

令和元年6月16日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11065

研究課題名(和文)精子形成におけるrapgef6の機能解析と新しい男性不妊治療の開発

研究課題名(英文) Analysis of function of rapgef6 in spermatogenesis and development of new male infertility treatment

研究代表者

藤澤 正人 (Fujisawa, Masato)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：30243314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：rapgef6^{+/-}の雌雄のマウス(C57BL/6系統)の交配から、rapgef6ノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスで有意に精巣重量の低下を認め、精子濃度、運動率、正常形態率の低下を認めた。電子顕微鏡での観察で、頭部や尾部の変形などがノックアウトマウスで多くみられた。テストステロンやFSHやLHの値を複数回測定したが、有意差は認めなかった。接着分子とrapgef6との多重染色では、既知のN-カドヘリン以外には、ZO-1の発現がノックアウトマウスにおいて有意に発現低下していた。ヒト精巣組織におけるrapgef6の発現や局在を免疫染色で施行したが、発現を確認できず、今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

rapgef6に関する男性不妊に関する研究はわれわれ以外に、国内外で報告を認めず、特徴的かつ独創的な研究と考えられる。rapgef6ノックアウトマウスは、現在臨床の現場でしばしば問題とされる特発性精子形成障害の疾患モデルマウスとして確立される可能性があり、形成障害の原因の探索の有用なツールとなりうる。今回の研究結果からも推測された。今後の課題でもあるが、ヒトでも臨床応用し、rapgef6の発現レベルと精子形成障害の関係を調べることで、未だ難しい特発性精子形成障害に対する治療法の開発の大きな一助になりうる可能性があると考えており、今後新たな治療薬開発を目指してさらなる研究を検討している。

研究成果の概要(英文)：We have found that rapgef6 knockout (KO) mice exhibit prominent male infertility and analyzed the mechanism underlying rapgef6's function in the process of spermatogenesis. Although the body weight and pituitary hormones levels showed no difference between KO and wild mice, testis volume was significantly low in KO mice. The concentration and motility of epididymal sperm was decreased. Malformed sperms were ubiquitously observed in KO mice. Histological examination showed marked atrophy of the testis and hypospermatogenesis in KO mice. Because rapgef6 was expressed on the luminal side of seminiferous tubules, it could be related to the apical ectoplasmic specialization (ES) that maintains the polarity of the spermatids and confers adhesion to Sertoli cells in the seminiferous epithelium. We found that loss of rapgef6 altered the expression of ZO-1 beside with N-cadherin. We cannot detect any rapgef6 expressions in human testis in this research. This is next challenge for the future.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：男性不妊

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年少子晩婚化が進む中で、全カップルの6組に1組は不妊症で、その半分は男性側因子に起因する。顕微受精をはじめとする生殖補助医療 (assisted reproductive technologies: ART) が盛んに行われるようになってきている。不妊治療の中心は産婦人科医によるところが大きい。ARTの技術向上もさることながら、精子の質を改善する治療やよりよい精子を選択する方法の開発など、泌尿器科側からのアプローチも今後益々必要となると考えられる。男性不妊症の多くは、精子形成障害である。精子形成障害の根本的なメカニズムは依然解明されていないことが多く、先端医療である生殖補助医療技術がすすんだ現代において、精子形成障害の機序を解明し、新しい治療法を開発することが、今後の男性不妊症研究に求められていると考えられる。また今後精子形成障害の研究を続けるために、モデル動物の確立も必要になってくると考えられる。我々は、近年男性不妊症との関連も報告されている Rap1 に着目し、Rap1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の1つである RA-GEF-2(rapgef6)と精子形成障害との関連について研究を進めている。その過程でオス rapgef6 ノックアウトマウスが不妊を呈することを見出し、その原因の1つを解明したが (Okada et.al. Biochem Biophys Res Commun.2014)、未だこのノックアウトマウスが男性不妊となる詳細な原因は不明な点も多い。

