

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861439

研究課題名(和文) 精巢内体細胞におけるDAX1の機能解析とアデノウィルスベクターを用いた臨床応用

研究課題名(英文) Adenovirus-mediated Dax1 gene transfer enhances the function of Sertoli cells via the SCF/C-KIT pathway

研究代表者

黒川 覚史 (Kurokawa, Satoshi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50468253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：(目的)DAX1の精子形成に果たす役割は未だ解明されていないためアデノウィルスベクターを用いたDAX1の精巢内遺伝子導入の効果を検討した。(方法)DAX1発現アデノウィルスベクターを作製し、ライディッヒ・セルトリ細胞株に遺伝子導入した。遺伝子発現をRT-PCRで比較した。ラットの精巢にベクターを投与し、免疫染色で検討した。(結果)セルトリ細胞ではScf遺伝子の発現が亢進していた。ラット精巢ではセルトリ細胞にDAX1の強発現を認めた。(考察)DAX1はセルトリ細胞からSCF/KITシグナル経路を介して精子形成を促進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：(OBJECTIVE)DAX1 plays important roles in spermatogenesis in Sertoli cells in the testes. However, DAX1 function in Sertoli cells is unclear. We therefore analyzed the function of DAX1 in Sertoli cells using the adenoviral gene transfer technique.(METHODS) 1) In vitro study: An adenovirus vector was tested on the Sertoli cell line to assess the efficiency of gene transfer. The expression level of Sertoli cell-specific genes was examined by quantitative RT-PCR. 2) In vivo study: Dax1 expression in the testes was analyzed by immunohistochemistry. (RESULTS) 1) Scf was expressed at higher levels after Dax1 gene transfer. 2) Strong DAX1 staining was detected in the nuclei of Sertoli cells.(CONCLUSIONS) Strong Scf expression was observed after Dax1 gene transfer, indicating that the nuclear receptor DAX1 controls SCF expression in Sertoli cells. DAX1 may activate Sertoli cells to stimulate spermatogenesis via a SCF/C-KIT signaling pathway.

研究分野：泌尿器科

キーワード：DAX1 アデノウィルスベクター 造精機能障害 セルトリ細胞 ライディッヒ細胞 体細胞

1. 研究開始当初の背景

1984年に我が国で初めて体外受精が実施されてから生殖補助医療は身近なものとなり発展してきた。近年、造精機能障害患者に対する治療として顕微鏡下精巣内精子採取術(MD-TESE)が開発され精子回収率が向上した。しかし、MD-TESEを施行しても造精機能障害患者の約半数からは精巣内精子を得ることができず、その患者の配偶子をもつ挙児を得られない。このような造精機能障害患者に対しては新たな治療法の開発が待ち望まれている。

一方動物領域では2011年に、マウスのiPS細胞から精子を作製し産仔まで得られたニュースが世界を駆けめぐった。1970年代以降、動物領域の生殖補助技術が数年以内に医学領域に生殖補助医療(ART)として導入されている。このニュースは近い将来ヒトにおいても体細胞から精子を作ることが可能であるかのような印象を与えた。しかし、iPS細胞を培養下に始原生殖細胞にまで分化させた後は、W/W^vマウス(精子形成細胞に異常はあるが、セルトリ細胞やライディッヒ細胞には異常がないという特性を持つ)の精巣内へと移植している。そして、W/W^vマウスの体内で始原生殖細胞を減数分裂させ精子を得ているのである。すなわち精子形成細胞の単培養下に減数分裂を含めた精子形成を達成することは困難といえる。

現在、減数分裂などの精子形成過程は精子形成細胞を中心に研究されている。しかし、精子形成はセルトリ細胞、ライディッヒ細胞といった精巣内体細胞と精子形成細胞との間で適切な相互作用があつて初めて達成できるものであり、精巣内体細胞の機能解析が今後ますます必要であると思われる。

2. 研究の目的

現在、我が国では約50人に1人が生殖補助医療で出生しており不妊症は身近な問題となっている。不妊症の約半数は男性側に原因があり、その中でも造精機能障害が約9割を占めている。その多くは原因の特定できない特異性造精機能障害である。私たちはこれまで特異性造精機能障害患者の精巣内で転写因子DAX1が造精機能障害の程度に比例し発現低下していることを明らかにした。さらにDAX1の発現レベルは精子形成周期と同調していることも見いだした。これらの結果を踏まえ、造精機能に果たすDAX1の役割を解析し、造精機能障害のメカニズムを解明したい。さらにDAX1発現アデノウイルスベクターを用いて将来の遺伝子治療への臨床応用を目指したい。

