

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20993

研究課題名（和文）精子幹細胞の分化過程における甲状腺機能の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of thyroid function in the differentiation process of spermatogonial stem cell

研究代表者

松本 大輔（Matsumoto, Daisuke）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：30906540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：精子幹細胞は幼若期に分化し、その細胞数が規定され、精子の供給源として重要であるため、幼若期の精子形成過程に与える甲状腺機能の役割を解明しようと研究計画を立案した。今回、精巣器官培養系を確立し、幼若期の精子形成過程に調査する実験については、器官培養系がうまく確立できなかった。しかし、甲状腺機能低下モデルを作成して、幼若期の精子形成過程については調査することができた。甲状腺機能低下群では、精子幹細胞の可能性のある生殖細胞数が増えていた可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、幼若期の精子形成過程に甲状腺ホルモンが影響を与えることがわかった。また、甲状腺機能低下により生殖細胞が増加した可能性が示唆された。この増加が意味するものが将来の妊孕性にとって良いものであるかは現時点では不明であるが、今後のさらなる研究により、停留精巣などの生殖細胞が減少する病態において甲状腺機能に関連したパスウェイや分子を調整することで、将来の妊孕性にとって有利に働かせることができる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Spermatogonial stem cells differentiate during the juvenile stage. They are important as a source of sperm. We designed a research plan to elucidate the role of thyroid function on the process of spermatogenesis during the juvenile stage. In this study, we did not establish a testicular organ culture system. However, we were able to investigate the process of spermatogenesis in the juvenile stage by creating an hypothyroid model. The number of germ cells that could be spermatogonial stem cells may have increased in the hypothyroid group.

研究分野：泌尿器科、小児泌尿器科

キーワード：精子幹細胞 甲状腺機能低下症 思春期前精子形成過程 精巣器官培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

男性不妊原因の 9 割が精子形成障害とされ、その代表的な原因疾患に停留精巣がある。停留精巣では、妊孕性維持のため生後 6~18 か月での精巣固定術が推奨されるが、20~25%の症例では幼若期に既に精巣の精子幹細胞数が減少しており、妊孕性に重大な影響を与えることが報告された。精子幹細胞は、精子の供給源であり、成人期の精子形成能は幼若期の精子幹細胞数に依存する。停留精巣は heterogeneity のある疾患であるため、症例毎に将来の不妊のリスクを予測可能とすることが重要な課題である。そのために精子幹細胞の分化状態を反映する指標を確立することが必要である。

一方で、私たちは臨床経験から、先天性甲状腺機能低下症を合併した停留精巣患児では精巣発育が不良であることを見出した。そこで、先天性甲状腺機能低下症を合併した停留精巣と非合併例の停留精巣組織を比較したところ、手術時年齢や精巣サイズに差を認めないのに対し、前者で精細管あたりの精子幹細胞数が有意に多かった。このことから精子幹細胞の分化に甲状腺ホルモンが密に関係しているのではないかと考えた。

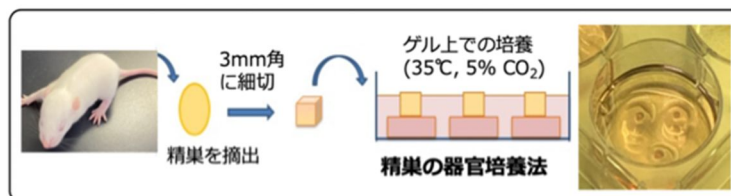
### 2. 研究の目的

精子幹細胞の分化過程に甲状腺機能がどう関与するかを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 精巣の器官培養系の確立と甲状腺ホルモン刺激による細胞分化・増殖に関する検討

