

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791104

研究課題名（和文） 精細管内微小環境モジュレーションによる精子形成細胞増殖能の検討

研究課題名（英文） spermatogenesis and micro-environment within seminiferous tubules

研究代表者

前田 雄司（MAEDA YUJI）

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：20377394

研究成果の概要：

精子形成回復に有用と考えられる種々の候補因子を探索する研究であり，目的の因子と考えられる候補をいくつか同定したが，実際に精子形成促進に応用できるかどうかは未検証．

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,300,000 | 0 | 2,300,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 270,000 | 3,470,000 |

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：アンドロロジー

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する強力な抗癌化学療法は，精子形成すなわち妊孕能に大きな影響をおよぼす．使用される抗癌剤の種類や使用量によっては，治療終了後数年を経ても精液所見が自然妊娠可能なレベルにまで回復しないことも多い．現状では治療前の精子凍結保存や生殖補助技術を駆使することによって拳児そのものは可能なこともあるが，患者が小児の場合は，これらの治療法を適用すること自体，問題が多い．思春期前で成熟精子が産

生される以前の患児の場合，凍結保存に供する精子が回収できないことから，現時点でサルベージのための確立された手段がない．その一方で近年，小児血液腫瘍に対する治療成績の向上に伴い，生殖可能年齢まで生存する症例が増加しており，寛解後の妊孕性回復は大きな問題となっている．しかし注目度が高いにもかかわらずダメージを受けた精子形成の回復過程に関する基礎的研究は進んでおらず，精子形成回復における主要なメカニズムについての十分な理解が得られていな

い。ごく最近になり小児患者に対する精子形成救済手段として、精子形成細胞移植や精巣組織移植などの技術について動物実験による基礎的な研究が一部の専門家によって報告され始めた。これらの研究が臨床応用可能となるには、クリアすべき2つの問題があると考えられる。1つは、移植に供される精子形成細胞・精祖幹細胞の培養技術や保存技術などの確立であり、もう1つはレシピエント側の精細管内環境（ホルモンレベル、セルトリ細胞機能、精祖幹細胞 niche など）の改善である。

我々は後者の「精細管内微小環境の改善」に注目し、いかにして「精細管内微小環境」を精祖幹細胞の self-renewal, 分化増殖に最適化していくかについて研究を開始している。同様な視点から、これまで諸家により精子形成回復時の性ホルモンによる制御などの試みが報告されているが、後続研究や十分な追試が不十分であった。たとえば抗癌剤処理や放射線照射によって精巣にダメージを与えたラットにゴナドトロピン放出ホルモンのアンタゴニストを投与し、精巣内テストステロン濃度が低くコントロールすることによって精子形成の回復が促進されるということが報告されているが、実際の臨床使用に際して、とくに患者が小児の場合、施行にあたり問題が多く未だ現実的ではない。

哺乳類の精子形成は、複雑で様々な環境因子に影響を受ける。治療目的で投与された抗癌剤などにより一旦、障害を受けた精巣は、数ヶ月～数年に及ぶ時間をかけて、失われた精子形成を回復しようとする。これらの回復機序について、これまで系統的な研究は限られたものであった。

2. 研究の目的

精子形成回復に有用と考えられる種々の

候補因子を同定し、それら候補因子の精細管内注入による動物実験を用いて、精子形成回復への影響を検証する。

in vitro および in vivo での精祖幹細胞の self-renewal に必要と考えられるいくつかの成長因子(候補として, glial cell line-derived neurotrophic factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, leukemia inhibitory factor など) から, ダメージを受けた精子形成の回復をサポートしそうなものを選択し, 治療に応用できる可能性のあるものがあるかどうか, 精子形成回復マウスモデルと精巣精細管直接注入法による精細管内微小環境操作により検証する。

3. 研究の方法

・抗癌剤によって精子形成障害を受けた精巣組織と正常精巣組織のプロテオーム比較することにより, 「精子形成関連因子」の同定を試みる。

・最終的に絞り込まれた「精子形成関連因子」については実際に精子形成回復マウスの精巣に投与することで, 精子形成回復を補完することが可能かどうかの検証を行う。このとき精細管内の微小環境を体循環による目的組織内濃度低下や血液精巣閉門などの影響を排除するために, 精細管内直接注入法を用いて検討する。すでに我々は精細管内直接注入法と精子形成回復マウスを用いて精子形成過程で生じるアポトーシス細胞の貪食除去について報告しており, これらの手技は本研究の効果検証に非常に好都合である。

・精細管内直接注入法(マイクロインジェクション)

原法は Brinster らが開発した精巣精細管への spermatogonial stem cell transplantation に記載された方法で, マウスを麻酔下に手術し精巣を体外に取り出し

たのち、精巣上体と精巣網をつなぐ輸尿管より細径マイクロピペットを実体顕微鏡下に挿入し目的物質を精細管内へ注入する。この手技は難易度が高く、習得するまでに時間を要するが、本研究の研究代表者は、これまで行ってきた研究のなかで既に精細管内マイクロインジェクションを習得・使用しており、その再現性・手技の安定性においても問題はないと考えている。

・精子形成回復モデルマウス

本モデルに関しても、すでに確立されたもので実際にこれまでの研究のなかで使用されている。具体的には、抗癌剤（ブスルファン）を一定量、経腹腔内投与すると4~8週後には精細管内の精子形成細胞がほとんど消失し、その後12週くらいで精子形成が回復してくるモデルマウスである。精子形成回復の評価は、精細管注入12週後に精巣を摘出しブアン液固定・HE染色にて精巣組織の評価を行う。また精巣上体精子数も同時にカウントする。コントロールとの比較により有意な精子形成回復を認めるかどうか総合評価する。

4. 研究成果

有望ないくつかのタンパクが差分解析により同定されたが、それらがどのくらい精子形成に実際に寄与しているかについては未検討のままである。

今後は「精子形成回復モデルマウス」を使用し、本研究で得られた精子形成回復関連タンパクもしくはその機能的作動薬を「精細管内直接注入法（マイクロインジェクション）」にて精巣精細管内投与し、その精子形成回復に与える影響・効果を判定検証することで、発見したタンパクの精子形成回復に与える効果を検討し明らかにしたい。以前我々が報告した研究により、アポトーシス精子形成細

胞の貪食除去が精子形成の再構築に必要であることが明らかになった（Cell Death and Differentiation 2002, 9; 742-749）。これらの研究結果から確立された「精細管内直接注入法（マイクロインジェクション）」や「精子形成回復モデルマウス」は、非常に有用なツールとなる。とくに「精細管内直接注入法（マイクロインジェクション）」は、精巣精細管内の微小環境を直接コントロールすることに関していえば、従来の投与経路に比べて圧倒的に有利かつ理想的である。精巣には血液精巣関門とよばれるバリアが存在し、体循環から精巣精細管内への物質流入を制限しているため経口、経静脈、経腹膜などの従来の投与方法では目的物質の十分な精細管濃度を達成することが困難な場合がしばしばあった。「精細管内直接注入法（マイクロインジェクション）」は、それらの問題点を克服しており、精子形成研究の方法論に新たな可能性と発展性を与えた。同様に、「精子形成回復モデルマウス」はコントロールマウスとの比較でも精子形成回復の程度を評価することが可能であるが、上記の「精細管内直接注入法（マイクロインジェクション）」と組み合わせることにより、同一個体中の2つある精巣のうち、一方を目的物質の注入に、もう一方をコントロールに設定することで、より個体差によるバイアスを排除できるという点で有用である。

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 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)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 雄司 (MAEDA YUJI)

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：20377394

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし