

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06737

研究課題名(和文) ダウン症候群モデルマウスを用いた精子形成障害の新規原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) A search of novel genes involved in spermatogenesis failure of Down syndrome model mice

研究代表者

若山 友彦 (Wakayama, Tomohiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：70305100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ts65Dnマウスの精巣の精細管には、軽度から高度の精子形成障害が見られた。しかし、精子形成障害のある精細管にも多数の精子細胞が存在することが分かった。また、精巣上体には、野生型よりも少ないが精子も存在した。造精細胞マーカーTRA98やCADM1やEzrin、セルトリ細胞マーカーWT1の免疫組織化学を行なった結果、精細管により造精細胞の分化段階に差が見られ、一部のセルトリ細胞が精細管の内腔に偏在していた。さらに、トリソミー状態にある遺伝子の精巣における発現を定量的RT-PCRで検討し、野生型よりTs65Dnマウスで10個の遺伝子が有意に増加していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症候群では、精子形成障害が生じる。しかし、その原因遺伝子は不明であった。本研究により、ダウン症候群モデルマウスの精巣において、精子形成障害に関連する10個の遺伝子を同定することができた。これらの10個の遺伝子の内、大半の遺伝子は、精子形成における役割が不明であった。本研究結果の学術的意義は、新規の精子形成関連遺伝子を明らかにできたことである。さらに、これらの遺伝子がコードするタンパク質分子の役割が解明できれば、原因不明が多いヒトの男性不妊症の原因究明とその治療法の開発につながる社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome causes abnormal spermatogenesis. In the Ts65Dn mouse, a naturally occurring mutant, a portion of chromosome 16, which corresponds to human chromosome 21, is translocated to chromosome 17, resulting in partial trisomy due to the two normal chromosomes 16 and 17 with the translocation. In this study, we examined abnormal spermatogenesis in Ts65Dn mice of Down syndrome model. Immunohistochemistry was performed to evaluate impaired spermatogenesis. Quantitative RT-PCR were performed to detect the candidate 10 genes involved in abnormal spermatogenesis. Then, we prepared the anti-sera against Pigg and Cbr3 using GST-fusion their proteins as antigen and used them by immunohistochemistry.

研究分野：解剖学

キーワード：ダウン症候群 精巣 精子形成障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の少子化は急速に進み、2016年以降出生数は100万人を割り、2019年は過去最低で86万5239人と報告された(厚生労働省ホームページ)。逆に不妊症は5.5組の夫婦に1組の割合で増加しており(2015年、国立社会保障・人口問題研究所)、政府が不妊症の保険診療を検討している。不妊症の原因の半分は男性側にあるため、1700万人いる25~39歳の男性の中に100万人以上の男性不妊症の患者がいる推計になる。男性不妊症の原因の大半は、精子形成障害であるが、その発症機序や原因遺伝子はほとんど分かっていない。

ダウン症候群は、ヒト21番染色体が3本(トリソミー)になることが原因の染色体異常で、600~800人の出生に1人の割合で生じ、最も高頻度な遺伝病の1つである。晩婚化の影響もあり、高齢出産によりダウン症候群の児の出生率も増加傾向にある。ダウン症候群は、多様な臨床症状を示し、先天性心疾患、神経疾患、白血病、甲状腺疾患のほか、精子形成障害による男性不妊症を生じる。ダウン症候群の発症メカニズムは十分に解明されていないが、3本ある21番染色体上の遺伝子の過剰発現が原因と考えられている。精神疾患の発症においては、21番染色体上のDSCR-1、アミロイド前駆体、DYRK1Aの関与が報告され(Gene Dev 2013, EMBO Rep. 2015)、白血病では、21番染色体の転写因子RUNX1(Cell Reports 2014, Blood 2015, Leukemia 2017)が研究されてきた。ヒト21番染色体の大部分が、マウスでは16番染色体に位置し、この一部が17番染色体に転座したTs65Dnマウスは、ダウン症候群モデルとして神経疾患や白血病の研究に用いられてきた。Ts65Dnマウスの雄は不妊を示すが、その詳細は全く分かっていない。

2. 研究の目的

ヒトの男性不妊症で見られる精子形成障害は原因不明である。ダウン症候群は、ヒト21番染色体のトリソミーであり、21番染色体上の遺伝子が病態の発症に関係する。マウスではヒトの21番染色体は3つの染色体に分配されているが、大部分は16番染色体に配置される。Ts65Dnマウスはヒト21番染色体に対応する部位の一部が17番染色体に転座した自然発生ミュータントである。転座をもった17番染色体と2本の正常な16番染色体があると、トリソミー状態になる。Ts65Dnマウスではトリソミー状態の領域に65個の遺伝子があり、精子形成障害を示して雄性不妊症を生じる。本研究の目的は、Ts65Dnマウスの解析から、精子形成障害の原因遺伝子を同定することである。この原因遺伝子による精子形成障害は、ヒトのダウン症候群で生じるものと同様の機序と考えられ、新しい精子形成障害の機序を解明することにも貢献できる。

