

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18689039
 研究課題名(和文) 遺伝子導入を用いた精子形成の試みと男子不妊臨床応用に向けた基礎的研究
 研究課題名(英文) Gene transfer to sperm and testis: future prospects of gene therapy for male infertility.
 研究代表者 小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：60305539

研究成果の概要：

アデノウイルスベクターは男子不妊症治療を前提とした精巣内遺伝子導入法としては最も優れた遺伝子導入法であることを明らかにした。DAX-1 および Ad4BP/SF-1 をアデノウイルスベクターに組み込み、精巣体細胞への遺伝子導入を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	10,600,000	3,180,000	13,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：男子不妊症、精巣、遺伝子導入、転写因子

1. 研究開始当初の背景

遺伝子工学の進歩は、遺伝性疾患を遺伝子レベルで捉えることを可能としたが、分子病態の解明や遺伝子診断だけにとどまらず、その技術を治療にまで活かそうという発想が生まれてきた。今日では、一部の癌や遺伝性疾患に対して実際に遺伝子治療が試みられ、泌尿器科領域にもそれらの技術が応用されている。これまでに報告されている精巣内への遺伝子導入の目的は、トランスジェニックマウスの新しい作製方法や精子形成に關与する遺伝子の機能解析を行うことにあった。しかしながら、将来的な遺伝子治療を目的とする検討は行われていない。私たちはこれまで

に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など様々な方法で精巣へ遺伝子導入を試み、それぞれの遺伝子導入方法により、遺伝子発現の局在や強度が異なることを見いだした。また、現在アデノウイルスベクターを用いた DAX-1 の精巣内遺伝子導入については、平成 15 年度文部科学省科学研究費の補助を受け継続中にある。今回の研究は Ad4BP/SF-1 および DAX-1 を遺伝子導入することにより、in vitro、in vivo、ex vivo の3通りの方法で精子形成の誘導を試み、男子不妊症の新しい治療方法として位置づけけることが可能になる。

2. 研究の目的

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。その原因としては、①女性の高学歴化、②晩婚化、③未婚化、④住環境の問題などが挙げられるが、そういった社会的要因のほかにも、環境ホルモンが生殖能力を低下させ、不妊症を引き起こす可能性が問題提起されている。不妊症は、拳児を希望されながらそれがかなわず、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。

一方、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つて、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。

3. 研究の方法

これまでに実験動物の精巣に遺伝子導入を試みてきたこと、また、転写因子DAX-1を中心とした転写因子が精子形成に深く関わっていることを証明し研究を進めてきたので、

- ① 転写因子Ad4BP/SF-1およびDAX-1の *in vitro* 遺伝子導入による造精機能への影響
 - ② 不妊症モデルマウスへの各種遺伝子導入法を用いた転写因子Ad4BP/SF-1およびDAX-1の遺伝子導入
 - ③ 新生仔精巣への *ex vivo* での転写因子Ad4BP/SF-1およびDAX-1の遺伝子導入と不妊症モデルマウスへの精巣移植
- これらの結果を基に、ヒト男子不妊症への遺伝子治療の可能性について検討したい。

4. 研究成果

(1) Ad4BP/SF-1 および Dax-1cDNA 遺伝子作製

①全長 Dax-1cDNA の作製

マウス胎仔精巣より mRNA を抽出し、オリゴ(dT)プライマー、ランダムプライマーによって逆転写反応を行い cDNA を合成。5'、3' プライマーを作製した後、

cDNA を鋳型に PCR を行い、Ad4BP/SF-1 および Dax-1 遺伝子の全長を増幅した。得られた cDNA をプラスミドベクターに組み込み、大腸菌にトランスフォーメーション。増やして回収後、挿入断片の一部をシーケンスした後配列情報と比較して一致するかを確認した。