精子形成の分化・増殖過程を継時的に観察するため、ラットの精巣組織を体外で培養する器官培養系の確立を試みた。精子形成細胞は出生時~生後数日間に前駆細胞から精子幹細胞へと分化する。この過程では精子形成細胞と、周囲に存在する Sertoli 細胞・筋様細胞などで構成される微小環境(幹細胞ニッチ)が重要とされ、これを器官培養系で観察した。出生直後の精巣の白膜を除去し、3mm<sup>3</sup> 角に細切した後、35℃、5% CO<sub>2</sub> の環境下、MEM、GlutaMax、KSR を含む培地・アガロースゲル上で気相液相鏡面培養を行った。数日~2 週間程度培養を行った。培養検体に対して組織学的検討を行った。



#### (2) 甲状腺機能低下モデルラットにおける精巣組織の解析

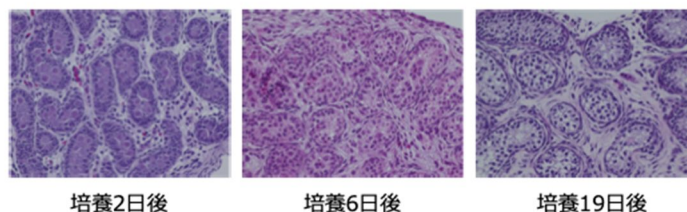
SD 系妊娠ラットに出生直後より 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU) を飲料水に混ぜて 0.001%~0.05% の濃度にして持続的に経口投与させることで、乳汁を介して新生仔に移行し、甲状腺機能低下モデル動物の作出を試みた。出生した雄仔から血液を経時的に (day 0~20) 採取し、血中 TSH (thyroid stimulating hormone)、T<sub>3</sub> (triiodothyronine)、T<sub>4</sub> (thyroxine) 値を測定し、正常の新生仔の測定値との比較をすることで、モデル動物の作出を確認した。生後数日以内のラットは体重が 10g 程度と小さく、採取できる血液量も非常に少なく一般にホルモン値の測定は難しいため、少量検体でも検査可能な MAGPIX® システムを用いた。こうして作出を確認したモデルラットの精巣組について、免疫染色等で組織学的な観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 精巣の器官培養系の確立と甲状腺ホルモン刺激による細胞分化・増殖に関する検討

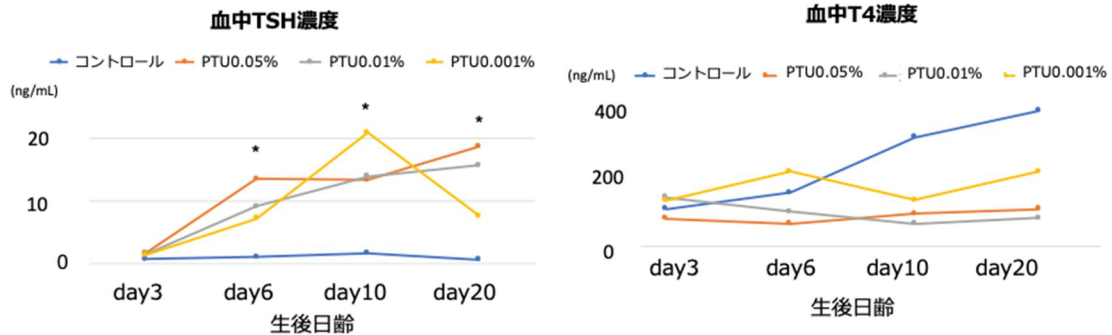
出生後 2 日目のラットに全身麻酔をかけた後に、精巣を摘出し、上述した方法で器官培養を開始した。右に示すように、培養 2 日後 (つまり出生後 4 日目) の精巣組織では精細管構造がしっかりみとれ、内腔に大型で円形の核を有した生殖細胞と、辺縁に小型で紡錘形の核を有するセルトリ細胞がみられ、培養液中での精巣組織の分化が観察できた。しかしながら培養を進めると、培養 6 日目では、正常であれば精細管の辺縁に移動し増殖をしているはずである生殖細胞が精細管内腔にとどまっていた。さらに適宜培養液を交換しながら培養を継続すると、培養 19 日目では生殖細胞は消失していた。培養条件や培養液の組成の調整をし、シャーレ内での精巣組織の培養 (分化・増殖) を試みたが、最終的に培養は困難という結果となった。培養ができた場合に、TSH や T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> などの甲状腺ホルモンを添加して変化を観察する計画であったが、適切に評価できる実験系でないために計画中止とした。