2. 研究の目的

精巣には主として、Germ cell と呼ばれる精細胞をはじめ、精細胞と接着する支持細胞であるセルトリ細胞やテストステロン産生細胞であるライディッヒ細胞が存在する。セルトリ細胞と Germ cell は精細管内に存在し、Germ cell は精細管の内腔側へ向かって、精祖細胞から精母細胞および精細胞を経て、精子細胞に分化し、精細管に放出される。Germ cell とセルトリ細胞は密接に接着しており、セルトリ細胞は精細胞の成熟に大事な役割を担っている。またライディッヒ細胞は、間質に存在しているが、テストステロンを分泌し、精細胞やセルトリ細胞を制御しており、また近年間質の筋様細胞の役割も解明されつつある。精子形成には、このように精巣内のいくつかの細胞が関与しているだけでなく、視床下部下垂体-精巣軸からの GnRH, LH, FSH による制御に加え、精巣局所での paracrine/autocrine 機構が存在することは、我々が以前報告してきたとおりである (Fujisawa et.al, Mol Cell Endocrinol.1992)。

Rap1 は、細胞内シグナル伝達系を構成する低分子量 GTP 結合蛋白質であり、転写や細胞増殖、細胞の運動性の獲得のほか、細胞死の抑制など数多くの現象にかかわっている分子であり、全身に発現をしている。哺乳類の精子形成における Rap1 の関与に関する報告はいくつか散見される。Rap1 の mutant マウスにおいて、精子形成における生殖細胞とセルトリ細胞間の接着異常により妊孕性の低下が引き起こされるという報告もある。ところが今までのところ、Rap1 の上流分子である RA-GEF の精子形成における役割を解明した報告は認めていない。

RA-GEF-2(rapgef6)の全身でのノックアウトマウスは、外見上正常に生育する。培養細胞株を用いた実験から、rapgef6 が TNF α 依存性の intergrin 活性化とそれに伴う細胞接着を制御することが示唆され、遺伝子欠損マウスの脾臓 B 細胞においてインテグリン依存性の接着能が低下していることが報告されている (Yoshikawa, 2007)。

本研究では、Rap1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の1つである RA-GEF-2(以下 rapgef6)に着目し、精子形成障害のメカニズムを解明し、最終的に新しい男性不妊治療の開発を目指している。

3. 研究の方法

1) rapgef6 ノックアウトマウスの作製

rapgef6^{+/-}の雌雄のマウス (C57BL/6 系統) の交配を順次行い産仔を得る。産仔の尾部から DNA を抽出し、遺伝子型を確認する。rapgef6^{-/-}、rapgef6^{+/-}および rapgef6^{+/+} の遺伝子型を持つオスのマウスを実験に供する。

2) 採材

心臓採血、精巣摘出、精巣上体からの精液採取を行い、以下の実験に供する。

-) 体重及び精巣重量測定
-) 下垂体性腺系ホルモン検査
-) 精液検査
-) parafin 切片の作製

3) 組織学的検討および免疫組織学検査

-) HE 染色：精細管ステージごとに精巣組織を評価する。
-) TUNEL 染色：セルトリ細胞あたりの精細胞におけるアポトーシスの割合を検討する。
-) 免疫多重蛍光染色

アドヘレンスジャンクションを構成する分子やタイトジャンクションを構成する分子と rapgef6 を多重染色し、既知の N-カドヘリン以外の接着に関する分子の何らかの変化を検討する。

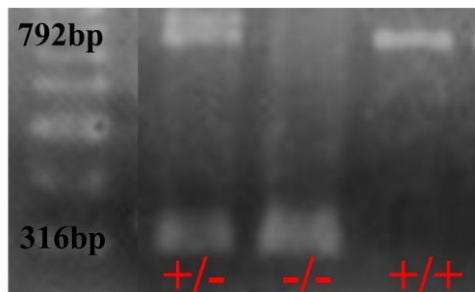
4) ヒトにおける rapgef6 に関する検討

rapgef6 の男性不妊症での発現を確認するために、マウスと同様にヒト精巣組織における rapgef6 の発現や局在を免疫染色で施行する。

4. 研究成果

rapgef6^{+/-}の雌雄のマウス(C57BL/6 系統)の交配から、rapgef6^{-/-}、および rapgef6^{+/+} の遺伝子型を持つオスのマウスを作製した(図1)。

<図1; Cre/loxP システムを用いた rapgef6^{-/-}マウスの作製>



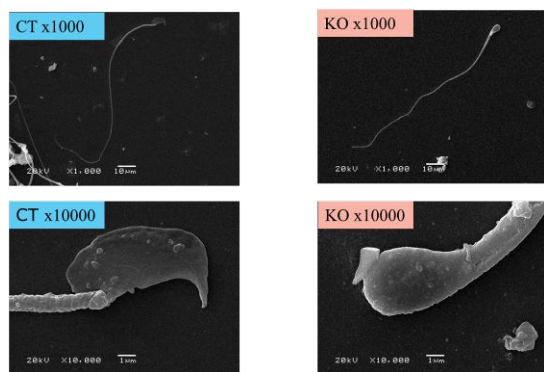
<図2; rapgef6^{-/-}マウスにおいて精巣は有意に低形成>



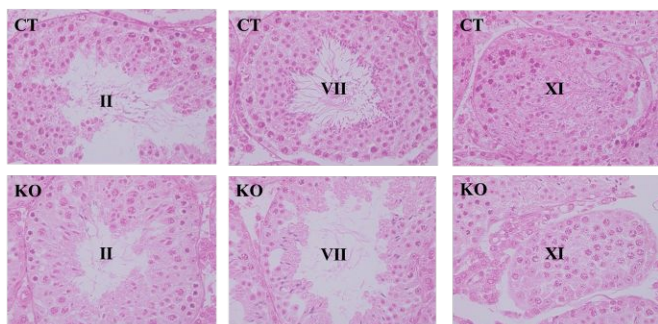
採取した精巣、精巣上体や心臓内血液を用いて、体重及び精巣重量測定、下垂体性腺系ホルモン検査、精液検査、精巣組織の HE 染色を行った。精巣重量は、ノックアウトマウスで優位に精巣重量の低下を認め、精子形成能の低下が推測された(図2)。

また精巣上体から精子を回収し、精液検査や電子顕微鏡による形態学的評価を行った。精子濃度は、rapgef6^{+/+}マウスにおいて、 $28.2 \pm 10.1 \times 10^6/\text{mL}$ で、ノックアウトマウスにおいて $6.7 \pm 4.9 \times 10^6/\text{mL}$ であり、有意にノックアウトマウスにおいて精子濃度の低下を認めた。運動率は、rapgef6^{+/+}マウスにおいて、 $35.3 \pm 13.2\%$ で、ノックアウトマウスにおいて $12.3 \pm 5.9\%$ であり、有意にノックアウトマウスにおいて運動率の低下を認めた。奇形率は、rapgef6^{+/+}マウスにおいて、 $14.8 \pm 5.8\%$ で、ノックアウトマウスにおいて $40.8 \pm 13.1\%$ であり、ノックアウトマウスにおいて有意な高値を認めた。これは、いわゆる OAT 症候群 (oligoasthenoteratozoospermia 症候群; 精子減少症、精子不動症、奇形精子症で特徴づけられる特発性精子形成障害) の所見を認めた。

<図3; 電子顕微鏡による精子形態の観察>



<図4; HE 染色による各ステージごとの精巣組織>



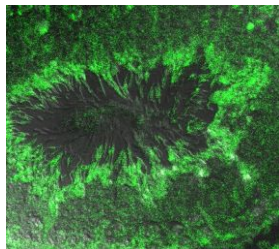
電子顕微鏡で観察したところ、ノックアウトマウスでは頭部の変形や尾部の変形などの奇形精子を呈するケースが多くみられた(図3)。

また精巣組織のHE染色を検討した(図4)。マウス精巣のstage、stage、stageXIの各ステージの1精細管あたりの生殖細胞数を比較したところ、各ステージにおいて、ノックアウトマウスにおいて有意に生殖細胞数が低下していた。ノックアウトマウスにおいて精上皮の菲薄化とhypospermatogenesisを認めた。

