

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09529

研究課題名(和文) 新規要因としての先天性CMV感染による精子形成障害の機序解明と予防的治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of disrupted spermatogenesis caused by congenital CMV infection as a novel factor and its application to prophylactic treatment

研究代表者

小川 総一郎 (Ogawa, Soichiro)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50554200

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)：ヒト無精子症患者における先天性CMV感染の有無についての解析を先行させることとした。しかし、ヒトの精巣および乾燥臍帯組織の収集に関して、新型コロナウイルス感染症拡大に伴って、令和3年度、4年度ともに対象となる男性不妊症患者の手術が軒並み延期、中止となってしまった。そこで、過去に収集して保管済みの乾燥臍帯中のCMV感染の有無を解析した。しかし、nested PCR、RT-PCRによる解析では、CMV-DNAの検出には至らなかった。また、精巣の免疫組織化学染色において、Immediate early、UL135の染色は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での仮説が証明できれば、特発性非閉塞性無精子症の病因の一部が解明されたことになり、出生後に治療介入することによって、従来であれば無精子にいたっていた症例の妊孕性を担保できる可能性もあった。しかし、現在までの進捗では精子形成に対するサイトメガロウイルスの先天性感染の可能性を証明できていないため、社会的意義を見出すにはいたっていない。

研究成果の概要(英文)：We decided to precede the analysis of congenital CMV infection in patients with obstructive or non-obstructive azoospermia. However, the collection of human testes and dried umbilical cord tissue was delayed or cancelled in both FY2021 and FY2022 due to the spread of COVID-19. Therefore, we analyzed the presence of CMV infection in dried umbilical cords that had been collected and stored in the past. However, analysis by nested PCR and RT-PCR failed to detect CMV-DNA. In addition, immunohistochemical staining of the testes did not confirm Immediate early or UL135 staining.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：サイトメガロウイルス 無精子症

1. 研究開始当初の背景

近年、生殖医療に関わる基礎研究の発達は目覚ましく、生殖幹細胞や胚性幹細胞、人工多能性幹細胞から精子形成を誘導することも可能となった。しかし、これら技術を駆使し精子形成に成功しても、男性不妊症の根本的な治療にはなりえず、原因解明が求められている。近年、サイトメガロウイルス (CMV) は精巣胚細胞でも増殖可能であることが明らかとなった。CMV が精神発達遅滞や聴覚障害などの不可逆的な重度の合併症をきたすのは、先天性感染した場合のみである。このことから私たちは、先天性 CMV 感染症が将来の精子形成障害をもたらすのではないかと考え、特発性無精子症患者における先天性 CMV 感染の可能性を探ることとした。

2. 研究の目的

本研究では、原因不明とされている精子形成障害の機序として、サイトメガロウイルス (CMV) の先天性感染が関与している可能性があるのではないかと考え、先天性 CMV 感染による無精子症動物モデルを確立することを目的とした。さらに、このモデル動物を用い、精子幹細胞の機能的寿命と精子形成に関わる細胞の細胞間接着に着目した精子形成障害の発症機序の解明を試み、治療薬開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

先天性 CMV 感染による無精子症モデル動物作製と精巣組織における CMV 局在の同定：モデル動物を用いた機能的、形態的な研究を行う。マウス CMV を増殖させる。齧歯類は胎盤の構造から経胎盤では感染し難い。そこで、生後 24 時間以内のマウス腹腔内にウイルスを注入する。ウイルスを注入したマウスから、生後 8 週の時期に精巣を摘出し、無精子症モデル動物が確立していることを証明する。モデル動物の精巣において、CMV の局在を解析するため、WT-1、SOX9、GATA4、β-HSD、LH レセプター、Calretinin、Pgc-2、SYCP3、Kit を用いた染色と、CMV の前初期遺伝子 IE や UL138、IE72、および UL122/138 から翻訳された IE72、IE86 蛋白に対する抗体を用いた染色により、精巣組織のどの細胞に CMV が感染、潜伏しているか評価する。

先天性 CMV 感染が血液精巣関門/タイトジャンクションに与える影響：血液精巣関門 (BTB) はセルトリ細胞間に存在するタイトジャンクション (TJ) によって成り立ち、精子幹細胞の維持や精子形成に適した微小環境を提供している。そこで、モデル動物の精巣組織を用い、CMV が BTB/TJ を通過することによって精子形成障害が生じていることを、組織学的な見地から考察する。TJ の主要な構成成分である Claudin-11 を染色し、その発現量を評価する。モデル動物の精巣において、電子顕微鏡で TJ の構造を観察し、TJ スtrand 構造に変化が生じていないかどうか解析する。

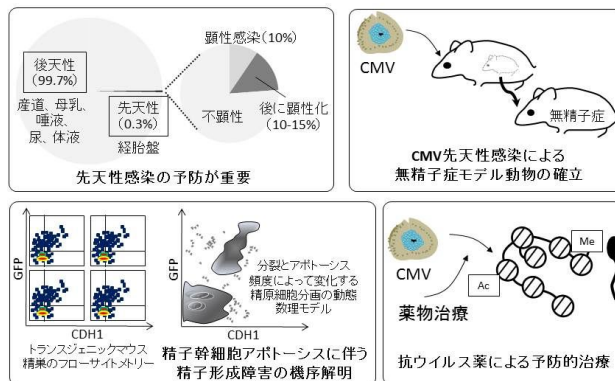
ヒトにおける先天性 CMV 感染による無精子症の可能性と機序解明：精子形成障害患者の保存臍帯の一部 (5mm 片) および無精子症に対する精巣内精子採取術時に採取された精巣組織から DNA を抽出し、定量的 PCR により CMV-DNA の有無を診断する。同時に、Immediate early (IE)、UL138 抗体を用いた免疫組織化学染色も行う。この手法を用い、ヒト無精子症患者の精巣における CMV の局在を解析する。BTB/TJ に着目したヒト CMV 感染による無精子症の機序解明：研究の手法を用い、無精子症の機序を CMV の BTB/TJ 通過という観点から解明する。

先天性 CMV 感染症による無精子症の予防的薬物治療の可能性：作成したモデル動物において、ウイルスの腹腔内投与と同時に抗ウイルス薬、免疫グロブリン製剤、ピリミジン合成阻害剤、生理食塩水を投与し、精子形成障害を予防できるかどうかを、研究と同様の手法で解析する。

4. 研究成果

ヒト無精子症患者における先天性 CMV 感染の有無についての解析を先行させることとした。しかし、ヒトの精巣および乾燥臍帯組織の収集に関して、新型コロナウイルス感染症拡大に伴っ

先天性CMV感染による精子形成障害の予防・治療



て、令和3年度、4年度ともに対象となる男性不妊症患者の手術が軒並み延期、中止となってしまった。そこで、過去に収集して保管済みの乾燥臍帯中のCMV感染の有無を解析した。しかし、nested PCR、RT-PCRによる解析では、CMV-DNAの検出には至らなかった。また、精巢の免疫組織化学染色において、Immediate early、UL135の染色は確認できなかった。

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〕

〔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	佐藤 雄一 (Yuichi Sato) (00706848)	福島県立医科大学・医学部・助手 (21601)	
研究分担者	秦 淳也 (Junya Hata) (00769606)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	錫谷 達夫 (Tatsuo Suzutani) (40196895)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	胡口 智之 (Tomoyuki Koguchi) (40791950)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	小島 祥敬 (Yoshiyuki Kojima) (60305539)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	赤井畑 秀則 (Hidenori Akaihata) (70644178)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	

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
---------	---------