②組み換えアデノウイルスの作製

COS-TPC 法を利用した組換えアデノウイルス作製キット Adenovirus Expression Vector Kit (TaKaRa Code 6150) を用いてアデノウイルスベクターを作成した。

(2) 培養細胞への DAX-1 遺伝子導入

①マウスセルトリ細胞およびライディッヒ細胞の初代培養

8-10 週齢の ICR マウスにブズルファンを投与し、完全に精母細胞、精子細胞、精子を精巣から除去した後セルトリ細胞とライディッヒ細胞を抽出した。

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ヒ細胞を共培養し①カチオニックリポフェクション法、②アデノウイルスベクター法を用いて、DAX-1 の遺伝子導入を行った。DAX-1 の発現を RT-PCR と免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング法により確認した。発現場所はセルトリ細胞とライディッヒ細胞であった。

(3) セルトリ細胞およびライディッヒ細胞株である TM-3 および TM-4 への DAX-1 遺伝子導入

マウスセルトリ細胞およびライディッヒ細胞株である TM-3 および TM-4 にアデノウイルスベクターにより DAX-1 と Ad4BP/SF-1 の遺伝子導入を行った。それぞれの細胞から mRNA を抽出し、セルトリ細胞特異的に発現する遺伝子とライディッヒ細胞に特異的に発現する遺伝子を 20 種類ずつ RT-PCR により発現を半定量したのち、その中で増加および減少したと思われる遺伝子数種類を絞って、TaqMan 法による定量的 RT-PCR を行い発現の増減を確認した。その中で SCF の発現が上昇しており現在 DAX-1 のと関係について、発現機能解析を行っている。

(4) ラット精巣への Ad4BP/SF-1 および DAX-1 遺伝子導入 (*in vivo* 遺伝子導入)

ラット精巣に対して精細管内注入法および精巣内注入法によりアデノウイルスベクターを用いて DAX-1 遺伝子導入を行った。また停留精巣モデルラットを用いて現在精子形成への影響について検討を行った。造精機能の回復は認めず、機械的と思われる細胞障害を認めたため、現在遺伝子導入方法について

再度検討中である。

(5) マウス精巣へのAd4BP/SF-1およびDAX-1遺伝子導入 (ex vivo 遺伝子導入)

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、培養液内でGFP由来の細胞の精細管が再構築されることを確認した。再構築された精細管に遺伝子導入を行い、精巣内に細胞移植したところ、精巣内に遺伝子発現が残存することがわかった。

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 27 件)

- ① Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Long-term physical, hormonal and sexual outcome of males with disorders of sex development. *J Pediatr Surg.* in press. 査読有り
- ② Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic diagnosis and treatment of a phenotypic girl with a mosaic 45,X0/46,X, idic(Y) mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg.* 44:e1-3, 2009. 査読有り
- ③ Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF-kappaB associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model. *Urology.* 73:389-93, 2009 査読あり
- ④ Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K, Masui S, Nishinakamura R. Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of integrin alpha8 and aquaporin-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 45:62-68, 2009. 査読有り
- ⑤ Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol.* 181:1330-1337, 2009. 査読有り
- ⑥ Iwatsuki S, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Detection of ectopic ureteral insertion to vagina with hypoplastic ectopic kidney by computed tomography with three-dimensional imaging. *Urology.* 73:505-506, 2009. 査読有り
- ⑦ Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic orchiectomy and subsequent internal ring closure for extra-abdominal testicular nubbin in children. *Urology.* 73:515-519, 2009. 査読有り
- ⑧ Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno K, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Gene transfer to sperm and testis: future prospects of gene therapy for male infertility. *Curr Gene Ther.* 8:121-34, 2008 査読あり
- ⑨ Umemoto Y, Sasaki S, Kojima Y, Kaneko T, Yanai Y, Kohri K. A case of azoospermia with Kippel-Feil anomaly. *Int J Urol.* 15:188-9, 2008. 査読有り
- ⑩ Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukui Y, Koopman K, Morohashi K-I, Kohri K. Upregulation of SOX9 in human SRY-negative XX males. *Clin Endocrinol.* 68:791-9, 2008 査読有り
- ⑪ Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Early orchiopexy improve the subsequent testicular development and spermatogenesis in the experimental cryptorchid rat model. *J Urol.* 179:1195-9, 2008. 査読有り
- ⑫ Kojima Y, Hayashi Y, Kurokawa S, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K. No evidence of germline transmission by adenovirus-mediated gene transfer to mouse testes. *Fertil Steril.* 89:1448-54, 2008. 査読有り
- ⑬ Kaneko T, Sasaki S, Umemoto Y, Kojima Y, Ikeuchi T, Kohri K. Simulated conditions of microgravity increases progesterone production in I-10 cells of Leydig tumor cell line. *Int J Urol.* 15:245-50, 2008 査読有り
- ⑭ Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Maruyama T, Tozawa K, Kohri K. Modified foreskin reconstruction for distal hypospadias and chordee without hypospadias. *Int J Urol.* 2008 15:646-8, 2008. 査読有り
- ⑮ Kaneko T, Kojima Y, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Usefulness of transcription factors Ad4BP/SF-1 and

