

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21689043

 研究課題名（和文） 男性不妊症における転写因子複合体ネットワークの包括的解明と  
 遺伝子治療への応用

 研究課題名（英文） Transcription factor complex network and application in gene therapy  
 for patients with male infertility

研究代表者

小島 祥敬（KOJIMA YOSHIYUKI）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60305539

研究成果の概要（和文）：補助生殖医療が現在不妊症患者には一般的になされている治療法であるが、可能であれば自然妊娠が望ましい。将来的に男子不妊症患者に対する遺伝子治療によって精子形成が可能となればこれらの問題は解決できるかもしれない。本研究では、将来の男子不妊症に対する遺伝子治療の可能性をめざした基礎的研究を行った。精子形成に関わる遺伝子の情報はさらに必要であるが、将来的に遺伝子治療が男子不妊症に対する治療法として確立することが望まれる。

研究成果の概要（英文）：Assisted reproductive technology is the most appropriate management if a natural pregnancy fails to occur, and this is increasingly used in the treatment of both male and female infertility. However, fertilization is better in vivo than in vitro for male infertility. Clinically, testicular gene therapy may be useful to treat male infertility in the future because it is possible to promote spermatogenesis in male infertility patient. In this study, I tried to perform basic research to realize the gene therapy for male infertility. Although more genetic information about the molecular basis of spermatogenesis will be needed to apply gene therapy for male infertility, these informations may lead to new strategies for the clinical management and gene therapy will provides great benefits for the patients with male infertility in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 4,700,000  | 1,410,000 | 6,110,000  |
| 2010年度 | 8,100,000  | 2,430,000 | 10,530,000 |
| 2011年度 | 5,100,000  | 1,530,000 | 6,630,000  |
| 2012年度 | 2,500,000  | 750,000   | 3,250,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 20,400,000 | 6,120,000 | 26,520,000 |

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：男性不妊症・転写因子・遺伝子導入

## 1. 研究開始当初の背景

我が国が抱える社会的問題のひとつに少子化社会が挙げられる。2005年の国勢調査による確定値を基に計算された同年の出生率は過去最低の1.26人となった。晩産化、無産化が少子化の主な直接原因であるとされており、その背景には現代社会に存在する様々な社会的要因が考えられている。そうした社会背景の一方で、婚姻により夫婦が成立し挙児を望んだとしても10カップルに1カップルが子供を授かることが出来ないといういわゆる不妊症も、社会的問題といっても過言ではない。不妊症の原因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され、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。

男子不妊症は射出した精子濃度によって、乏精子症と無精子症とに大別される。十数年前までは乏精子症に対しては体外授精により挙児の可能性を得ていたが、無精子症に対しては挙児の可能性は極めて困難であった。しかし1990年代前半に開発された卵子細胞質内精子注入法(ICS)により補助生殖医療に革命的变化がもたらされた。ICSは精巣内より精子を採取(TESE)し、採取した精子を直接卵子の細胞質内に注入することにより受精を期待する方法である。つまり射出精子がたとえ0(ゼロ)であっても、理論的には精巣内に精子が1つでも存在すれば、挙児を得る可能性が存在するわけである。今日ではTESE-ICSは無精子症に対する最も一般的な治療として位置づけられている。しかしその反対に、精子形成が不十分で精巣内に精子が1つも存在しなかった場合の治療法は存在しない。またTESE-ICSの様々な合併症や問題点が解決されていないのが現状である。そして正常な性行為の営みの中で挙児を得ることが、夫婦にとっては何よりの喜びであることは言うまでもない。

私達は男子不妊症に対する新しい治療法を模索するために、これまでに実験動物レベルで精巣内遺伝子導入の確立やES細胞からの精子形成細胞の誘導を試み、男子不妊症への治療の応用の可能性の研究を行ってきた。また転写因子DAX-1が精子形成に大きな役割を果たしている可能性について研究を行ってきた。本応募研究においては、プロモーターアレイやマイクロアレイなど網羅的遺伝子解析や新規標的遺伝子の同定および転写因子の遺伝子多型解析を通して、Ad4BP/SF-1およびDAX-1の転写因子複合体ネットワークの包括的な解明および男子不妊症の病態解明、更に、これまでの研究の継続、すなわち転写因子DAX-1

の精巣内遺伝子導入による造精機能の回復およびそのメカニズムの検討、ES細胞を用いたEx vivo遺伝子導入による精巣内体細胞、精子形成細胞の分化誘導系の確立に関する研究を完遂させ、将来的には男子不妊症の遺伝子治療への臨床応用に挑み、TESE-ICSにかわる革命的治療の開発をし、社会的貢献に寄与したいと考えている。

## 2. 研究の目的

本研究期間内に転写因子Ad4BP/SF-1およびDAX-1からみた男子不妊症の病態解明と男子不妊症に対する遺伝子治療の開発を目標に以下について明らかにしたい。

- ① 男子不妊症の病態解明に関する研究
- ② 男子不妊症に対する遺伝子治療に関する研究

## 3. 研究の方法

(1) 不妊症モデルマウスへのアデノウイルスベクターを用いた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(in vivo遺伝子導入)

