

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592382

研究課題名(和文) 遺伝子導入技術を用いた精子形成遺伝子の同定とその細胞内シグナル伝達分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the intracellular signaling molecules and identification of spermatogenesis genes using gene transfer technology

研究代表者

梅本 幸裕 (Umemoto, Yukihiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80381812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Notchシグナル伝達経路をターゲットとした男性不妊症治療への応用を目的として、Numb / Nblの哺乳類精巣における機能解析を行った。Numb / Nblはそれぞれ類似分子であるが、そのmRNA発現量変化の違いと精細管における発現局在の違いから、両者の精巣における機能は異なるものと考えられた。Numb / Nblによる精細胞分化の調節機構を考えると、Nblは精母細胞から円形精子細胞への分化に抑制的に働き、円形精子細胞から伸長精子細胞への分化には促進的に作用すると考えられた。NumbはNblに対して拮抗的に作用しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Notch signaling pathway plays a key role in gametogenesis in nematodes by maintaining proliferative ability of spermatogenic stem cells. Our result showed that a relative ratio of Numb and Nbl expression might play a role in differentiation of germ cells in rat testes. This is analogous to regulation of Notch signaling pathway and development of the central nervous system. Our gene knock-down experiment suggested that Numb and Nbl have essential roles in the regulation of germ cell differentiation after meiotic phase (spermatocytes or spermatids). Suppressing the Notch signaling pathway by disrupting Numb/Nbl may induce germ cell differentiation in the testes of patients with male infertility.

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：Numb Numb-like 造精機能障害 男性不妊症モデル 停留精巣 siRNA Fem1b

## 1. 研究開始当初の背景

男性不妊症治療成績の向上には生殖補助医療の技術発達と造精機能障害のメカニズムに応じた新たな治療法の開発の2つのアプローチ方法が考えられる。精子形成は複数種類の細胞の相互作用で調節されていることから、細胞間・細胞内シグナル伝達系の関与が大きいものと考えられる。細胞間シグナル伝達経路のひとつである Notch シグナル伝達経路の抑制因子 ; Numb-homolog (Drosophila) とその類似分子である Numb homolog (Drosophila)-like (Nbl) に着目した。Notch シグナル伝達系は多くの組織で、幹細胞の多分化能の維持に関与しているとされている。精子形成においては、Notch シグナルの抑制により幹細胞から配偶子への分化が生じることが、線虫を用いた研究で報告されている。このことから哺乳類精巣においても Notch シグナルを抑制することにより、精細胞分化が誘導できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

Notch シグナル伝達経路をターゲットとした男性不妊症治療への応用を目的として、Numb / Nbl の哺乳類精巣における機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

実験には Sprague-Dawley ラットを用いた。Numb / Nbl の4週齢から12週齢までの発現変化と局在を SYBR Green 法と蛍光抗体を用いた免疫組織化学にてそれぞれ検討した。機能解析は、Numb / Nbl のノックアウトマウスは胎生致死であるため in vivo 遺伝子導入法を応用した。Numb / Nbl に対する siRNA を発現するベクターをエレクトロポレーション法により精巣内に導入し、Numb / Nbl の機能をノックダウンした。正常8週齢雄 SD ラットを用い、Group A: Numb ノックダウン群、Group B: Nbl ノックダウン群、Group C: Numb

/ Nbl ダブルノックダウン群、Group D: ネガティブコントロール群の4群に分けた。対象の左側精巣に導入、2週後にベクターが導入された精細胞を計数し、コントロール群 (Group D) と比較した。

## 4. 研究成果

Numb の発現は週齢を経るにつれて緩やかな減少傾向を認めた。一方、Nbl の発現は6週齢でピークを示し、12週齢で4週齢と同程度の発現量に減少していた。免疫組織化学では、精母細胞では Numb・Nbl とともに発現していることが確認できたが、精子細胞では相対的に Numb の発現は減少し、Nbl の発現が優位であった。siRNA を用いた in vivo 機能解析では、コントロール群 (Group D) と比較して、Numb ノックダウン群 (Group A) では円形精子細胞以降の細胞が、Nbl ノックダウン群 (Group B) および Numb / Nbl ダブルノックダウン群 (Group C) では伸長精子細胞以降の細胞数が有意に減少していた。Numb / Nbl はそれぞれ類似分子であるが、その mRNA 発現量変化の違いと精細管における発現局在の違いから、両者の精巣における機能は異なるものと考えられた。Numb / Nbl による精細胞分化の調節機構を考えると、Nbl は精母細胞から円形精子細胞への分化に抑制的に働き、円形精子細胞から伸長精子細胞への分化には促進的に作用すると考えられた。Numb は Nbl に対して拮抗的に作用しているものと考えられた。Numb / Nbl を介した Notch シグナル伝達系を調節することで、精子形成を誘導する新たな治療法への応用が期待される。

## 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3件)

梅本 幸裕 : 精子形成障害への遺伝子治

療。医学のあゆみ、249(1):44-48、2014  
(査読なし)

梅本 幸裕、岩月 正一郎、佐々木 昌二：造精機能障害の遺伝子治療に向けて。日本医師会雑誌、141:1216、2012 (査読なし)

Taguchi Kazumi, Yasui Takahiro, Naiki Taku, Umemoto Yukihiro, Kojima Yoshiyuki, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Hayashi Yurtaro, Kohri Kenjiro: Unilateral testicular seminoma with simultaneous contralateral torsion: a case report. Journal of Medical Case Reports, 6:199, 2012 (doi:10.1186/1752-1947-6-199) (査読あり)

[学会発表](計10件)

梅本 幸裕、佐々木 昌一、岩月 正一郎、窪田 裕樹、窪田 泰江、小川 総一郎、池内 隆人、神谷 浩行、矢内 良昌、郡 健二郎：男性不妊症患者におけるY染色体微小欠失分析の意義。第63回日本泌尿器科学会中部総会、2013.11.28-30、名古屋市

岩月 正一郎、佐々木 昌一、梅本 幸裕、窪田 裕樹、郡 健二郎：In vivo 遺伝子導入法を用いたシグナル伝達分子；Numb/Numb-like の精子形成における機能解析。第63回日本泌尿器科学会中部総会、2013.11.28-30、名古屋市

岩月 正一郎、佐々木 昌一、窪田 泰江、窪田 裕樹、梅本 幸裕、郡 健二郎：非閉塞性無精子症患者における染色体異常と精子採取成績。第58回日本生殖医学会学術講演会、2013.11.15-16、神戸市

水野 健太郎、神沢 英幸、守時 良演、西尾 英紀、岩月 正一郎、梅本 幸裕、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二

郎：精子幹細胞分化におけるアンドロゲンの役割。日本アンドロロジー学会第32回学術大会ならびに総会および第19回精子形成・精巣毒性研究会、2013.7.26-27、大阪市

岩月 正一郎、佐々木 昌一、梅本 幸裕、神沢 英幸、水野 健太郎、窪田 泰江、窪田 裕樹、郡 健二郎：哺乳類精巣におけるFeminization factor 1b(Fem1b)によるアンドロゲン作用の調節機構の解析。日本アンドロロジー学会第32回学術大会ならびに総会および第19回精子形成・精巣毒性研究会、2013.7.26-27、大阪市

岩月 正一郎、佐々木 昌一、梅本 幸裕、池内 隆人、神谷 浩行、窪田 裕樹、窪田 泰江、矢内 良昌、藤田 圭治、郡 健二郎：精巣におけるFeminization Factor1b(Fem1b)のアンドロゲン調節作用。第57回日本生殖医学会学術講演会・総会、2012.11.7-10、長崎市

梅本 幸裕、佐々木 昌一、岩月 正一郎、窪田 裕樹、郡 健二郎：精子形成障害に対する遺伝子治療に向けた基礎的研究。第57回日本生殖医学会学術講演会・総会、2012.11.7-10、長崎市

岩月 正一郎、佐々木 昌一、梅本 幸裕、神谷 浩行、窪田 裕樹、窪田 泰江、藤田 圭治、郡 健二郎：精巣におけるFeminization Factor 1b(Fem1b)の発現。第56回日本生殖医学会学術講演会・総会、2011.12.7-9、横浜市

梅本 幸裕、佐々木 昌一、岩月 正一郎、窪田 裕樹、窪田 泰江、水野 健太郎、小島 祥敬、林 祐太郎、郡 健二郎：停留精巣・精巣固定術の既往のある非閉塞性無精子症に対するMD-TESEの治療成績。第61回日本泌尿器科学会中部総会、2011.11.16-18、京都市

岩月 正一郎、水野 健太郎、梅本 幸裕、窪田 裕樹、佐々木 昌一、最上 徹、郡 健二郎：精子形成における Notch シグナル伝達抑制因子；Numb/Numb-like の役割。日本アンドロロジー学会第 30 回学術大会、2011.7.22-23、東京都

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

梅本 幸裕 (UMEMOTO YUKIHIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：80381812

### (2)研究分担者

郡 健二郎 (KOHR I KENJIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30122047

佐々木 昌一 (SASAKI SHOICHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：50225869

窪田 裕樹 (KUBOTA HIROKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：10347403

水野 健太郎 (MIZUNO KENTARO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70448710