゲノム異常を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We performed this study to elucidate the mechanism of congenital poor spermatogenesis.

By using male fertility model animals and patients, we evaluated the relationship between spermatogonial stem cell (SSC) activity and spermatogenesis. Our results indicated that the expression pattern of UTF1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) in the testes could be suitable for predicting the risk of future infertility. And we elucidated that SSC activity of cryptorchid testes, one of the most major factor of male infertility, was decreased, and various gene expressions (i.e. EEF1A1, KDM5A and so on) regulated spermatogenesis. Moreover overexpression of KDM5A would induce abnormal epigenomic change of spermatogenesis by gene induction (KDM5A) study.

研究分野：精子形成

キーワード：精子幹細胞 UTF1 男性不妊症 造精機能障害

1. 研究開始当初の背景

<本研究に関連する国内・国外の研究動向並び位置づけ>

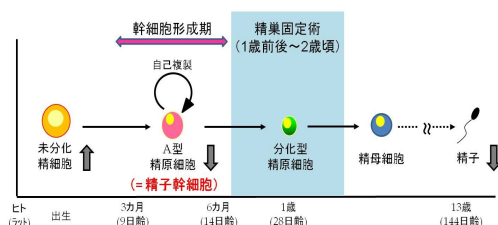
不妊症の約半数は男性要因であり、その原因として造精機能障害は約 70~90% を占める。しかし精子形成とその障害のメカニズムには不明瞭な点が多く、特に特発性造精機能障害に対する決定的な治療法は存在していない。造精機能障害をきたす代表的な疾患として停留精巣が挙げられる。本症では、1歳前後から2歳頃までの精巣固定術が推奨されているが、早期に精巣固定術を行っても、両側例の父性獲得率は約 50%である。このことは停留精巣の治療成績をさらに向上させる必要性を示すと同時に、停留精巣における造精機能障害が、これまで考えられてきた高温環境・環境ホルモンなどの外的要因のみでは説明できないことを示している。

私たちはこれまでに、男性不妊症モデルとして停留精巣ラットを開発し、さらに手術療法の適正時期や治療の限界を示してきた。また、ヒトでの手術時の精巣容積や採取した生検組織を検討し、幼若期からの組織障害の存在や、内分泌環境の異常、精巣下降に関与する候補遺伝子を明らかにしてきた。これらの多くは停留精巣や精巣腫瘍などの精巣発育不全症候群の原因遺伝子や精子幹細胞のマーカー遺伝子と関連しており、停留精巣の妊孕性が、これらの遺伝子発現に影響を受けている可能性があると考えている。

<着想に至った経緯>

私たちが行った男性不妊症モデル動物の研究では、精細胞系の分化異常が生後早期から認められることを明らかにしている(下図)。A型精原細胞数の多寡により、将来の妊孕性はある程度予測されるが、このA型精原細胞は自己複製能・多能性・未分化性の維持を持った精子幹細胞(spermatogonial stem cell; SSC)と

<精細胞の分化過程>



して注目されている。このことから私たちは、造精機能障害による男性不妊症では、精巣自体が内包する先天的な因子が存在するのではと推察した。つまり、造精機能障害には精細胞系分化の異常を来す内在性要因として、A型精原細胞の精子幹細胞としての機能低下が存在するのではと考えた。

そこで本研究では、男性不妊症モデルとして、停留精巣における幹細胞活性の動態ならびに活性をコントロールするカスケードを明らかにすることにより、造精機能障害の発症メカニズムを究明するという着想に至った。

2. 研究の目的

出生率の改善は、わが国の将来に重大な課題であり、男性不妊症の最大要因である造精機能障害の機序を解明する意義は大きい。近年、精子形成において、精子幹細胞の存在が注目されている。私たちも、これまでの研究で精子幹細胞マーカーと造精機能の相関を明らかにしてきた。今回の研究では、それらの結果を踏まえ、男性不妊症における精子幹細胞の動態を検討する。具体的には、男性不妊症の主因である停留精巣のモデル動物を用い、精細胞系の分化ならびに幹細胞活性の変化を、胎生期から経時的に評価する。また発現遺伝子の変動や機能解析により、造精機能に関わる精子幹細胞の活性カスケードを明らかにする。これらの結果をヒト停留精巣組織で検証し、造精機能障害の予測因子としての臨床応用を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 男性不妊症モデル動物における精細胞系分化と幹細胞活性の検討

