

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09712

研究課題名(和文) 単一細胞遺伝子解析によるヒト造精機能障害の分子機構の解明

研究課題名(英文) Single cell transcriptome analysis in men with non-obstructive azoospermia

研究代表者

白石 晃司 (Koji, Shiraishi)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00535255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Gene ontology解析およびgene enrichment解析にてこれまで20例での検討結果から、1)DNA合成低下型、2)レセプター発現低下型、3)ストレス反応低下型、4)体細胞型、などのクラスター分類が可能であった。

DNA合成低下型においては、DNA合成を促進すべくゴナドトロピン刺激による治療が可能であった。レセプター発現低下型においては、精巣内テストステロン濃度は低く、精巣内エストラジオール濃度が高かった。つまりアロマトラーゼ阻害剤の投与による造精機能障害改善効果が期待できた。これらの結果から男性不妊におけるprecision medicineの可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた結果は無精子症のみならず一般的な乏精子症や精子無力症の治療にも応用可能と考えられる。究極的には国家的問題である少子化対策に対する基盤研究ともなりえる。単一細胞トランスクリプトーム解析は、精巣内内分泌環境や臨床的背景および精巣の組織学的所見などを統合するといった新しい観点からの解析により、NOAにおける造精機能障害の病態が俯瞰でき、新規薬物療法の開発を見出す手がかりとなった。

研究成果の概要(英文)：Gene ontology and gene enrichment analyses have revealed that spermatogonia in men with non-obstructive azoospermia are categorized into 4 clusters: 1) Impaired DNA synthesis, 2) impaired receptor expression, 3) impaired stress response and 4) somatic cell type.

In men with cluster 1, gonadotropin treatment to increase spermatogonia DNA synthesis was effective to stimulate spermatogenesis. In cluster 2, aromatase inhibitor may be potentially effective to improve spermatogenesis. Taken together these results, transcriptome analysis using human spermatogonia may open a window toward precision medicine in male infertility.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：精祖細胞 トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

男性不妊症で頻度の高い非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia; NOA) において顕微鏡下精巣内精子採取術 (micro-TESE) による精子採取率は 30~40% と難治であり、精子が採取できなかった NOA については治療法はない。造精機能障害の分子メカニズムを探るべく、次世代シーケンサー (next-generation sequencer: NGS) を用いたヒト精巣組織の網羅的遺伝子解析 (トランスクリプトーム解析) にて、23,615 個の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、NOA においては細胞増殖関連遺伝子群の発現が低下し、私たちが同定したヒストン H3.5 の発現低下を含めエピジェネティクス制御の破綻が生じていた (Shiraishi K *et al.* *Andrology* 2016, Urahama T *et al.* *Epigenet Chromatin* 2016)。精子形成においては細胞の分化・増殖が精子形成に重要な役割を担い (Shiraishi K *et al.* *J Urol* 2017)、その過程においてヒストンを中心としたエピジェネティクス制御が中心的な役割を果たしていることが私たちの最近の研究で判明した (Shiraishi K *et al.* *Andrology* 2016, Ueda J *et al.* *Cell Rep* 2017, Urahama T *et al.* *Epigenet Chromatin* 2016)。

私たちがこれまでに行ってきた網羅的遺伝子解析は、不均一な細胞集団の平均を観察しているにすぎず、個々の細胞の分化・増殖能や細胞の運命についての解析には限界があり、以下の問いが浮き彫りにされた: 1) 造精機能障害を生じる個々の精細胞、特に精祖および精母細胞、の遺伝子発現および細胞内シグナルパスウェイについては不明である。2) Leydig や Sertoli 細胞からのパラクリン因子が精細胞の分化・増殖に必須であるが、個々の精細胞にどのようなタイミングおよび濃度が必要かどうかは不明である。3) *In vitro* ヒト精細管培養による精子形成は成功していないが、精細胞がどの成熟段階で分化・増殖が停止し、細胞死に至るかといったメカニズムについては不明である。

2. 研究の目的

NOA に対しサルベージ内分泌療法はある程度有効であるが、投与薬剤量に制限があり、2 回目の micro-TESE が必要であるため患者負担は多大である。1 回目の TESE 時に採取した精細管を培養し、精子形成が可能であれば NOA 患者にとり福音であり、*in vivo* よりも効率的にかつ生理量以上の薬剤の投与が可能である。将来的に *in vitro* 精子形成の確立を目的とするにあたり、多彩な病態を含む NOA において一律な培養条件で精子形成が行えるとは考えられないため、まず造精機能障害のメカニズムをより詳細に検討する必要がある。私たちが行ってきた網羅的遺伝子解析は、その構成成分の 90% が精細胞といえども精巣組織全体の bulk 解析で分化段階の異なる細胞においての詳細な解析は不可能であり組織全体の平均値として解析しているだけであった。したがって造精機能障害のメカニズムをより詳細に検討するために単一細胞遺伝子発現解析により、精祖および精母細胞を用いた単一細胞での網羅的遺伝子解析を開始した。我々の予定している単一細胞トランスクリプトーム解析は、一般的に行われている sorting やバーコード標識などを行うものではなく、倒立顕微鏡下に形態学的に精祖細胞を採取するものであり、正確には単一細胞腫トランスクリプトーム解析である。この新規技術の開発も本研究の目的とする。

