

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16808

研究課題名(和文) 幼若期における精子幹細胞とセルトリ細胞の相互作用の解明と男性不妊症の新規治療戦略

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of the interaction between germ cells and Sertoli cells in infant rat

研究代表者

加藤 大貴 (KATO, TAIKI)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・病院助教

研究者番号：00620931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：停留精巣は泌尿器先天性疾患として最も多く、罹患率は出生時約5%にのぼる。男性不妊になることが問題であるが、原因はいまだ明らかでない。血液精巣関門は思春期に隣接するセルトリ細胞間に形成され、精子形成に必須な構造である。私たちは、停留精巣モデル動物を開発し、造精機能障害について基礎研究を進めている。今回、思春期の停留精巣では血液精巣関門の分布異常が生じ、同時に精子形成が障害されることを見出した。セルトリ細胞は精子形成の足場となり、局所でのホルモン分泌や細胞間接着の成立を介して精子形成細胞の正常な分化をサポートする。血液精巣関門をターゲットとした、男性不妊の新規治療法開発の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

停留精巣における男性不妊の原因を解明するにあたり、これまで精子形成細胞に着眼した研究が数多く行われてきた。しかし、精子形成を支持細胞するセルトリ細胞に着目した研究は少なく、セルトリ細胞がその成立に深く関与する血液精巣関門に着目した研究はごくわずかである。本研究により、停留精巣では血液精巣関門の機能障害が生じ、精子形成に悪影響を与える可能性が示唆された。不妊治療という観点から、精子の源となる精子形成細胞を操作することは、倫理的に問題となる。一方、精子形成の足場となるセルトリ細胞を誘導して精子形成細胞の分化を促すことができれば、生命倫理的問題も克服できる男性不妊の新規治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cryptorchidism is the most common congenital disease with boys and known to impair spermatogenesis in the future. The blood-testis barrier (BTB) becomes defined in seminiferous tubules around puberty and provides a suitable environment for spermatogenesis. We have developed a cryptorchid male rat, and we found that the BTB protein distributions were altered in the cryptorchid model. More apoptotic germ cells were detected at the same time, or impaired spermatogenesis were observed. The BTB disorganization may cause spermatogenic impairment, possibly by limiting the BTB function. Our study might lead to the possibility of a new treatment for male infertility that targets the BTB.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：停留精巣 血液精巣関門 男性不妊 セルトリ細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

停留精巣は、泌尿器先天性疾患として最も多く、罹患率は出生時約 5%にのぼる。造精機能障害をきたすことが問題であるが、その原因は、精巣の高温環境や精子形成細胞の機能異常、支持細胞であるセルトリ細胞の機能低下などと言われているが、いまだ明らかでない。

精細管には様々な分化段階の精細胞(精原細胞、精母細胞、精子細胞、精子)と、それを支持するセルトリ細胞が存在する。思春期になると、セルトリ細胞は隣接する細胞との間に密着結合帯(tight junction)で構成される血液精巣関門(blood-testis barrier; BTB)を形成し、BTB によって精細胞は基底側と管腔側の区画に分けられる。管腔側の精細胞は、BTB があるため血液由来の有害物質や免疫細胞から保護され、成熟精子へ分化する。BTB は主に Claudin-11 (CLDN11), Occludin (OCLN), Zonula occludens-1 (ZO-1)で構成される。その主要因子である CLDN11 は哺乳類で広く保存されている。BTB は正常の精子形成に必須であるが、停留精巣における意義は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、停留精巣の造精機能障害の病態を明らかにするため、動物モデルを用いて BTB、の発現と局在変化を検討した。