- DAX-1 as immunohistologic markers for diagnosis of advanced adrenocortical carcinoma. *Horm Res.* 70:294-299, 2008. 査読有り
- ⑯ Kamisawa H, Kojima Y, Hayashi Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K. Evaluation of preoperative testicular volume in Japanese children with unilateral cryptorchidism. *Int Urol Nephrol.* 40: 977-81, 2008. 査読有り
- ⑰ Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kohri K. Achieving a natural glanular meatus for distal hypospadias with a narrow and shallow plate: tubularized incised plate versus modified Barcat repair. *Int J Urol.* 15:616-20, 2008. 査読有り
- ⑱ Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Maruyama T, Kohri K. Can a slit-like meatus be achieved with the V-incision sutured meatoplasty for onlay island flap hypospadias repair? *BJU Int.* 99:1479-82. 2007. 査読有り
- ⑲ Hayashi Y, Yasui T, Kojima Y, Maruyama T, Tozawa K, Kohri K. Management of urethral calculi associated with hairballs after urethroplasty for severe hypospadias. *Int J Urol.* 14:161-3, 2007. 査読有り
- ⑳ Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Influence for testicular development and histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. *Int J Urol.* 14:67-72, 2007. 査読有り
- ㉑ Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kurokawa S, Maruyama T, Kohri K. Neo-modified Koyanagi technique for the single-stage repair of proximal hypospadias. *J Pediatr Urol.* 3:239-242, 2007. 査読有り
- ㉒ Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Kurokawa S, Tozawa K, Kohri K. Ventral based dartos flap for the prevention of the urethrocutaneous fistula urethroplasty. *Int J Urol.* 14:725-728, 2007. 査読有り
- ㉓ Mizuno K, Tokumasu A, Nakamura A, Hayashi Y, Kojima Y, Kohri K, Noce T. Genes associated with the formation of germ cells from embryonic stem cells in cultures containing different glucose concentrations. *Mol Reprod Dev.* 73:437-45, 2006. 査読有り
- ㉔ Kojima Y, Sasaki S., Hayashi Y., Umemoto Y., Morohashi K-I., Kohri K. Role of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 in steroidogenesis and spermatogenesis in human testicular development and idiopathic azoospermia. *Int J Urol*, 13: 785-793, 2006. 査読有り
- ㉕ Hayashi Y., Kojima Y, Mizuno K., Nakane A., Maruyama T., Kohri K. Mathieu and Barcat repair with a V incision sutured meatoplasty for secondary hypospadias surgery. *Int J Urol*, 13: 733-737, 2006. 査読有り
- ㉖ Kojima Y, Hayashi Y., Mizuno K., Kurokawa S., Sasaki S. Kohri K. Assessment of serum FSH level and testicular volume for prediction of future paternity in pubertal boys who had bilateral orchiopexy in childhood. *J Urol*, 175:2290-2294, 2006. 査読有り
- ㉗ Hayase M., Kojima Y, Maruyama T., Hayashi Y., Kohri K. Pseudo-clitromegaly associated with prepubic sinus. *Int J Urol*, 13::1031-1032, 2006. 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

