

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462459

研究課題名(和文) 男性不妊における酸化ストレスの意義と新しい治療法の探求

研究課題名(英文) Significance of oxidative stress in male infertility and exploration of new treatments

研究代表者

千葉 公嗣 (Chiba, Koji)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40533766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットへ熱ストレスを与えたモデル群と人工的に精索捻転を作成したモデル群で、ラットの精巣に対して有意な酸化ストレスを誘発することができた。ラットの下半身を43℃の熱湯に15分浸した熱ストレス群では、精巣重量と精子数の低下を認め、熱ストレスの1日後にアポトーシス指数が最大化することが示された。さらに、酸化ストレスから細胞を保護するシャペロンタンパクであるクラステリンが、熱ストレス後に経時的に発現を増強することが示された。精索捻転ラットの精巣を調べた結果、心筋虚血に対して抗アポトーシス作用を示すと報告されているウロコルチンの発現を生殖細胞において認められた。

研究成果の概要(英文)：In the model group which gave heat stress to rats and artificially twisted torsion, it was possible to induce significant oxidative stress for rat testes. The lower body of the rat in the heat stress group soaked for 15 minutes in boiling water of 43℃, showed a decrease in testicular weight and sperm number, the apoptosis index is maximized after one day of thermal stress was shown. Furthermore, Clusterin is a chaperone protein that protects the cells from oxidative stress, it has been shown to enhance the expression over time after thermal stress. As a result of examining the testes of the torsion rat, the expression of the scale-ching which has been reported to exhibit anti-apoptosis effect on myocardial ischemia was observed in reproductive cells.

研究分野：男性不妊

キーワード：酸化ストレス ウロコルチン クラステリン 熱ストレス 精索捻転

1. 研究開始当初の背景

(1) 不妊カップルのうち約半数に男性側の要因があることが知られているが、精子形成障害の原因は十分に解明されているとは言えない。実際に乏精子症や精子無力症の患者は多数存在するが、原因が解明されていないため、根本的な治療が確立されていないのが現状である。

(2) これまでに精子は酸化ストレスに非常に影響を受けやすいことが報告されている。原因不明の精子形成障害のなかには、少なからず酸化ストレスが一因となっているものが存在することが考えられる。

(3) 多くの報告によって酸化ストレスによる精子形成障害と抗酸化物質の有用性が示されている。一方でその基本的なメカニズムは十分に解明されているとは言えず、治療方針においても一定のコンセンサスが得られていない。そこで酸化ストレスと精子形成障害に関するさらなる基礎的、臨床的研究が必要と考えられる。

2. 研究の目的

精子形成障害と酸化ストレスとの関連をより明確にし、より適切な治療を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 全身麻酔下にラットの下半身を 43 の熱湯に 15 分浸すことで酸化ストレスを与えというヒートショックモデルを用いて実験を行った。その結果、精巣重量の低下と精子数の低下を認め、熱ストレスの 1 日後にアポトーシス指数が最大化することが示された。さらに、酸化ストレスから細胞を保

護する作用をもつシャペロンタンパクであるクラスτεリンが、熱ストレス後に経時的に発現を増強することが示された。

熱ストレス後に抗酸化物質である vitamin C,E を内服させたラットと、内服していないラットの精巣を 14 日後に摘除し、比較した。しかし、精巣重量や精子数に有意差は認めず、精細胞のアポトーシス指数、精細管内の病理分析でも明らかな変化は認められなかった。

(2) 酸化ストレスモデルとして精索捻転ラットを使用した。当初は腹壁に片側精巣を固定する停留精巣ラットをモデルとしたが、停留精巣によるストレスがどの程度の期間で障害を示すのかが明らかにすることができなかった。そのため、より短期間で確実に障害を示すと予測される精索捻転ラットを動物モデルとした。7 週齢ラットの左精索を時計回りに 720°捻転させて虚血状態とし、1 時間後に捻転を解除して血液を再還流させるという精巣虚血-再還流モデルを精索捻転ラットとして作成した。評価項目として、虚血性心疾患治療後の心筋虚血-再還流障害に対して抗アポトーシス作用を示すと報告されているウロコルチンに着目した。ウロコルチンは酸化ストレスとの関連も示唆されているタンパクである。精索捻転ラットの捻転を解除して 0,1,3,6,24 時間後に精巣を摘除し、得られた組織を用いて経時的なウロコルチン発現量と生殖細胞アポトーシスとの関連について解析した。さらに、捻転解除の 15 分前にウロコルチンの拮抗物質であるアストレシンを精巣内投与し、コントロール群と比較した。その結果、ウロコルチンは生殖細胞に発現し、6 時間後までは経時的な増加

