

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462572

研究課題名(和文)精子形成不全における温度依存的に影響を及ぼす分子の解明

研究課題名(英文) Analysis of the genes which are involved in a spermatogenic defect in higher temperature in mouse

研究代表者

吉田 佳世 (YOSHIDA, Kayo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30311921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：わが国にとって少子化は重要な問題であり、不妊による影響も大きいと考えられる。近年、男性の精子数の減少や異常の増加が報告されている。哺乳類のオスでは精巣は体温より約3℃低い陰嚢に入っており体温(高温)では進行しない。我々はマウスを用いて高温で精子形成を停止させ、発現の増加する遺伝子と減少する遺伝子を同定した。今後、これらの遺伝子の解析により停留睾丸など男性不妊の原因探索、治療への貢献が示唆される。

研究成果の概要(英文)：A low birthrate is an important problem in Japan, and the influence by sterility is also big problem. Decrease of the number of male spermatozoa and increase of abnormal sperm are reported in recent years. A testicle is included in the scrotum whose temperature is lower about 3℃ than the body temperature in the mammals. There must be a mechanism that cannot move forward spermatogenesis by higher temperature. We kept mouse testes in higher temperature. It made the mouse testes to stop spermatogenesis as judged by histological analyses. In order to identify genes that will be involved in spermatogenesis, we collected RNAs from mouse testes at higher temperature and examined its expression using DNA chips. We can selected several genes whose expression were increased or decrease by higher temperature. We will reveal the physiological significance of the genes by making mice lacking such genes in spermatogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：生殖医学 精原細胞 精子形成

1. 研究開始当初の背景

わが国にとって少子化は重要な問題であり、不妊による影響も大きいと考えられる。WHO（世界保健機構）の調査によると、不妊の原因は、女性のみが41%、男性のみが24%、男女ともが24%、原因不明が11%と報告されている。これは、男性不妊が48%、女性不妊が65%ということになる。また、東邦大学医療センターより、男性不妊の多くは原因不明であり、精巣での精子を作る能力の低下が最も多くみられることが報告されている。近年、男性の精子数の減少や異常の増加が報告されており、服装の変化やストレスとの関係などが問題となっている。現在、補助生殖医療技術（ART）の確立により、不妊治療がおこなわれる中、精子を作ることができない無精子症では、不妊治療がより困難になると考えられる。このことから、精子形成のメカニズムを分子生物学的に解析することは、不妊治療への応用に不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

ヒトを含む哺乳類のオスでは精巣は体温より約3℃低い陰嚢に入っており、この温度で精子が形成される。まれに停留精巣になった場合、不妊率は高くなることが知られている。このように哺乳動物の精子形成には高温では進行しない仕組みがあると考えられる。我々は、マウスを用いて人工的な停留精巣を作製し、高温で精子形成を停止させるステップを特定するとともに、DNAチップを用いて精子形成において温度感受性に関与する遺伝子を同定する。さらに、マウス個体において、候補遺伝子の発現を制御（減少あるいは増加）し、精子形成メカニズムとその生理的意義を明らかにし、不妊の原因、診断、治療方針の改善に役立てる。

3. 研究の方法

精子形成過程における温度感受性ステップを決定するためマウスで人工的に停留精

巣を作製する。実験には野生型マウスや精原細胞と減数分裂初期の精母細胞しか存在しない遺伝子欠損マウスを用いる。温度上昇を継続した後に解剖し、組織切片の解析により高温に感受性のステップを決定する。

一定期間温度上昇した後、低温に戻し、精子形成を再開させる。この過程で経時的に精巣からRNAを抽出し再び発現が開始する遺伝子をDNAチップで検索し、種々の性質から候補遺伝子を選択する。

絞られた候補遺伝子のsiRNAやトランスジェニックマウスを作製し、自然な状態で精子形成が停止するかどうか、高温状態で精子形成が停止しないか、などを検討し、最終的に精子形成を制御している遺伝子を同定する。さらに、この遺伝子のもつ生理的機能について解析する。

4. 研究成果

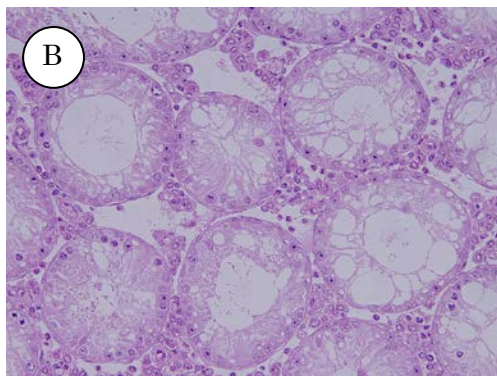
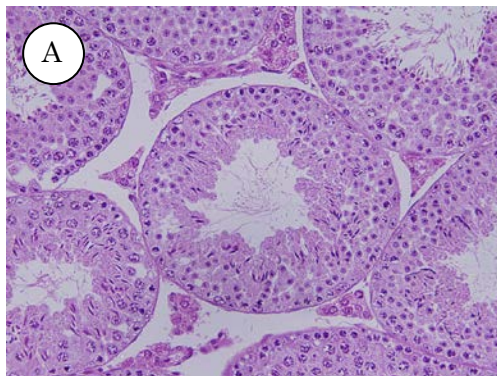
(1) マウス精巣における温度感受性ステップの解析