- ① Umemoto Y, Sasaki S, Kojima Y, Kubota H, Kaneko T, Hayashi Y, Kohri K. Gene Transfer to Mouse Testes by Electroporation and Its Influence on Spermatogenesis. The 103rd American Urological Association, 2008. 5. 17-22, Orlando
- ② Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Imura M, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Hayashi Y, Kohri K. Identification of differential expressed genes associated with testicular descent using PCR-based suppressive subtractive hybridization and relationship to germ cell maturation The 103rd American Urological Association, 2008. 5. 17-22, Orlando
- ③ Kurokawa S, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Hayashi Y, Kohri K. Distribution of Gene Expression on Genital Tubercles in the Hypospadiac Rat The 103rd American Urological

- Association, 2008.5.17-22, Orlando
- ④ Kato T, Kojima Y, Shibata Y, Imura M, Mizuno K, Maruyama T, Hayashi Y, Kohri K, Usefulness of MR fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted imaging for the diagnosis of non-palpable testes The 103rd American Urological Association, 2008.5.17-22, Orlando
- ⑤ Umemoto Y, Sasaki S, Hayase M, Kojima Y, Kubota Y, Kohri K: Participation of apoptosis in the mechanism of dysfunction of spermatogenesis after vasectomy. 29th Congress of the Societe Internationale d' Urologie, 2007.9.2-6, Paris
- ⑥ Imura M, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Nakane A, Mizuno K, Maruyama T, Iwase Y, Kohri K: Evaluation of the long-term function outcome with uroflowmetry: The meatal-based flip-flap repair for distal hypospadias. 29th Congress of the Societe Internationale d' Urologie, 2007.9.2-6, Paris
- ⑦ Nakane A, Hayashi Y, Mizuno K, Kojima Y, Maruyama T, Kohri K: Open pyeloplasty with a minimally invasive incision in children: comparison of skin incision size. 29th Congress of the Societe Internationale d' Urologie, 2007.9.2-6, Paris
- ⑧ Kojima Y., Hayashi Y., Kurokawa S., Mizuno K., Sasaki S., Kohri K.: No evidence of germline transmission by adenovirus-mediated gene transfer to mouse testes. The 102nd American Urological Association, 2007.5.19-25, Anaheim
- ⑨ Kurokawa S., Kojima Y., Mizuno K., Hayashi Y., Kohri K. Gene expression profiling of urethral development in the hypospadiac rat. The 102nd American Urological Association, 2007.5.19-25, Anaheim
- ⑩ Maruyama T., Hayashi Y., Kojima Y., Kohri K. Clitoral hypertrophy after neuro-vascular bundle preserved reduction clitoroplasty in congenital adrenal hyperplasia. The 102nd American Urological Association, 2007.5.19-25, Anaheim
- ⑪ Kojima Y., Hayashi Y., Sasaki S., Kohri K.: Correlation between clinical findings and expression of transcription factors and growth

factors implicated in sexual differentiation and steroidogenesis in testicular tissue of XX sex reversal patients. The 101th American Urological Association, 2006.5.20-25, Atlanta

[図書] (計1件)

- ① Kojima Y., Sasaki S, Kohri K. Therapeutic options: Current research and future prospects for gene therapy in andrology. Hargreave T, Comhaire F, Schill W-B (eds) In: Andrology for clinician. Springer, Heiderberg, Germany, 2006 592-598

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 習得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 代表研究者

小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
講師
研究者番号: 60305539

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし