

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670686

研究課題名(和文) 精子幹細胞をターゲットとした男性不妊症の診断ツールと新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of newly diagnostic tool and treatment for male infertility in terms of spermatogonial stem cell activity

研究代表者

林 祐太郎 (Hayashi, Yutaro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40238134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：有効な治療法がない男性不妊症への方策として、精子幹細胞機能に着目した。本研究では造精機能障害モデル動物を用い、幹細胞マーカーUTF1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) の発現と局在を検討した。その結果、精子幹細胞には活性型と潜在型が存在し、その比率が精子幹細胞活性として将来の妊孕性評価に重要な指標と考えられた。またヒト停留精巣においてもモデル動物と同様の評価が可能であった。UTF1は造精機能障害の最大要因である停留精巣の将来の精巣機能を予測するツールとして有用であり、男性不妊症の治療診断に生かせる成果であると思われた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of male infertility, we focused on the function of spermatogonial stem cells (SSCs). In this study, we investigated the expression and localization of stem cell marker "UTF1" (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) by using cryptorchid model rats and human testes. Our result showed that SSCs were divided into 2 types; actual and potential form, and we elucidated the attenuation of SSC activity in cryptorchid testes and the improvement of SSC activity by early orchiopexy. Moreover, to elucidate the reasons why cryptorchidism induce male infertility, we examined "adult" testes which were performed orchiopexy in childhood. And the result of our study showed that the past history of cryptorchidism induced the deterioration of SSCs activity and the enhancement of apoptosis of SSCs with miss-maturation of Sertoli cells. Our study suggested the efficacy of newly SSC marker which might predict future fertility.

研究分野：小児先天異常疾患

キーワード：男性不妊症 精子幹細胞 UTF1 停留精巣

1. 研究開始当初の背景

**<本研究に関連する国内・国外の研究動向並び位置づけ>**

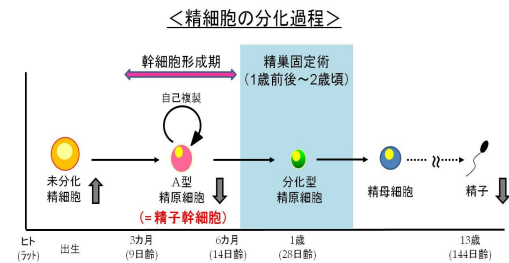
少子化問題はわが国を含めた先進諸国の課題であり、有効な治療法がない男性不妊症の対策は世界的な急務である。不妊症の約半数は男性要因であり、その原因として造精機能障害は約 70～90%を占める。しかし精子形成とその障害のメカニズムには不明瞭な点が多く、特に特発性造精機能障害に対する決定的な治療法は存在していない。また MD-TESE の採精率は満足いくものではなく決定的な治療法が存在しない。

一方で造精機能障害をきたす代表的な疾患として停留精巣が挙げられる。本症では、1 歳前後から 2 歳頃までの精巣固定術が推奨されているが、早期に精巣固定術を行っても、両側例の父性獲得率は約 50%である。このことは停留精巣の治療成績をさらに向上させる必要性を示すと同時に、停留精巣における造精機能障害が、これまで考えられてきた高温環境・環境ホルモンなどの外的要因のみでは説明できないことを示している。これまで私たちは、造精機能障害をきたす代表的疾患である停留精巣のモデル動物を開発し、手術療法の適正時期や治療の限界を示してきた。また、ヒトの停留精巣組織をもちい、幼若期からの組織障害の存在や、精巣下降に關与する候補遺伝子を明らかにしてきた。

これらの多くは停留精巣や精巣腫瘍などの精巣発育不全症候群の原因遺伝子や精子幹細胞のマーカー遺伝子と関連しており、停留精巣の妊孕性が、これらの遺伝子発現に影響を受けている可能性があると考えている。

**<着想に至った経緯>**

私たちが行った男性不妊症モデル動物の研究では、精細胞系の分化異常が生後早期から認められることを明らかにしている(右上図)。A 型精原細胞数の多寡により、将来の妊孕性はある程度予測されるが、この A 型精原細胞は自己複製能・多能性・未分化性の維持を持った精子幹



細胞 (spermatogonial stem cell ; SSC) として注目されている。このことから私たちは、造精機能障害による男性不妊症では、精巣自体が内包する先天的な因子が存在するのではと推察した。つまり、造精機能障害には精細胞系分化の異常を来す内在性要因として、A 型精原細胞の精子幹細胞としての機能低下が存在するのではと考えた。

そこで本研究では、幹細胞活性と精子形成との関係を明らかにするため、造精機能障害モデル動物の精巣とヒト不妊症精巣を用い、精子幹細胞における遺伝子発現や局在の変動、およびそれが及ぼす精子形成への影響を明らかにすることにより、造精機能障害の発症メカニズムを究明するという着想に至った。