不妊症モデル動物の作成

抗アンドロゲン剤である flutamide を S-Dラットに対して妊娠 14-21 日の 7 日間腹腔内投与し、生まれてきた仔を停留精巣モデルラットとして用いた。なお胎生期ならびに出生直後に、精巣の位置のみで停留精巣を判別することは曖昧さが残るため、片側停留精巣と思しきモデルを選別し、精巣の高さに明らかな左右差があるものを対象とした。さらに精巣導帯の付着位置や厚さ、組織像を検討す

ることで、肉眼的な停留精巢の診断が補完されると考えた。

停留精巢モデルでの精細胞系分化

停留精巢での A 型精原細胞への分化が生じる時期を同定するため、胎生 18 日から生後 12 週まで経時的に精巢を摘出した。ラット下降精巢でも同様の評価を行い、精巢の組織学的形態について比較検討した。

停留精巢ラットにおける UTF1 の発現

精子幹細胞活性を測定するマーカーとして UTF1 を用いた。定量 RT-PCR・Western Blotting・免疫染色にて、停留精巢での発現強度や発現時期を検討した。特に SSC における UTF1 発現の有無や陽性・陰性細胞比などの検討は幹細胞活性の測定に重要と考える。A 型精原細胞が出現する時期の前後において幹細胞活性を厳密に評価した。

ヒト停留精巢での UTF1 発現

私たちの施設では、病理組織学的検査目的に、停留精巢の手術時に精巢組織を凍結保存している。これらを用い、ヒトでの停留精巢における精細胞系分化と A 型精原細胞の精子幹細胞活性を検討し、モデル動物とヒトの病態の相同性を検証した。

(2) 造精機能を制御する遺伝子群の検討

遺伝子群のスクリーニング

精子幹細胞活性に関連する UTF1 以外の遺伝子を探索するためマイクロアレイ解析を委託した。上記実験で確認された A 型精原細胞に分化する週齢の停留精巢ラットの精巢から合成した mRNA と、正常精巢から合成したものを mRNA の発現量に 1.5 倍以上もしくは 0.67 倍未満の遺伝子群を抽出し、GO analysis や他論文での評価を交えてスクリーニングした。

候補遺伝子の絞り込み

スクリーニングされた遺伝子群に対して片側停留精巢モデルラットの患側(停留側)と健側(下降側)にて定量 RT-PCR を行った。このなかでマイクロアレイの評価の再現性が確認された遺伝子群に対してウエスタンブロットングおよび免疫染色で発現パターンを明らかにすることで、候補遺伝子を同定した。

(3) 精子幹細胞の培養系を用いた造精機能を制御する遺伝子群カスケードの解明

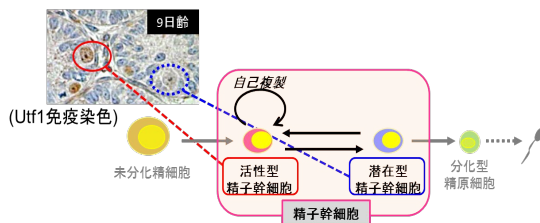
精原細胞株を用いた遺伝子機能解析

得られた候補遺伝子の精巢での発現量を評価するため精原細胞株である GC-1 細胞を用いた。リポフェクション法による遺伝子導入および si-RNA を用いたノックダウンを行い、培養した GC-1 細胞における下流遺伝子の発現変化を検討した。

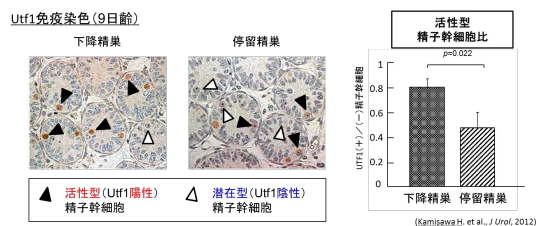
また候補遺伝子のなかにエピゲノム制御に関わるものが同定されたことから、ヒストンのメチル化状態についても検討を行った。