野生型マウスについて、精巣を高温状態にし、経時的に変化を追った。通常の温度での状態と高温状態にした精巣を取り出し、ブアン固定の後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン、エオシンで染色した。その結果、高温状態にする前は、正常な切片の様子が観察された。最外層から、精原細胞、減数分裂期の前期の細胞、精子細胞、精子と内側に分化していく様子が観察された（図1-A）。

一方、高温で一定期間経過した精巣では、精細管の直径が正常に比べ約50%程度に細くなり、減数分裂、細胞分化に異常が見られ、正常な精子を形成している精細管はみられなかった（図1-B）。どの段階で温度上昇により発現が停止するかを明らかにするために解析したが、種々の発現段階で、核が濃く染まるアポトーシスのような状態が観察された。また、核と細胞質の間に空洞ができるものや細胞質そのものから核が抜けたものが観察された。これらは、減数分裂前期の細胞や精子細胞において、アポトーシスに向かっており、温度の影響は種々のステップで起こっていると考えられる。高温状態でさらに時間が経過する

と、精細管の内部の細胞はほぼなくなり、最外層の精原細胞やセルトリ細胞を含む細胞群が残っていた。精細管の内部には、セルトリ細胞の細胞質と考えられる形態が残っているが、正常では、それらが囲んでいる減数分裂期細胞が観察できなかった。

その後、低温に戻すと、精細管の最外層から、細胞が再度増殖を開始し、減数分裂前期の細胞、精子細胞、精子と分化することが確かめられた。



(図1) マウス精巣の組織像

A. 通常の温度でのマウス精巣では、最外層から、精原細胞、減数分裂期の前期の細胞、精子細胞、精子と内側に分化していく様子が観察された。

B. 高温状態で一定期間経過した精巣では、精細管が細くなり、細胞がアポトーシスを起こし、精子を形成している精細管はみられなかった。

(2) 高温状態及び通常の温度に戻した時のDNAチップによる精巣の遺伝子発現解析

高温状態にしたマウス精巣から RNA を経時的に抽出し、発現の変化する遺伝子を検索した。また同様に、高温状態の後に通常の温度に精巣を戻した精巣からも RNA を経時的に抽出し、これらを DNA チップを用いて解析し、発現量の変化する遺伝子を検索した。

その結果、温度上昇、下降にともなって発現の変化する複数の遺伝子を明らかにした。DNA チップによる網羅的解析により、発現の変化が異なる遺伝子を選出したが、精子形成における役割は不明である。

そこで、これらの遺伝子の中から、温度上昇に伴って発現が増加する遺伝子および発現が減少する遺伝子について、CRISPR法を用いて、4種類の遺伝子欠損マウスを作製した。

今後はこれらのマウスについて、精巣での精子形成に対する影響および、温度変化による遺伝子発現の変化やタンパク質の局在等を中心に、温度による精子形成への影響を解析する予定である。

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2件)

(1) Kitada K, Kizu A, Teramura T, Takehara T, Hayashi M, Tachibana D, Wanibuchi H, Fukushima S, Koyama M, Yoshida K, Morita T. Gene-modified embryonic stem cell test to characterize chemical risks. Environ Sci Pollut Res Int. 22; 18252-18259. 査読有 (2015) DOI:10.1007/s11356-015-5051-1

(2) Yoshida K, Hada M, Teramura T, Cucinotta FA, Morita T. Estimation of effects of space radiation using frozen mouse ES cells in ISS. J. Radiation Res. 査読有 2014; 55, S1:12-13.

[学会発表] (計3件)

① Kitada K, Yamamoto H, Hamuro A, Hamasaki S, Takeda K, Ozaki K, Kizu A, Tachibana D, Koyama M, Yoshida K; The evaluation sensitivity of mouse embryos to X-ray irradiation by

time-lapse movie, 第 66 回日本産婦人科学会学術講演会. 2014 年 4 月 18 日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

② 北田 紘平、古山 将康、栗原 康、佐野 美帆、和田 夏子、山本 浩子、中野 朱美、寺田 裕之、橘 大介、木津 あかね、森田 隆、吉田 佳世; マウス初期胚に対する放射線の影響についての検討, 第 50 回日本周産期・新生児医学会学術集会. 2014 年 7 月 14 日, シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県浦安市)

③ Yoshida K, Hada M, Eguchi-Kasai K, Teramura T, Cucinotta FA, Morita T, ; Detection of Chromosome Aberration by using Histone H2AX-deficient mouse ES cells. Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposium, 2013 年 5 月 13 日, 京葉銀行文化プラザ(千葉県千葉市)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「加熱装置」

発明者: 森田隆、吉田佳世、木津あかね

権利者: 大阪市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-069853

出願年月日: 平成 27 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 「サイトグロビン遺伝子の機能が欠損している非ヒト疾患モデル動物」

発明者: 吉里勝利、河田則文、志賀亮子、森

田隆、吉田佳世

権利者: 大阪市立大学

種類: 特許

番号: 第 5645357 号

取得年月日: 平成 26 年 11 月 14 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/molecular-genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 佳世 (YOSHIDA, Kayo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30311921

(2) 研究分担者

木津 あかね (KIZU, Akane)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30623201

(3) 連携研究者

古山 将康 (KOYAMA, Masayasu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00183351

(4) 研究協力者

森田 隆 (MORITA, Takashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70150349

北田 紘平 (KITADA, Kohei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・大学

院生

林 雅美 (HAYASHI, Masami)

大阪市立大学・大学院医学研究科・大学

院生