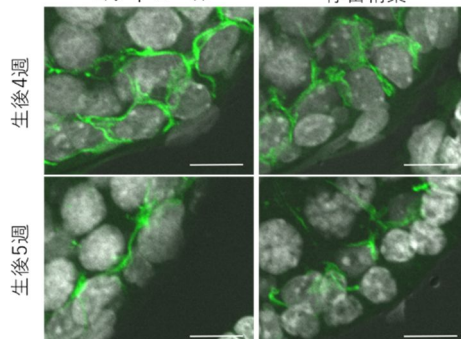
3. 研究の方法

妊娠 SD ラットに抗アンドロゲン薬である flutamide を暴露させ、出生した停留精巣モデルラットを用いた。思春期にあたる生後 4~6 週のモデルラットから、下降精巣(descended testis; DT)と停留精巣(undescended testis; UDT)を採取し、コントロールも合わせ 3 群で以下の項目について比較・検討を行った。(1) 精巣の組織所見(2) BTB 構成タンパク(CLDN11,OCLN,ZO-1)の免疫組織化学染色 (3) CLDN11 の蛍光免疫染色 (4) BTB 構成蛋白質の Western-blotting(WB) (5) 精細胞の分化(減数分裂の開始・進行を示すタンパク(STRA8, SYCP3)の免疫組織化学染色) (6) 精細胞のアポトーシス(TUNEL 法) (7) 硝酸ランタンの全身灌流を用いた透過型電子顕微鏡法(transmission Electron Microscopy; TEM)による BTB の機能評価。

4. 研究成果

(1) 精巣組織：コントロール群、DT 群では生後 6 週の精巣で精子細胞を認めたが、UDT 群では精母細胞で精細胞分化が停止していた。(2) 免疫組織化学染色：生後 6 週のセルトリ細胞で CLDN11 はコントロール群、DT 群とも基底膜に対して平行に発現していたが、UDT 群では細胞表面に拡散するように発現していた。OCLN は CLDN11 と同様の分布を示したが、発現が低かった。ZO-1 はいずれの群でもセルトリ細胞の細胞質に広く弱く発現していた。(3) CLDN11 の蛍光免疫染色：生後 5 週以降で CLDN11 タンパクの局在はコントロール群・DT 群と UDT 群で明らかに異なっていた。生後 4 週では CLDN11 はコントロール群、DT 群、UDT 群とも基底膜に対して垂直に発現した。生後 5 週以降、CLDN11 はコントロール群・DT 群で基底膜に平行に発現したのに対し、UDT 群では基底膜に垂直のまま発現していた(図)。(4) BTB 構成タンパクの WB：生後 4、5、6 週とも CLDN11、OCLN、ZO-1 の発現量に差を認めなかった。(5) 精細胞の分化：3 群とも STRA8、

血液精巣関門の蛍光免疫組織学的染色
コントロール 停留精巣



(緑 = CLDN11, 白 = DAPI, スケール = 10μm)

SYCP3 が陽性であり、減数分裂が進行していた。(6) 精細胞のアポトーシス：1 精細管あたりの TUNEL 陽性精細胞数は、生後 5 週以降 UDT で有意に増加し、管腔側の精細胞が陽性であった。(7) BTB の機能評価：生後 5 週で DT 群では硝酸ランタンの透過が BTB で阻まれたのに対し、UDT 群では BTB を透過して精細管の管腔側まで浸透していることを観察した。

BTB 構成タンパクのうち、CLDN11 の局在が停留精巣では著名に変化していることを見出した。また電子顕微鏡所見から停留精巣では BTB の機能が破綻し、同時に精細胞のアポトーシスが増加していた。これらのことから、停留精巣では思春期に BTB が適正に構成されないと考えられた。CLDN11 は BTB の主要な構成要素となる膜貫通型タンパクであり、*CLDN11* ノックアウトマウスで精細胞の分化が精母細胞で停止することが報告されている。本研究から、停留精巣でも精細胞の減数分裂は進行したが、その分化は精母細胞で停止していた。停留精巣では思春期に CLDN11 の局在変化が生じるとともに、BTB の機能が失われ、これが造精機能障害をきたす一因になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taiki Kato, Mizuno K, Nishio H, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Maruyama T, Ando R, Hayashi Y, Yasui T	4. 巻 ?
2. 論文標題 Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 ?
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.12788.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 加藤大貴, 水野健太郎, 西尾英紀, 安井孝周, 林祐太郎
2. 発表標題 思春期の停留精巣モデルラットにおける血液精巣関門関連タンパクの発現解析
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 大貴、水野 健太郎、西尾 英紀、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 思春期停留精巣モデルラットにおける血液精巣関門構成タンパクClaudin11の発現と局在
3. 学会等名 第28回日本小児泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----