(1) 不妊モデルマウス精巣へのAd4BP/SF-1およびDAX-1遺伝子導入(in vivo遺伝子導入)：これまでの研究成果を発展させ、アデノウイルスベクターを用いた、Ad4BP/SF-1およびDAX-1の遺伝子導入を行う。発現量および発現期間を確認した上で、造精機能への影響、ステロイド合成への影響を検討する。

(2) 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) 新生仔精巣へのex vivoでの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を行う。

- ① 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、マトリクスゲルを用いてin vitroで精細管の再構築を行う。これらをゲルから細胞塊を採取し正常のマウスに移植。精巣内でGFP由来の細胞の精細管が再構築されることを確認する。
- ② 三次元培養による精巣の再構築と遺伝子導入：遺伝子導入効率の確認後、成人不妊症マウスに遺伝子導入細胞移植を行い、造精機能への影響を検討する。

(3) 培養細胞(セルトリ細胞およびライディッヒ細胞)へのAd4BP/SF-1およびDAX-1遺伝子導入による網羅的遺伝子解析

精子形成細胞およびセルトリ細胞・ライディッヒ細胞共培養下における Ad4BP/SF-1 および DAX-1 遺伝子導入による in vitro 精子形成誘導：精原細胞とセルトリ細胞とライディッヒ細胞を共培養しアデノウイルスベクター法を用いて、Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の遺伝子導入を行う。遺伝子導入後の精原細胞変化について検討する。

(4) プロモーターアレイによる Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の標的遺伝子群の同定：発現している遺伝子の転写調節領域には転写開始複合体が結合していることが知られている。この性質を利用して、この複合体のゲノム DNA の結合部位を調べてみると、既知の遺伝子の転写調節領域だけでなく、遺伝子として同定されていない領域にも結合していることが明らかになる。このプロモーターアレイの技術を応用してセルトリ細胞およびライディッヒ細胞における Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の標的遺伝子を同定する。

#### 4. 研究成果

(1) 不妊モデルマウス精巣への Ad4BP/SF-1 および DAX-1 遺伝子導入 (in vivo 遺伝子導入)：

これまでの研究成果を発展させ、アデノウイルスベクターを用いた、Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の遺伝子導入を行った。アデノウイルスにラット由来の 2 遺伝子のプラスミドを組み込んで行った。精巣網および精細管から遺伝子導入を行う精細管遺伝子導入法と、精巣白膜上から精巣に直接注入する精巣直接遺伝子導入法により、上記遺伝子を精巣内に遺伝子導入した。不妊モデルマウスとして、ブズルファン投与マウスを用いた。遺伝子導入したのち、RT-PCR および western blotting 法により、上記遺伝子の発現を確認した。ラットに特異的な上記遺伝子のプライマーを作成し、定量 RT-PCR によって、ラット由来の上記遺伝子の増加を確認した。さらに、免疫組織化学染色法により、上記遺伝子の発現の局在を検討したところ、精細管遺伝子導入法ではセルトリ細胞に、精巣直接遺伝子導入法にはライディッヒ細胞に、その遺伝子の発現を確認した。造精機能への影響に関しては、精細管の荒廃が非常に強かったためと、投与後の感染が強かったため、造精機能の回復が明らかに認めなかった。より慎重な条件の設定が必要と考えられた。血中の FSH, LH, テストステロン濃度については変化を認めなかった。

(2) 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、マトリクスゲルを用いて in vitro で精細管の再構築を行った。これらをゲルから細胞塊を採取し正常のマウスに移植。精巣内で GFP 由来の細胞の精細管が再構築されることを確認した。

(3) 培養細胞 (セルトリ細胞およびライディッヒ細胞) への Ad4BP/SF-1 および DAX-1 遺伝子導入：DAX1 と蛍光タンパク EGFP の両方を発現するアデノウイルスベクターを作製し、ライディッヒ細胞株 TM3 とセルトリ細胞株 TM4 に遺伝子導入した。アデノウイルスベクターにより TM3、TM4 細胞の核内に Dax1 遺伝子の導入が可能であった。TM3 細胞ではステロイド合成に関わる Arom 遺伝子、TM4 細胞では精子形成細胞の増殖に関わる Scf 遺伝子の発現が有意に亢進していた。

核内転写因子 DAX1 は、ライディッヒ細胞ではエストロゲンの合成制御、セルトリ細胞では SCF の発現制御を行っていると考えられた。思春期以降の精子形成には、セルトリ細胞における DAX1 の発現が密接に関わっている。セルトリ細胞で DAX1 により発現調節された SCF が精子形成細胞に存在する受容体 (C-KIT) に結合し SCF/C-KIT シグナル伝達経路を介することで精子形成を促進している可能性が示唆された。

