

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592449

研究課題名(和文)造精機能障害におけるCyclooxygenase 2(COX2)の制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the role of cyclooxygenase 2 on spermatogenesis disturbance.

研究代表者

窪田 裕樹(Kubota, Hiroki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10347403

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、COX-2が造精機能障害に果たす役割を解明するために、これまでに私たちが作成した実験的停留精巣モデル動物を用い、COX-2が造精機能に与える影響について検討した。停留精巣ではアポトーシスの発現が亢進して造精機能障害が認められた。また、COX-2は精巣内で強く発現していた。COX-2阻害剤を投与すると、アポトーシスがさらに亢進して造精機能障害も増強していた。これらの結果からは精巣内のCOX-2は組織の障害時に誘導され、細胞をアポトーシスから保護する役割を持つと推定された。

研究成果の概要(英文): In this study, we examined whether COX-2 was induced in impaired testes, and also investigated the possible role of COX in the testes using experimental cryptorchidism model mice. Five-week-old male mice underwent an operation to induce unilateral cryptorchidism, and they were then divided into three groups. Immunohistological staining and RT-PCR revealed that the expression of COX-2 was increased in the experimental cryptorchid testes. TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) staining revealed that the number of apoptotic cells was significantly increased by COX-2 inhibitor. However, the COX-1 inhibitor did not appear to affect spermatogenesis in the experimental cryptorchid testes. These results suggest that the COX-2 inhibitor provoked testicular damage in experimental cryptorchidism by inducing germ cell apoptosis. The expression of COX-2 might be induced to protect germ cells from heat stress caused by experimental cryptorchidism.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：Cyclooxygenase2 Spermatogenesis

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国においては急速な高齢化の一方で出生率の低下が進行し、少子化対策の必要性が叫ばれている。補助生殖医療技術の発展により男性不妊症に対して精子を採取することも可能になってきたが、その多くは特発性の造精機能障害であり病態は未だに解明されていない。

(2) 精子形成の過程 (spermatogenesis) において、アポトーシスが亢進すると造精機能障害を来することが明らかとなっている。造精機能障害を来した精巣では COX-2 が誘導されているが、COX-2 は多くの臓器でアポトーシスの制御に関与することが知られている。COX-2 の造精機能障害への影響を解明することは男性不妊症の治療につながる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 実際の不妊患者や疾患モデル動物の精巣組織での検討から、造精機能障害をきたす病態において COX-2 の発現が誘導されていることは確認されている。本研究ではまず造精機能障害モデルマウスを作製して、COX-2 誘導モデルとして確立する。

(2) 種々の疾患モデルにおいて、COX-2 とアポトーシスの関係につき検討を行うと同時に、関連する転写因子群の同定を試みる。また、COX-1 についても精巣での役割は不明のままであり、COX-1 および COX-2 に特異的な inhibitor を投与した上で、spermatogenesis に対するそれぞれのはたらかの違いを明らかにする。

(3) さらに、サイトカインの誘導やステロイド合成についても解析を加えることで精巣内での COX の役割が明らかとなり、造精機能障害のメカニズムを解明する糸口が

かめるものと考ええる。

3. 研究の方法

COX-2 誘導モデルを作成し、COX inhibitor による造精機能・アポトーシスへの影響を検討する。

(1) COX-2 誘導モデルマウスの作製: COX-2 誘導モデルとしては、雄マウスの左精巣を手術によって腹腔内に固定することで片側の停留精巣状態として、造精機能障害を来したものをを用いる。

(2) COX inhibitors 投与: このマウスに COX-1, COX-2 の inhibitor を投与することで、COX 活性を抑制することを試みる。免疫組織化学染色により、COX-1, COX-2 の発現パターンや造精機能に与える影響について検討する。また、性行動や性ホルモンへの影響も検討する。

(3) アポトーシスと転写因子群の関与: 造精機能障害の原因としてアポトーシスの亢進の有無を、免疫組織化学染色で検討する。COXs とアポトーシスとの関連につき、アポトーシスに関連する転写因子の発現について分子生物学的解析 (RT-PCR、Western blotting) により検討する。

4. 研究成果

(1) 実験動物として、5 週齢の雄マウスを用いた。これらに対して、左精巣を腹腔内に固定することで停留精巣モデル動物を作成したのち、以下の 3 群に分けた。Group 1: 停留精巣マウス + SC560 (selective COX-1 inhibitor) 投与群、Group 2: 停留精巣 + NS398 (selective COX-2 inhibitor) 投与群、Group 3: 停留精巣群。投与後 1、2、5 週後に健側及び患側の精巣を摘出し、心房から採血して血液中のテストステロンを測定した。

精巣重量を計測後、精巣を半分に分割し片側を4%パラホルムアルデヒドで固定し、残りを凍結保存した。HE染色により組織学的な変化を観察し精細管の径を測定後、Johnsen's scoreを利用して造精機能の評価を行った。造精機能障害の評価として、TUNEL染色によるアポトーシスの検出を行った。また免疫組織染色法によりCOX1とCOX2それぞれの経時的発現様式と発現部位を観察し、ウェスタンブロット法およびRT-PCRによりそれらの発現量の定量化を行った。

(2) 実験開始後1週目で変化が見られ、2週目でさらに傾向が明らかとなったが、2週後までは各グループ間で有意な差は認められなかった。精巣重量は投与5週後において患側は健側に比べ有意に低下し、Group 2では他グループよりも有意に低下していた。Group 2では組織学的にも精細管内の細胞配列の乱れや細胞数の減少といった造精機能障害が強く認められ、さらにJohnsen's scoreが有意に低く、TUNEL染色でアポトーシス細胞が有意に増加していた。免疫組織染色法およびウェスタンブロット法ではCOX-1は患側・健側ともに弱い発現が見られたが、COX-2は患側精巣でのみ強く発現していた。RT-PCRでは、患側精巣のCOX-2 mRNAの発現は健側に比べ約4倍に増加していた。血清テストステロン値はグループ2で有意に低値であった。

(3) 本研究ではCOX-2 inhibitor投与により組織のダメージが大きくなることが確認され、臓器が障害を受けるような病態でCOX-2が誘導される理由として臓器保護作用を持っていることが推測された。アポトーシス関連の転写因子群との相互作用など、そのメカニズムは今後の解明を待たなければならないが、COX-2の発現をコントロールす

ることで造精機能障害を軽減することが可能になると考えられる。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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: 10317403

(2) 研究分担者

郡 健二郎 (KOHRI, Kenjiro)

名古屋市立大学・その他の部局・学長

研究者番号: 30122047

林 祐太郎 (HAYASHI, Yutaro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 40238134

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

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

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

John Parrington (Oxford 大学)