【器官培養した精巣組織】

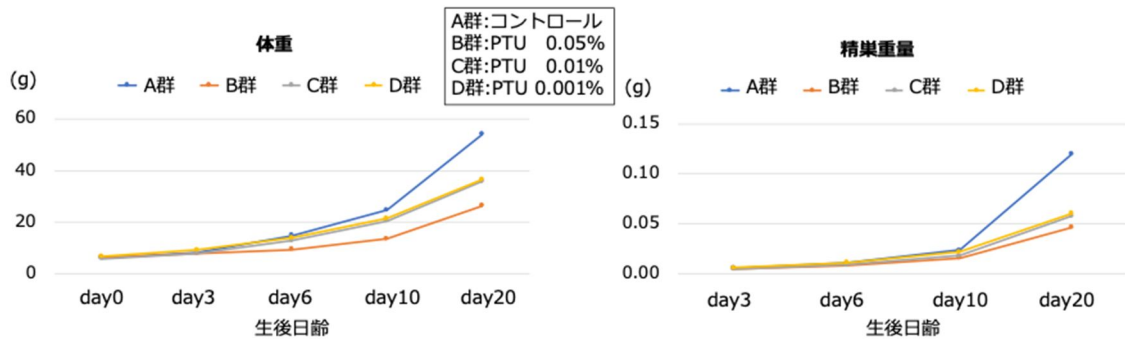


## (2) 甲状腺機能低下モデルラットにおける精巣組織の解析

まずは、甲状腺機能低下症のモデルラットが作出できているかを確認した。コントロールの群に比べて、PTU 投与した 3 群では濃度依存的に血中 T4 濃度が低下しており、またネガティブフィードバックにより血中 TSH 濃度が上昇していた。いずれの日齢においても群間に有意差がみられた。



つづいて、コントロール群と PTU 投与群でのラットの発育について評価した。コントロールと比較して、PTU 投与群では濃度に比例して体重と精巣重量の増加不良がみられていた。これが PTU 自体の毒性によるものか、甲状腺機能低下による影響なのかについては不明だが、明らかな発育不良がみられたため、精巣組織の評価はそれらを加味する必要があると考えた。

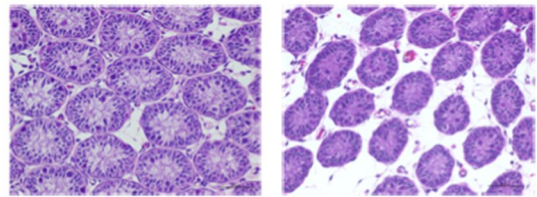


右の図はコントロールと甲状腺機能低下モデルラットの精巣組織を比較した。コントロールでは精細管構造が密に集まっているのに対して、PTU 投与群では精細管の間に関質組織が目立っており、また精細管の直径自体も細くなっていることがわかった。一方で、ただ発育不良となるだけではなく、生後 7 日頃においては、生殖細胞のマーカーである抗 DDX-4 (DEAD box protein 4) 抗体陽性細胞数が、PTU 投与群で増加しているという結果が得られた。

以上より、甲状腺ホルモンは新生児期の、つまり思春期前の精子形成過程において精子幹細胞などの生殖細胞を増加させる可能性が考えられた。ただし、この増加が将来の妊孕性によって良好な予後に寄与するのか、それとも増悪させるのかなどについては今回の結果だけでは不明であり、今後の研究継続が望まれる。

### 【甲状腺低下モデルラットの精巣組織】

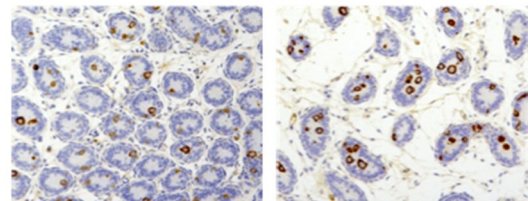
出生後10日目



コントロール

PTU 0.05%

出生後7日目 抗DDX-4抗体による免疫染色



コントロール

PTU 0.05%

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishio Hidenori, Mizuno Kentaro, Matsumoto Daisuke, Nakane Akihiro, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro	4. 巻 46
2. 論文標題 Conservative management of pubertal segmental testicular infarction associated with epididymitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Urology Case Reports	6. 最初と最後の頁 102324
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishio Hidenori, Mizuno Kentaro, Matsumoto Daisuke, Kato Taiki, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro	4. 巻 164
2. 論文標題 A Novel Transvesicoscopic Ureteral Reimplantation Technique to Treat an Infantile Ectopic Ureter in a Single System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urology	6. 最初と最後の頁 244-247
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 -

1. 著者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Matsumoto Daisuke, Nishio Hidenori, Nakane Akihiro, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro	4. 巻 76
2. 論文標題 Transvesicoscopic ureteral reimplantation and ureteroscopy for management of primary obstructed non-reflexing megaureter with urethral calculus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Urology Case Reports	6. 最初と最後の頁 303-305
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Matsumoto Daisuke, Nishio Hidenori, Nakane Akihiro, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Maruyama Tetsuji, Iwatsuki Shoichiro, Umamoto Yukihiro, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro	4. 巻 207
2. 論文標題 Low Serum Inhibin B/Follicle-Stimulating Hormones and Anti-Mullerian Hormone/Follicle-Stimulating Hormones Ratios as Markers of Decreased Germ Cells in Infants with Bilateral Cryptorchidism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 701-709
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishio Hidenori, Mizuno Kentaro, Matsumoto Daisuke, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro	4. 巻 46
2. 論文標題 Ureterocele prolapse eliciting unusual patient behavior to control intermittent voiding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urology Case Reports	6. 最初と最後の頁 102295
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Matsumoto, Kentaro Mizun, Hideyuki Kamisawa, Taiki Kato, Hidenori Nishio, Satoshi Kurokawa, Akihiro Nakane, Hiroki Kubota, Tetsuji Maruyama, Takahiro Yasui, Yutaro Hayashi	4. 巻 92
2. 論文標題 Usefulness of uroflowmetry for the management of urethral prolapse in a prepubertal girl	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 102616
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Daisuke Matsumoto, Kentaro Mizuno, Takuya Sakata, Hidenori Nishio, Takahiro Yasui, Yutaro Hayashi
2. 発表標題 Histological examination of testes in juvenile hypothyroid rats induced by propylthiouracil
3. 学会等名 第111回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松本 大輔、水野 健太郎、西尾 英紀、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 小児の急性陰嚢症におけるTWISTスコアの有用性の検討
3. 学会等名 第31回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 大輔、水野 健太郎、西尾 英紀、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 congenital prepubic sinusの1例～病理組織学的解析に基づいた本症発症の考察～
3. 学会等名 第31回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 大輔、水野 健太郎、加藤 大貴、西尾 英紀、丸山 哲史、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 遊走精巣における精細管あたりの生殖細胞数とセルトリ細胞ホルモンとの関連についての検討
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 大輔、西尾 英紀、水野 健太郎、梅本 幸裕、戸澤 啓一、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 陰嚢アプローチ
3. 学会等名 第32回日本小児泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 大輔、水野 健太郎、西尾 英紀、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 摘除性腺にgonadoblastomaを認めた45,X/46,XYモザイク型Turner症候群の1例
3. 学会等名 第32回日本小児泌尿器科学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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