TUNEL染色において、セルトリ細胞あたりの精細胞におけるアポトーシスの割合もノックアウトマウスにおいて有意に高かった。ELISA法にてテストステロンやFSHやLHの値を複数回測定したが、両群間に有意差は認めなかった。ヒトの造精機能障害ではFSHが上昇するケースが多いが、やはりホルモン異常は認めなかった。これはヒトでの経験から予想される結果とは異なるものであった。

精巣組織の免疫組織学的な検討から、Rapgef6は精細管の内腔側に発現(図5)、knockoutマウスは奇形精子を多く含み、精巣が低形成であることが分かった。

< 図5; Rapgef6の精巣の蛍光免疫染色 >



精細管内でセルトリ細胞は、支持細胞とも呼ばれ、柱状に基底膜側から内腔側に伸びている。精母細胞はセルトリ細胞と接着し相互作用しながら、内腔側へと移動し、減数分裂し、半数体の精子細胞になりその後、形態変化し、精子となる。Rapgef6ノックアウトマウスにおいては、セルトリ細胞と生殖細胞間の接着(アドヘレンスジャンクション)における何らかの異常が精子形成障害を引き起こしているのではないかと仮説を立てた。そこでアドヘレンスジャンクションを構成する分子やタイトジャンクションを構成する分子とrapgef6との多重染色を試み、既知のN-カドヘリン以外の接着に関する分子に何らかの変化がないかを引き続き検討した。E-カドヘリンや -カテニンや -カテニンではノックアウトマウスにおいて変化は認めなかったが、ZO-1の発現がN-カドヘリンと同様にノックアウトマウスにおいて有意に発現低下していた。

我々の研究では、ノックアウトマウスにおいてNカドヘリンやZO-1の局在がdiffuseで不規則になっていたが、rapgef6が調節因子として働くRap1Aのmutantマウスにおいては、精細管内腔の精上皮から未熟な円形精子の異常な放出が起こり、精子形成の脱線と精子数の減少が起こる原因は、セルトリ細胞と精細胞を接着しているVEカドヘリンがチロシンリン酸化され、不活型となり、精子形成が十分に行われないためとの報告もある(E.Avatiadou,2007)。したがってRap1の上流シグナルであるrapgef6のノックアウトマウスにおける精子形成障害の原因は単一ではないことが予想されるため、さらなる検討が今後必要であり、また、rapgef6の発現部位からは、セルトリ細胞側か精細胞側か判然としないため、これについても今後の検討課題である。

Rapgef6の男性不妊症での発現を確認するために、マウスと同様にヒト精巣組織におけるrapgef6の発現や局在を免疫染色で施行したが、精巣組織における発現を確認できなかった。手技的な問題もあり、精巣内精子採取術などで採取した精巣を用いたrapgef6の発現や局在を検討することは今後の課題である。

以上の結果をまとめると、Rap1の上流分子であるRA-GEFのサブタイプの一つであるrapgef6ノックアウトマウスのオスは、有意に精子濃度、運動率は低く、奇形精子を多く認め、また妊孕性の低下を認め、それを反映して、産仔数の有意な低下を認めた。このようなrapgef6ノックアウトマウスにおいて見られる、精液所見の低下や妊孕性の低下は、ヒトの臨床でよく見られるOAT症候群に類似している。異なる点としては、造精機能が低下している男性においてはそれゆえ、男性不妊症の原因の1つとして重要なOAT症候群の分子メカニズムを解明する動物モデルとして、rapgef6ノックアウトマウスは有用と考えられ、今後さらなる研究を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松下 経

ローマ字氏名：(MATSUSHITA, kei)

所属研究機関名：神戸大学大学院
部局名：医学研究科腎泌尿器科学
職名：助教
研究者番号（8桁）：20595699

研究分担者氏名：千葉 公嗣
ローマ字氏名：(CHIBA, koji)
所属研究機関名：神戸大学大学院
部局名：医学研究科腎泌尿器科学
職名：助教
研究者番号（8桁）：40533766

研究分担者氏名：江夏 徳寿
ローマ字氏名：(ENATSU, noritoshi)
所属研究機関名：神戸大学大学院
部局名：医学研究科腎泌尿器科学
職名：助教
研究者番号（8桁）：30622550

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。