

令和元年5月29日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20151

研究課題名(和文) 精巣における転写因子機構の解明と男子不妊症遺伝子治療に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Elucidation of transcription factor mechanism in testis and study of male infertility gene therapy

研究代表者

佐藤 雄一 (sato, yuichi)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：00706848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、将来の男性不妊症に対する遺伝子治療の可能性を考え、動物や培養細胞に対して、各ベクター法を用いて遺伝子導入を試みた。リポソーム法では遺伝子発現を確認することはできなかった。エレクトロポレーション法は、簡便な方法であったが、遺伝子発現は一過性で発現細胞を限定することはできなかった。アデノウイルスベクター法は、生殖細胞での遺伝子発現は認められず、セルトリ細胞とライディッヒ細胞への発現が認められ、有望なベクターであると考えられた。Ad4BP/SF-1とDAX-1の遺伝子導入を、アデノウイルスベクターを用いて行ったが、むしろ造精機能障害を認め、今後の検討課題と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日の不妊症に対する治療の中心は補助生殖医療である。方法はさまざまだが、その中で一般的に行われている方法は、精巣内の精子を採取して卵子に注入するTESE-ICSIである。本治療は一定の効果を得られるが、自然妊娠でないこと、男子不妊症の根本的治療となっていないのが問題である。我々は男子不妊症の治療として遺伝子治療の可能性を模索しており、まだまだ今のところ道りは長い、これが臨床応用されれば、学術的意義も社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We attempted to transfect testicular spermatozoa with plasmid DNA using liposome methods by direct injection into mouse testes and cultured Sertoli and Leydig cells, unfortunately, however, we cannot confirm the expression of DNA in the Sertoli and Leydig cells. Although electroporation was a simple and convenient technique for gene transfer to germ cells in the testis, the gene expression was deemed transient and uncontrollable. Gene expression patterns by adenovirus-mediated gene transfer to the testis were particularly interesting and important from the viewpoint of gene therapy for male infertility in the future. An adenovirus vector has a biological characteristic of not introducing genes into germ cells in the testis, but just Sertoli and Leydig cells. We performed the Ad4BP/SF-1 and DAX-1 gene transfer to the mouse testis. However, spermatogenesis was disturbed after gene transfer.

研究分野：生殖医療

キーワード：アデノウイルスベクター法 エレクトロポレーション法

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

1. 研究開始当初の背景

我が国の人口は、2006年の1億2774万人をピークに、今後減りつづけると予想されている。さらに、2100年における総人口は約6000万人へと半減すると考えられている。これは、日本人の平均寿命が延びて高齢化がますます進行している一方で、予想以上に少子化が進んでいるからに他ならない。

一方、不妊症は、拳児を希望しながらもそれがかなわず、概ね婚姻関係を結んだ10カップルに1カップルがそれに該当すると報告されている。不妊症のうち約半数が男子不妊症であるが、その多くは特発性造精機能障害といわれ、明らかな原因が不明であり確立した治療法がないのが現状である。

近年、補助生殖医療は、特に1992年ICSIの出現により目覚ましい発達を遂げた。高度の乏精子症のみならず、無精子症に対しても治療が可能になっている。しかしながら、これらはあくまでも *in vitro* による授精であるのみならず、長期安全性については未だ不明である。さらに、男子不妊症の多くにはその適応に限界があって、不妊治療の大原則はあくまでも自然妊娠を目指すことにあり、今後新しい治療が望まれている。

2. 研究の目的

男子不妊症における最重要課題は、遺伝子レベルでの詳細な原因の解明と新しい治療の開発にあると思われる。そこで本研究では、男子不妊症の病態解明および男子不妊症に対する遺伝子治療という二つの到達目標を掲げた。前者については、Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の転写因子複合体ネットワークの包括的な解明および男子不妊症の病態解明、後者に関しては、これまで私達行ってきた精巣内遺伝子導入に関する研究をより発展させ、将来的には男子不妊症の遺伝子治療の臨床応用に向けた基礎的研究を目的とした。

3. 研究の方法

1 転写因子 Ad4BP/SF-1・DAX-1 の精巣体細胞への *in vitro* 遺伝子導入による Sertoli 細胞、Leydig 細胞の autocrine 機構および paracrine 機構の解明

(1) マウスセルトリ細胞およびライディッチ細胞の初代培養

8-10 週齢の ICR マウスにブゾルファンを投与し、完全に精母細胞、精子細胞、精子を精巣から除去する。2ヶ月後に屠殺し、精巣を摘除する。白膜を除去しコラゲナーゼ処理を行った後、ほぐれた精細管を洗浄。トリプシン処理した後 FCS 培地に懸濁。コラーゲンゲル状で精祖細胞と分離して、セルトリ細胞とライディッチ細胞を抽出する。

(2) 培養細胞下での精巣細胞への遺伝子導入

精子形成細胞と、セルトリ細胞とライディッチ細胞を共培養し、カチオニックリポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルスベクター法を用いて、Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の遺伝子導入を行う。遺伝子導入後の精原細胞変化について検討する。