3. 研究の方法

ダウン症候群モデル動物であるTs65Dnマウスを用いた。Ts65Dnマウスは、ヒトの21番染色体に対応する16番染色体の領域の一部が17番染色体に転座している。そのため、この転座をもつ17番染色体と2本の正常な16番染色体があると、転座領域がトリソミー状態になっている。そのため、ヒトのダウン症候群のモデル動物と考えられている。トリソミー状態にある領域には、タンパク質をコードする65個の遺伝子が存在している。

まず、Ts65Dnマウスの精巣と精巣上体の組織について、光学顕微鏡および電子顕微鏡により形態学的に解析した。造精細胞、セルトリ細胞のマーカー抗体やマーカーレクチンを用いて、組織化学による解析を行った。

次に、RT-PCR法と定量的RT-PCR法により、精巣で発現が増加している遺伝子を探索した。65

個の遺伝子に対してプライマーを設定し、RT-PCR 法により単一バンドが増幅されることを確認した。RT-PCR 法により Ts65Dn マウスの精巣で発現が増加している遺伝子を選択し、定量的 RT-PCR 法により相対的増加量を測定した。

発現が増加する 10 個の遺伝子について GST 融合タンパク質を作製し、これを抗原としてラットを免疫してそれぞれの遺伝子がコードするタンパク質を認識する抗体を作製した。作製した抗体を用いて、ウェスタンブロット法により、タンパク質レベルの発現の増加量を測定した。さらに、免疫組織化学により、精巣における発現と局在についても観察した。

4 . 研究成果

Ts65Dn マウスの精巣では、軽度から高度に障害された精細管が混在していた。電子顕微鏡で観察すると変性した造精細胞が散見された。変性した造精細胞には、細胞内の空胞の増加や肥大化したミトコンドリアが認められた。また、セルトリ細胞にも異常が認められ、小胞体由来と考えられる空胞が増加していた。PNA レクチン組織化学により、Ts65Dn マウスの精巣でも精子細胞が認められたが、精細管の障害により精子細胞数が変化した。造精細胞マーカー抗体による免疫組織化学により、精細管障害がモザイク状であることが分かった。精巣上体を観察すると、野生型よりも数は少ないが、精子が存在していることが分かった。

次に、精巣で発現が増加する遺伝子を探索するため、RT-PCR 法と定量的 RT-PCR 法を行い、10 個の遺伝子 (App, Atp5o, Cbr1, Cbr3, Chaf1b, Ifnar2, Ifngr2, Jam2, Mrap, Pigg) が対照の野生型マウスよりも遺伝子の発現が有意に増加した。さらに、市販と自作の抗体を用いて、タンパク質レベルの発現の増加と発現細胞を同定した。ウェスタンブロットにより、Ts65Dn マウスの精巣では、野生型より 1.5 倍から 3 倍の範囲で発現が増加していた。免疫組織化学により、App は、造精細胞に発現するが、脱落や変性した造精細胞に過剰な発現が認められた。また、Cbr1 と Cbr3 は、セルトリ細胞に発現し、精子形成障害が見られる精細管ではセルトリ細胞に過剰にかつ不均一に両タンパク質が発現していた。したがって、Cbr1 と Cbr3 の過剰発現がセルトリ細胞の機能障害を生じ、精子形成障害を引き起こすことが示唆された。さらに、造精細胞に過剰に発現する App が精子形成障害を促進することも示唆された。ダウン症候群における精子形成障害は、少なくとも App, Cbr1, Cbr3 の複数の遺伝子の過剰発現によって生じることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒木俊史、チョムプーシー・ナッパン、菅原太一、野口和浩、園田佳世子、若山友彦
2. 発表標題 ダウン症候群モデルマウスにおける精子形成障害の原因遺伝子の研究
3. 学会等名 日本解剖学会 第78回九州支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nattapran Chompusri, Toshichika Kuroki, Kentaro Okamoto, Kazuhiro Noguchi, Taichi Sugawara, Kayoko Sonoda, Tomohiko Wakayama
2. 発表標題 Study of abnormal spermatogenesis in mouse model of Down syndrome
3. 学会等名 The 1st Asian Congress for Reproductive Immunology (ACRI) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nattapran Chompusri, Toshichika Kuroki, Kentaro Okamoto, Kazuhiro Noguchi, Taichi Sugawara, Kayoko Sonoda, Taichi Noda, Takashi Minami, Goro Sashida, Tomohiko Wakayama
2. 発表標題 Abnormal spermatogenesis in mouse model of Down syndrome
3. 学会等名 第2回ダウン症基礎研究会
4. 発表年 2023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	玉井 郁巳 (Tamai Ikumi) (20155237)	金沢大学・薬学系・教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	菅原 太一 (Sugawara Taichi) (30758412)	熊本大学・大学院先導機構・助教 (17401)	

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