3. 研究の方法

(1) DAX1発現アデノウイルスベクターの作製
アデノウイルスベクターのコンストラクト作製
サブクローニングによりプラスミド内で

遺伝子配列を作製する。哺乳類の細胞内で目的遺伝子を発現できるサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを使用する。DAX1とマーカータンパク eGFP を発現できるように、Dax1 遺伝子の全長 cDNA と eGFP の cDNA との間に IRES (internal ribosomal entry site) 配列を挿入する。作製した目的遺伝子配列を非増殖性アデノウイルスのゲノム DNA 内に組み込みアデノウイルスベクターを作製する。コントロールベクターとして eGFP のみを発現するベクターも作製する。非増殖性アデノウイルスは、ヒト 5 型を改変し増殖に必要な E1・E3 領域を欠失させたものである。

アデノウイルスベクターの精製とタイター調整

アデノウイルスは非増殖性であるが、増殖に必要な E1 領域を発現する HEK293 細胞内では増殖可能である。HEK293 細胞内で増殖したアデノウイルスを培養細胞ごと回収し凍結融解により細胞壁を破壊したあと、Adeno-X Maxi Purification kit (Clontech 社) のカラムクロマトグラフィーで精製する。さらに、Adeno-X Rapid Titer kit を用いてタイター測定しウイルス溶液を調整する。

(2) 培養細胞における "in vitro" での DAX1 機能解析

セルトリ細胞として、幼仔期由来の TM4 細胞、ライディッヒ細胞として、幼仔期由来の TM3 細胞を用いる。gain-of function の解析としてアデノウイルスベクターにより DAX1 の発現を亢進した際の遺伝子変化を定量 RT-PCR で解析する。

まずアデノウイルスベクターを様々な感染効率(multiplicity of infection; MOI)で投与し、最適な MOI を決定する。投与 48 時間後に培養細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し DAX1 と eGFP の蛍光二重免疫染色を行い共焦点顕微鏡で発現局在を観察する。RT-PCR と Western blot により遺伝子導入を確認する。遺伝子導入により発現変化した遺伝子を検索する。

(3) ラット精巣に対するアデノウイルスベクター投与の条件検討

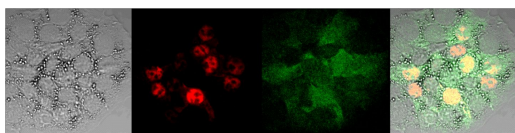
ラット精巣に様々なタイターのウイルス溶液を投与し、投与後 1、4、7、14 日目に精巣を採取する。DAX1・eGFP 発現の局在とウイルスベクターによる炎症反応の経時的变化を解析し、適切なウイルスタイターを決定する。精巣内投与法に関しては 2 種類の方法があり、精巣間質注入法ではライディッヒ細胞に特異的に遺伝子導入が可能であり、精細管内注入法ではセルトリ細胞に特異的に遺伝子導入が可能である。

4. 研究成果

(1) DAX1 とマーカータンパク eGFP を発現できるような非増殖性アデノウイルスベクターを作製した。DAX1 の発現局在が核内で、eGFP の発現局在が細胞質内であることが確

認された【図1】。

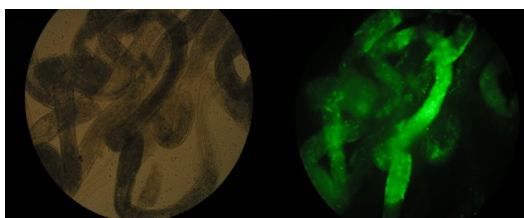
【図1】



(2) ライディッヒ細胞では Arom 遺伝子、セルトリ細胞では Scf 遺伝子の発現が亢進していた。

(3) ラット精細管内ではセルトリ細胞に DAX1 と eGFP の強発現を認めた。遊離した精細管内に eGFP の発現を認めている【図2】。

【図2】



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)

1. 黒川 覚史、神沢 英幸、中根 明宏、林 祐太郎：特集 停留精巣：最近の知見 Fowler-Stephens 法による精巣固定術と成績。小児外科、47(8)、848-852、2015
(<https://tokyo794.solidssystem.net/f/b/show/b01/820/zc01/5.html>) (査読無)
2. 黒川 覚史、梅本 幸裕、水野 健太郎、岡田 淳志、河合 憲康、戸澤 啓一、安井 孝周：特集 ロボット時代の泌尿器科手術 - 前立腺癌に対する新たなスタンダード 術式 腹膜外アプローチ。臨床泌尿器科、69(10)、824-831、2015
(doi:<http://dx.doi.org/10.11477/mf.1413205450>) (査読無)
3. 黒川 覚史、林 祐太郎：特集 小児泌尿器科内視鏡手術“最前線” 適応とコツ 尿路疾患に対する腹腔鏡下手術 膀胱尿管逆流に対する腹腔鏡下逆流防止術(膀胱外アプローチ)。臨床泌尿器科、69(2)：156-160、2015
(doi:<http://medicalfinder.jp/doi/abs/10.11477/mf.1413205160>) (査読無)
4. Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kamisawa Hideyuki, Moritoki

Yoshinobu, Nishio Hidenori, Nakane Akihiro, Kurokawa Satoshi, Kohri Kenjiro, Hayashi Yutaro: Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome-wide analyses. The Journal of Urology, 192(2):535-541, 2014
(doi:10.1016/j.juro.2014.02.044)
(査読有)

5. Moritoki Yoshinobu, Hayashi Yutaro, Mizuno Kentaro, Kamisawa Hideyuki, Nishio Hidenori, Kurokawa Satoshi, Ugawa Shinya, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Expression profiling of microRNA in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. The Journal of Urology, 191(4):1174-1180, 2014
(doi:10.1016/j.juro.2013.10.137)
(査読有)
6. Hayashi Yutaro, Mizuno Kentaro, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Kamisawa Hideyuki, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Kojima Yoshiyuki: Extravesical robot-assisted laparoscopic ureteral reimplantation for vesicoureteral reflux: initial experience in Japan with ureteral advancement technique. International Journal of Urology, 21(10):1016-1021, 2014
(doi: 10.1111/iju.12483) (査読有)
7. Kurokawa Satoshi, Tozawa Keiichi, Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Kawai Noriyasu, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Transurethral marking incision of the bladder neck: a helpful technique in robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy involving post-transurethral resection of the prostate and cancers protruding into the bladder neck. BMC Urology, 13:40, 2013
(doi:10.1186/1471-2490-13-40) (査読有)

[学会発表](計7件)

1. 黒川 覚史、守時 良演、林 祐太郎、安井 孝周：幹細胞マーカー-UTF1 を用いた小児陰嚢水腫の造精機能評価。第24回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2015.7.1-3、御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代田区)
2. 中根 明宏、丸山 哲史、黒川 覚史、

水野 健太郎、林 祐太郎、安井 孝周：尿道下裂手術において理想的な排尿を得るために～外尿道口の位置と尿線方向の関係～。第 24 回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2015.7.1-3、御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター（東京都千代田区）

3. Kamisawa Hideyuki, Mizuno Kentaro, Kurokawa Satoshi, Moritoki Yoshinobu, Noshio Hidenori, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Fujita Keiji, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: The space environment induces the enhancement of caveolin expression and leads to germ cell apoptosis. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
4. 黒川 覚史、西尾 英紀、守時 良演、林 祐太郎：小児陰嚢水腫の精巣に及ぼす影響～精索水腫と精巣水腫の比較解析～。第 23 回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2014.7.9-11、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
5. 黒川 覚史、守時 良演、岩月 正一郎、水野 健太郎、林 祐太郎：腹腔内精巣に対する一期的 Fowler-Stephens 法の検討。第 23 回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2014.7.9-11、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
6. Kurokawa Satoshi, Hayashi Yutaro, Nizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Basic research for hypospadias. 15th Annual Congress of Asia-Pacific Association of Pediatric Urologists, 2013.10.25-27, Taipei (Taiwan)
7. 黒川 覚史、加藤 利基、中根 明宏、森 久、梅本 幸裕、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：陰茎包皮翻転までの自然史から小児包茎の治療適応を考える～1244 例の解析～。第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.25-28、さっぽろ芸術文化の館 他（北海道札幌市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 覚史 (KUROKAWA Satoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50468253