4. 研究成果

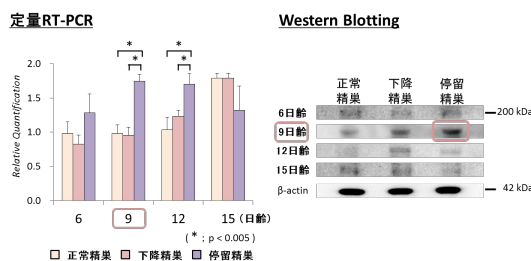
胎生 18 日から生後 12 週までのラット正常(下降)精巢の HE 染色から、始原生殖細胞から精子幹細胞への分化は生後 9 日に生じることが明らかにされた。また UTF1 を用い、精子幹細胞には活性型 (UTF1 陽性) と潜在型 (UTF1 陰性) の 2 種類が存在し、UTF1 陽性・陰性精子幹細胞比 (= 精子幹細胞活性) が将来の妊孕性予測に有用であった(下図)。



また片側停留精巢モデルラットを用いた研究から、停留精巢では生後早期から精子幹細胞活性が低下していることが明らかにされた。すなわち停留精巢は先天的に幹細胞機能低下を内包していると考えられた(下図)。このことはヒト停留精巢での検討でも同様の結果であった。



停留精巢と下降精巢の間の遺伝子発現差をスクリーニングするため行ったマイクロアレイ解析では停留精巢において 24 遺伝子の発現亢進と 39 遺伝子の発現低下を認めた。これらすべてに RT-PCR およびウエスタンブロットングを行い(下図)、KDM5A が再現性をもって停留精巢で発現亢進してい



ることを明らかにした。KDM5A はヒストンタンパク H3K4 に結合している ジメチル基とトリメチル基の脱メチル化を行う酵素であり、停留精巣での精子形成障害にエピゲノム異常が存在することが示唆された。

精原細胞株である GC-1 細胞に KDM5A の遺伝子導入を行い、培養細胞でのメチル化解析および遺伝子発現定量を行ったところ、KDM5A の強制発現により精子幹細胞の脱メチル化の亢進と OCT3/4 (幹細胞マーカー) および ESR2 (エストロゲン受容体) の発現亢進を認めた。このことから停留精巣では精子幹細胞に先天的なエピゲノム異常が存在し、幹細胞機能を低下させていることが推察された。

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 5 件)

- (1) Nishio H, Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K.

Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes.

J Urol. 191:1564-72, 2014

doi: 10.1016/j.juro.2013.10.071.

(査読あり)

- (2) Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Nakane A, Kurokawa S, Kohri K, Hayashi Y.

Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome wide analyses.

J Urol. 192:535-41, 2014

doi: 10.1016/j.juro.2014.02.044.

(査読あり)

- (3) Moritoki Y, Hayashi Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nishio H, Kurokawa S, Ugawa S, Kojima Y, Kohri K.

Expression profiling of microRNAs in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1.

J Urol. 191:1174-80, 2014

doi: 10.1016/j.juro.2013.10.137.

(査読あり)

- (4) Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Kohri K, Hayashi Y. Gene expression profile during testicular development in patients with SRY-negative 46,XX testicular disorder of sex development.

Urology. 82:1453.e1-7, 2013

doi: 10.1016/j.urology.2013.08.040.

(査読あり)

- (5) Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Hayashi Y, Kohri K.

Attenuation of spermatogonial stem cell activity in cryptorchid testes.

J Urol. 187:1047-52, 2012

doi: 10.1016/j.juro.2011.10.170.

(査読あり)

[学会発表](計 3 件)

- (1) 神沢 英幸、水野 健太郎、西尾 英紀、守時 良演、黒川 覚史、中根 明宏、林 祐太郎、郡 健二郎

「遊走精巣の手術適応を精子幹細胞活性の観点から考える。」第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

- (2) 神沢 英幸、林 祐太郎、小島 祥敬、西尾 英紀、守時 良演、岩月 正一郎、水野 健太郎、梅本 幸裕、佐々木 昌一、郡 健二郎

「精子幹細胞活性に及ぼす精巣固定術の効果。」日本アンドロロジー学会第 31 回学術大会および第 18 回精子形成・精巣毒性研究会、2012.6.29-30、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

- (3) 神沢 英幸

「精子幹細胞関連遺伝子を用いた造精機能障害における精細胞系分化誘導機構の解明。」第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[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]

なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

神沢 英幸 (KAMISAWA HIDEYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 00551277