また、遺伝子導入方法間での遺伝子発現細胞の違いと、遺伝子導入することにより Sertoli 細胞分泌物質である activin、inhibin、plasminogen activator、cyclin protein2、NO、lactate などの発現量をウエスタンブロットリング(コンパクトスラブウエスタンブロット解析セットを使用)、定量 RT-PCR により測定し、Dax-1 のセルトリ細胞における働きと造精機能における役割を検討する。cDNA チップを用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子導入による遺伝子発現の変化について併せて検討する。遺伝子発現の変化が明らかになったものに関しては定量的 RT-PCR により発現量を定量する。

2. マウスへの各種遺伝子導入法を用いた転写因子 Ad4BP/SF-1・DAX-1 の精巣内遺伝子導入
精巣への遺伝子導入方法としては、私たちがこれまでに開発した、精巣へ直接陰嚢を経由して導入する方法(精巣内直接注入法)と精巣網からマイクロガラス管を用いて逆行性に精細管内に注入する方法(精細管注入法)を用いて行う。カチオニックリポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルスベクター法を用いて、Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の遺伝子導入を行う。

(1) 正常マウス精巣への Ad4BP/SF-1, Dax-1 の遺伝子導入

Ad4BP/SF-1 および Dax-1 を遺伝子導入することにより、発現量および発現期間を確認した上で造精機能への影響、ステロイド合成への影響を検討する。導入効率は、western blotting により Dax-1 の発現量を観察することにより行う。造精機能への影響は、Johnsen score にて評価する。同時に副作用の有無を確認するために、TUNEL 法によるアポトーシスの有無を検討、免疫組織化学染色により CD4, CD8 陽性細胞の発現の有無を観察し細胞性免疫反応の有無の検討、血清 IgG 抗体の検索による体液性免疫反応の有無を検討する。

(2) 不妊モデルマウス精巣への Ad4BP/SF-1, Dax-1 遺伝子導入

用いる不妊モデル動物は上記で示したもので、すなわち、1) 停留精巣マウス、2) 男子不妊症自然発症マウス (jrd) 3) steel および C-kit ノックアウトマウス、4) Dax-1 ノックアウトマウス、5) 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症マウスを用いる。

3. 新生仔精巣への *ex vivo* での転写因子 Ad4BP/SF-1・DAX-1 の遺伝子導入と精巣移植

(1) マトリクスゲルを用いた精巣の三次元培養

GFP 発現トランジェニックマウスの新生児期マウスより精巣を摘出し、精巣より精子形成細胞、Sertoli 細胞、Leydig 細胞を採取分離。マトリクスゲルを用いてこれらを共培養し、*in vitro* で精

細管の再構築を行う。さらにこれらをディスペルゼ処理した後、ゲルから細胞塊を採取し正常のマウスに移植し、精巣内で GFP 由来の細胞の精細管が再構築されることを確認。またこれら再構築精細管において精子形成が起きていることを確認する。

(2)三次元培養による精巣の再構築と遺伝子導入

遺伝子導入効率の確認後、成人不妊症マウスに、遺伝子導入細胞移植を行う。In vivo 遺伝子導入方法と同様に、Dax-1 の発現量を RT-PCR、Western blotting により確認し、精巣重量・精細管径、Johnsen score、apoptosis の有無、精子運動率、奇形率、ホルモン値 (LH,FSH,テストステロン値) について検討する。

4 . 研究成果

我々は、将来の男性不妊症に対する遺伝子治療の可能性を考え、動物や培養細胞に対して、各ベクター法を用いて遺伝子導入を試みた。リポソーム法では遺伝子発現を確認することはできなかった。エレクトロポレーション法は、簡便な方法であったが、遺伝子発現は一過性で発現細胞を限定することはできなかった。アデノウイルスベクター法は、生殖細胞での遺伝子発現は認められず、セルトリ細胞とライディッヒ細胞への発現が認められ、有望なベクターであると考えられた。Ad4BP/SF-1 と DAX-1 の遺伝子導入を、アデノウイルスベクターを用いて行ったが、むしろ造精機能障害を認め、今後の検討課題と思われた。

今日の不妊症に対する治療の中心は補助生殖医療である。方法はさまざまだが、その中で一般的に行われている方法は、精巣内の精子を採取して卵子に注入する TESE-ICSI である。本治療は一定の効果を得られるが、自然妊娠でないこと、男子不妊症の根本的治療となっていないのが問題である。我々は男子不妊症の治療として遺伝子治療の可能性を模索しており、まだまだ今のところ道のりは長い、これが臨床応用されれば、学術的意義も社会的意義も高いと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

小島祥敬

Kojima Yoshiyuki

羽賀宣博

Haga Nobuhiro

小川総一郎

Ogawa Soichiro

胡口智之

Koguchi Tomoyuki

星誠二

Hoshi Seiji

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。