(4) プロモーターアレイによる Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の標的遺伝子群の同定：発現している遺伝子の転写調節領域には転写開始複合体が結合していることが知られている。この性質を利用して、この複合体のゲノム DNA の結合部位を調べてみると、既知の遺伝子の転写調節領域だけでなく、遺伝子として同定されていない領域にも結合していることが明らかになる。このプロモーターアレイの技術を応用してセルトリ細胞およびライディッヒ細胞における Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の標的遺伝子を同定に試みている。今後男子不妊症精巣における Ad4BP/SF-1 および DAX-1 の標的遺伝子の発現解析、正常精巣および男子不妊症精巣における同定標的遺伝子の発現量について定量 RT-PCR を用い検討を加える予定である。

#### 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 1 1 件)

1. Qin XY, Kojima Y, Kohri K (他 11 名 2 番目) . Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet.* 57:434-41, 2012. 査読有
2. Qin XY, Kojima Y, Kohri K (他 14 名 2 番目) . Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One.* 7, e36711, 2012. 査読有
3. Kamisawa H, Kojima Y, Kohri K (他 3 名 2 番目) . Attenuation of spermatogonial stem cell activity in cryptorchid testes. *J Urol.* 187:1047-52, 2012. 査読有
4. Mizuno K, Kojima Y, Kohri K (他 5 名 2 番目) . Feasible etiology of vanishing testis regarding disturbance of testicular development: Histopathological and immunohistochemical evaluation of testicular nubbins. *Int J Urol.* 19:450-6, 2012. 査読有
5. Nishio H, Kojima Y, Kohri K. (他 5 名 5 番目) Clinical features and testicular morphology in patients with Kallmann syndrome. *Urology.* 79:684-686, 2012. 査読有
6. Moritoki Y, Kojima Y, Kohri K, (他 3 名 3 番目) . Intratesticular pressure after testicular torsion as a predictor of subsequent spermatogenesis-an animal study-. *BJU int.* 109:466-70, 2012. 査読有
7. Iwatsuki S, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K, (他 4 名 2 番目) Endocrine assessment of prepubertal boys with a history of cryptorchidism and/or hypospadias -A pilot study. *J Urol.* 85, 2444-2450, 2011. 査読有
8. Kato T, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K (他 3 名 2 番目) . Findings of MR fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted imaging in the diagnosis of nonpalpable testes. *BJU int.* 107, 290-294, 2011. 査読有
9. Mizuno K, Kojima Y, Kohri K. (他 3 名 2 番目) Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. *Urology.* 77, 251.e1-6, 2011. 査読有
10. Kamisawa H, Kojima Y, Kohri K. (他 3 名 2 番目) Spermatogenesis after

one-stage Fowler-Stephens orchiopexy with an experimental cryptorchid rat model. *J Urol.* 183, 2380-2384, 2010. 査読有

11. Shibata Y, Kojima Y, Kohri K. (他 5 名 2 番目) Optimal cut-off value of contralateral testis size for the prediction of absent testis in Japanese boys with nonpalpable testis. *Urology.* 76, 78-81, 2010. 査読有

[図書] (計 2 件)

1. Kojima Y, Sasaki S, Kohri K. (他 2 名 1 番目) Gene therapy for male infertility; potential and limitation. Lejeune T and Delvaux (eds). In: *Human spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities.* Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp221-242, 2010.
2. Kojima Y, Sasaki S, Kohri K. (他 3 名 1 番目) Therapeutic potential of gene transfer to testis; Myth or reality? Kang C (eds). In: *Gene Therapy Application.* Intech Open Access Publisher, Rijekam, pp279-296, 2011.

[学会発表] (計 7 件)

1. Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, et al: Spermatogonial Stem Cell Activity in Cryptorchid Testes. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012. 5. 19-24, Atlanta(USA)
2. Nishio H, Kojima Y, et al: The role of Jarid1a in spermatogenesis: Evaluation of transcriptional regulation by histone H3K4 methylation. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012. 5. 19-24, Atlanta(USA)
3. Hayashi Y, Mizuno K, Kojima Y et al. : Feasible etiology of vanishing testis regarding disturbance of testicular development; histopathologic and immunohistochemical evaluation of testicular nubbins. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012. 5. 19-24, Atlanta(USA)
4. Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y et al: Spermatogenesis after One-Stage Fowler-Stephens Orchiopexy with an

Experimental Cryptorchid Rat Model.  
American Urological Association  
Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24,  
Atlanta(USA)

5. Mizuno K, Kojima Y, et al: Functional analysis of spermatogonial stem cells in cryptorchidism using EEf1A1 and TPT1 gene expression as indexes of cell differentiation. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)
6. Kurokawa S, Kojima Y et al: Adenovirus-mediated Dax1 gene transfer enhances the function of Sertoli cells via the SCF/C-KIT pathway. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)
7. Mizuno K, Kojima Y et al.: Elucidation of genomic DNA structures distinctive of patients with 46,XX testicular DSD using genome-wide analyses. 32th SIU、2012.9.30-10.4 Fukuoka.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島祥敬 (Kojima Yoshiyuki)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60305539