を認めるが 24 時間後には減少することが示された。さらに、TUNEL 染色の結果とあわせることでウロコルチン発現量と生殖細胞アポトーシスとの関連が示唆された。アストレシン投与群では コントロール群と比較して TUNEL 陽性生殖細胞が増加しており、ウロコルチンが精巣虚血-再還流障害に対して抗アポトーシス作用を持つことが直接示された。その分子メカニズムやシグナル伝達経路について解析した結果、ウロコルチンは抗アポトーシス蛋白の発現調節や MAPK を介することでラット精巣虚血-再還流障害による生殖細胞のアポトーシスを抑制することが示された

4 . 研究成果

(1) 熱ストレスによる酸化ストレスを与えたラットを使用し、精巣内外の変化について検討した。また、抗酸化物質の投与による精巣内の変化も確認できている。

(2) 精索捻転によるストレスを与えたラットを使用し、生殖細胞アポトーシスとの関連について検討した。ウロコルチンが抗アポトーシス蛋白の発現調節や MAPK を介することでラット精巣虚血-再還流障害による生殖細胞のアポトーシスを抑制することを解明することができた。

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)

Kenta Sumii, Hideaki Miyake, Noritoshi

Enatsu, Koji Chiba, Masato Fujisawa

Characterization of urocortin as an anti-apoptotic protein in experimental ischemia-reperfusion model of the rat testis.

Biochemical and Biophysical Research Communications 査読あり 2016, Volume 479, Pages 387-392

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.091

Kei Matsushita, Hideaki Miyake, Koji Chiba, Masato Fujisawa

Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress induced apoptosis in the rat testis

Andrologia 査読あり 2016, Volume 48, Pages 11-19

doi: 10.1111/and.12404

[学会発表](計 9 件)

松下 経、ラット精巣におけるクラスタリンの機能についての検討、第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014/4/24-27、神戸

Matsushita K, Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in rat testis. IFFS / JSRM International Meeting 2015 60th (2015.4.26-29 Yokohama)

Matsushita K, Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in rat testis. Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Sexual Medicine(APSSM) 15th (2015.9-11-13

Beijing)

角井健太、ラット精巣虚血-再還流障害
に対するウロコルチンの生殖細胞保護作用
についての検討、第 104 回日本泌尿器科学会
総会 (2016.4.23-25 仙台)

角井健太、ラット精巣虚血-再還流障害
に対するウロコルチンの生殖細胞保護作用
についての検討、第 48 回 関西アンドロロ
ジーカンファレンス (2016.3.5 大阪)

角井健太、精巣虚血-再還流障害モデル
ラットを用いた抗アポトーシス蛋白として
のウロコルチンの特性解析、第 61 回日本生
殖医学会学術講演会・総会(2016.11.3-4 横
浜)

角井健太、ラット精巣虚血-再還流障害
に対するウロコルチンの生殖細胞保護作用
についての検討、第 31 回日本生殖免疫学会
学術集会 (2016.12.2-3 神戸)

Sumii K, The role of urocortin in the
apoptosis of germ cells after experimental
testicular ischemia-reperfusion injury in the
rat. Annual European Association Of Urology
Congress 31th (2016.3.11-15 Munich)

Sumii K, The role of urocortin in the
apoptosis of germ cells after experimental
testicular ischemia-reperfusion injury in the
rat. American Urological Association (AUA)
2016 Annual Meeting 111th (2016.5.6-10.
San Diego)

〔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〕

ホームページ等 特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

千葉 公嗣 (Chiba, Koji)
神戸大学医学部附属病院・助教
研究者番号 : 40533776

(2)研究分担者

藤澤 正人 (Fujisawa, Masato)
神戸大学医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号 : 30243314

松下 経 (Matsushita, Kei)

神戸大学医学部附属病院・助教
研究者番号 : 20595699

江夏 徳寿 (Enatsu, Noritoshi)

神戸大学医学部附属病院・助教(現在は退職)
研究者番号 : 30622550

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()