NOA 症例の精祖および精母細胞における遺伝子発現の不均一性と分化・増殖停止にいたる分子メカニズムを単一細胞トランスクリプトーム解析により明らかにする。また研究の進捗状況次第では、精祖細胞以外の精細胞やライディッヒ細胞やセルトリ細胞などの体細胞を採取し、それらについての単一細胞トランスクリプトーム解析が可能かどうか検討する。

3. 研究の方法

当院および関連施設にて病理組織学的に early maturation arrest と診断された NOA 症例で本研究に同意の得られた NOA 症例および正常コントロールとして精路再建を行う閉塞性無精子症症例を対象とする。採取された精細管から、倒立顕微鏡下で構成細胞の確認を行い、最低 100 個の精祖細胞を顕微鏡下にピペットにて採取する。このステップは morphology-based single cell isolation として最近私たちが考案し、安定して行っている。次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2500) を用いた scRNA-seq を行う。Gene ontology 解析および gene set enrichment 解析にて、精祖細胞の遺伝子発現パターンを分類する。さらに患者背景 (内分泌学的データ、染色体検査、精巣容積、など) と比較することで、各クラスターの臨床的特徴についての検討を行う。さらに各 DNA 合成低下型であれば、細胞増殖の評価、レセプター低下型であればアンドロゲン受容体の発現、ストレス反応低下型であれば精巣内 anti-oxidant の発現、等のクラスターの特徴の検証を、RT-PCR や免疫染色などで適宜行う。

4. 研究成果

Gene ontology 解析および gene set enrichment 解析にてこれまで 20 例での検討結果から、1) DNA 合成低下型、2) レセプター発現低下型、3) ストレス反応低下型、4) 体細胞型、などのクラスター分類が可能であった。

Micro-TESE時に精巣白膜を切開した際に溢流する液体を、intratesticular fluid と称し、それを採取しテストステロンおよびエストラジオールを測定することで精巣内内分泌環境を評価しえたことを報告した (Shiraishi K *et al.* *J Clin Endocrinol Metab* 2021)。血清および精巣内のホルモン値は約 100 倍程度異なり、かつ相関しないことが判明し、精細胞やライディッヒおよびセルトリ細胞の機能を評価するためには intratesticular fluid 解析の有用性および重要性が示唆された。例えば、上記のレセプター発現低下型に分類される症例においては、精巣内テストステロン濃度は低く、精巣内エストラジオール濃度が高かった。つまりアロマトラーゼ阻害剤の投与による造精機能障害改善効果が期待できた。

クラスター 1 においては精祖細胞における DNA 合成を促進すべくゴナドトロピン刺激による治療が可能であった。これらの結果から、今回我々の行った精祖細胞のトランスクリプトーム解析により男性不妊における precision medicine の可能性が見出された。

Gene ontology解析による精祖細胞のクラスター分類

 <p>DNA合成低下型</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■最も多いタイプ（本研究の35%） ■精細管のheterogeneity強く、精子採取率が高い。 ■ゴナドトロピンへの反応が良く、ホルモン療法が有効（DNA合成能等の回復か）。 ■精祖細胞の数が比較的多く形態も典型的。
 <p>レセプター発現低下型</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■精巣が小さく、テストステロン値も低い。 ■アンドロゲンレセプターの発現低い。 ■精子採取不可能 ■性腺発育異常など先天性異常と関連か。
 <p>ストレス反応低下型</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■抗酸化ストレス関連分子やHSP群などの分子シャペロン関連分子の著明な低下を認める。 ■精巣内anti-oxidantの発現低下.抗酸化剤等による治療の可能性。
 <p>体細胞型</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■年齢やBMIが高く、生活習慣病などの全身疾患と関連あり。 ■ストレス反応低下型の進行型か。 ■精細管が脆弱（TESEの際に容易に切れる）。 ■基底膜や間質の線維化著明。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koji Shiraishi, Shintaro Oka, Hideyasu Matsuyama	4. 巻 106
2. 論文標題 Testicular Testosterone and Estradiol Concentrations and Aromatase Expression in Men with Nonobstructive Azoospermia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1803-1815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/clinem/dgaa860	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 -

1. 著者名 Koji Shiraishi	4. 巻 47
2. 論文標題 Genome medicine in male infertility: From karyotyping to single cell analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics & Gynecology Research	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石晃司
2. 発表標題 非閉塞性無精子症における精巣内アロマトラーゼの発現
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第39回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白石晃司
2. 発表標題 単一細胞トランスクリプトーム解析を用いたヒト精祖細胞の遺伝子発現プロファイリングによる造精機能障害のメカニズムの解明
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白石晃司
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析による造精機能障害の解明
3. 学会等名 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白石晃司
2. 発表標題 非閉塞性無精子症における精巢内アロマターゼの発現
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0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
研究分担者	原田 哲仁 (Harada Akihito) (60596823)	九州大学・生体防御医学研究所・准教授 (17102)	
研究分担者	大川 恭行 (Ohkawa Yasuyuki) (80448430)	九州大学・生体防御医学研究所・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------