

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462537

研究課題名(和文) 精巣内精子回収法における新たな回収予測因子の確立

研究課題名(英文) Establishment of the new prediction factor in the testicular sperm extraction method

研究代表者

原口 貴裕 (Haraguchi, Takahiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20457104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非閉塞性無精子症患者に対する顕微鏡下精巣内精子採取術施行の際に、精巣内精子の存在を予測し得る有用な因子は確立していない。そこで新たな分子生物学的マーカーとして今回ウロコルチンに着目した。ヒト検体に先立ちラット精巣を用いて解析したところ、外的ストレスに反応して精巣内のウロコルチン発現量は変化し、またウロコルチン発現量と生殖細胞のアポトーシスとの間に負の相関関係があることが示された。正常な精子形成のためには生殖細胞のアポトーシスによる厳密なコントロールが必須であり、今回の研究結果よりウロコルチンが精巣内精子の存在を予測する因子になり得ることが示唆された。今後ヒト検体を用いた更なる解析を予定している。

研究成果の概要(英文)：The useful factor which can predict the existence of the testicular sperm in the case of microdissection testicular sperm extraction (Micro-TESE) has not been established, so we focused on Urocortin as a new molecular biological marker. In this study, we showed that the expression levels of Urocortin changed in response to exogeneous stress. In addition, we showed a negative correlation between the urocortin expression and the proportion of germ cells undergoing apoptosis. It has been said that the close control of germ cells by apoptosis is necessary for normal spermatogenesis; so, from this perspective, it was suggested that Urocortin could be a factor which can predict the existence of the testicular sperm.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：Urocortin testicular damage spermatogenesis Micro-TESE

1. 研究開始当初の背景

不妊症は全カップルの約 10-15%の頻度で認められ、その約半数は男性側に要因がある。男性不妊症に対する治療は、補助生殖技術 (ART : assisted reproductive technology) の発展により従来治療困難であった無精子症患者でも妊娠、挙児を得ることが可能になった。

無精子症には精路に問題のある閉塞性無精子症と、精巣自体に原因のある非閉塞性無精子症に大別される。閉塞性無精子症の場合、比較的容易に精巣内精子採取が可能であるが、非閉塞性無精子症の場合、精子採取率は 30-40%程度にすぎない。有用な精子採取予測因子の確立を目指して数多くの研究がなされているが、実臨床においてはそれらの因子の有用性は低く、精子採取の成否を正確に予測することは困難である。現在のところ唯一の予測因子として、Y 染色体上にある AZF 遺伝子が提唱されており、AZFa および AZFb 遺伝子欠損症例においては、精子採取はほぼ不可能であることが判明しているが (Stahl, et al. 2010)、欠損頻度は全体の数%に過ぎず、多くの症例においては、顕微鏡下精巣精子採取術 (Micro-TESE; microdissection testicular sperm extraction) を施行して精子の有無を確かめざるを得ないのが現状である。

近年、精巣内の様々な分子生物学的マーカーの検索が行われており、既にいくつかの知見が得られている。我々も同様の方法で、精巣組織内の cyclin および protamine、および Vasa が精巣内精子の存在を予測する因子として有用である可能性があることを報告している (Haraguchi, et al. 2009, Ando, et al. 2012)。新たな分子生物学的マーカーにより、精巣内精子の存在がより正確に予測できるようになれば、Micro-TESE の術前に、比較的侵襲の少ない精巣生検を行って得られた精巣組織を用い

て、実際に Micro-TESE を行う意義がある症例を正確に選別できる可能性がある。或いは過去に Micro-TESE を行って精子採取できなかった症例であっても、採取した組織を用いてそれらの分子生物学的マーカー検索を行うことで、再度 Micro-TESE を施行する意義がある症例を見出すことができる可能性があり臨床上極めて有用な情報が得られるものと考えられる。

そこで今回我々は、最近新たにヒト精細胞内に存在することが確認された分子のうち、成熟精子内に主に存在していることが報告されている sphingosine 1-phosphate、sphingosine kinase 1、urocortin について、精巣内精子の存在を予測する因子の候補として着目した。

2. 研究の目的

現在、非閉塞性無精子症患者が挙児を得るための唯一の治療法は、Micro-TESE で精巣内精子を採取し、採取した精子を用いて顕微授精 (ICSI ; intracytoplasmic sperm injection) を施行することであるが、Micro-TESE の精子採取率は低く、精子の有無を予測する有用な予測因子もない。そこで今回、男性不妊患者から得られた精巣組織を用いて、主に成熟精子内に存在している複数の分子を定量的に測定し分析することにより、精巣内精子の存在を高率に予測し得る、有用な因子の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

Real-time RT-PCR 法、Western Blotting 法により、ヒト精巣組織内の sphingosine 1-phosphate、sphingosine kinase 1、urocortin の発現レベルを測定し、定量化する。またフローサイトメトリー法により、精母細胞、精子細胞、精子分画を測定し、定量化する。その上で、各種分子生物学的

マーカーの遺伝子発現レベル、また精母細胞、精子細胞、精子分画を精子採取の有無を照合して、感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率を測定し、適切なカットオフ値を確立する。さらにそれら複数の因子の組み合わせについても、同様に検討する。

4. 研究成果

ヒト検体に先立ちラット精巣を用いて sphingosine 1-phosphate、sphingosine kinase 1、urocortin の発現を確認した。次いで複数の方法にて精巣障害モデルを作成したところ urocortin が最も精巣障害を鋭敏に反応することが分かった。

これまでに心筋虚血-再還流障害に対して urocortin が抗アポトーシス作用を示すことが多数報告されていることから、特にラット精巣虚血-再還流障害モデルに着目して検討したところ、精巣における urocortin 発現量と生殖細胞のアポトーシスとの間に負の相関が示された。

正常な精子形成の為には生殖細胞のアポトーシスによる厳密なコントロールが必須であり、今回の研究結果よりウロコルチンが精巣内精子の存在を予測する因子になり得ることが示唆された。

今後ヒト検体を用いて臨床データと比較し更なる研究を進めていく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

European Association of Urology
Annual Congress 2016

Kenta Sumii, Hideaki Miyake,

Noritoshi Enatsu, Koji Chiba, Masato Fujisawa

“The role of urocortin in the apoptosis of germ cells after ischemia-reperfusion injury”

American Urological Association
Annual Meeting 2016

Kenta Sumii, Hideaki Miyake,
Noritoshi Enatsu, Koji Chiba, Masato Fujisawa

“The role of urocortin in the apoptosis of germ cells after ischemia-reperfusion injury”

第 104 回 日本泌尿器科学会総会

角井 健太、江夏 徳寿、千葉 公嗣、
三宅 秀明、藤澤 正人

“ラット精巣虚血-再還流障害に対するウロコルチンの生殖細胞保護作用についての検討”

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

原口 貴裕 (HARAGUCHI, Takahiro)

神戸大学・医学研究科 研究員

研究者番号：20457104

(2)研究分担者

藤澤 正人 (FUJISAWA, Masato)

神戸大学・医学研究科 教授

研究者番号：30243314

(3)連携研究者

()

研究者番号：