2. 研究の目的

出生率の改善は、わが国の将来に重大な課題であり、男性不妊症の最大要因である造精機能障害の機序を解明する意義は大きい。近年、精子形成において、精子幹細胞の存在が注目されている。私たちも、これまでの研究で精子幹細胞マーカーと造精機能の相関を明らかにしてきた。これらの遺伝子の中でも UTF1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) が精子幹細胞に発現し、その活性を反映していることを突き止めた。これらの成果に基づき、造精機能障害における精子幹細胞の機能に与える影響を検討するため、停留精巣や特発性男子不妊症精巣などを用いた精子幹細胞活性を検討する。具体的には、男性不妊症の主因である停留精巣のモデル動物を用い、精細胞系の分化ならびに幹細胞活性の変化を、胎生期から経時的に評価する。また発現遺伝子の変動や機能解析により、造精機能に関わる精子幹細胞の活性カスケードを明らかにする。これらの結果をヒト停留精巣組織で検証し、造精機能障害の予測因子としての臨床応用を

目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 造精機能障害における精子幹細胞活性の検討

##### 不妊症モデル動物の作成

抗アンドロゲン剤である flutamide を S-D ラットに対して妊娠 14-21 日の 7 日間腹腔内投与し、生まれてきた仔を停留精巣モデルラットとして用いた。なおホルモン投与による遺伝子発現異常の可能性を排除するため、片側停留精巣個体を選別し、患側と健側を比較することとした。

##### 停留精巣ラットにおける UTF1 の発現

精子幹細胞活性を測定するマーカーとして UTF1 を用いた。定量 RT-PCR・Western Blotting・免疫染色にて、停留精巣での発現強度や発現時期を検討した。特に SSC における UTF1 発現の有無や陽性・陰性細胞比などの検討は幹細胞活性の測定に重要と考える。A 型精原細胞が出現する時期の前後において幹細胞活性を厳密に評価した。

##### ヒト停留精巣での UTF1 発現

私たちの施設では、病理組織学的検査目的に、停留精巣の手術時に精巣組織を凍結保存している。これらを用い、ヒトでの停留精巣における精細胞系分化と A 型精原細胞の精子幹細胞活性を検討し、モデル動物とヒトの病態の相同性を検証した。

#### (2) 培養細胞を用いた精子幹細胞の機能解析とエピゲノム制御異常

##### 精原細胞株を用いた遺伝子機能解析

得られた候補遺伝子の精巣での発現量を評価するため精原細胞株である GC-1 細胞を用いた。リポフェクション法による遺伝子導入および si-RNA を用いたノックダウンを行い、培養した GC-1 細胞における下流遺伝子の発現変化を検討した。

また候補遺伝子のなかにエピゲノム制御に関わるものが同定されたことから、ヒストンのメチル化状態についても検討を行った。

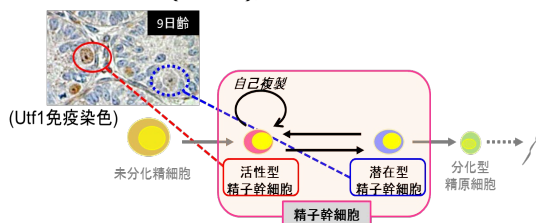
#### (3) 成人男性不妊症検体を用いた精子幹細胞

#### 胞の動態についての検討

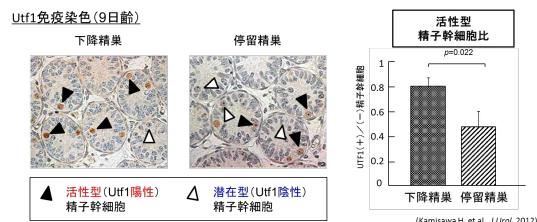
成人期において男性不妊症を呈した停留精巣の組織変化について検討するため、閉塞性無精子症 (OA; obstructive azoospermia) と診断された成人精巣を用い、停留精巣の既往の有無が精子幹細胞やセルトリ細胞などの機能変化を及ぼすかについてアポトーシスの有無を含め免疫組織学的に評価した。

#### 4. 研究成果

胎生 18 日から生後 12 週までのラット正常 (下降) 精巣の HE 染色から、始原生殖細胞から精子幹細胞への分化は生後 9 日に生じることが明らかにされた。また UTF1 を用い、精子幹細胞には活性型 (UTF1 陽性) と潜在型 (UTF1 陰性) の 2 種類が存在し、UTF1 陽性・陰性精子幹細胞比 (= 精子幹細胞活性) が将来の妊孕性予測に有用であった (下図)。



また片側停留精巣モデルラットを用いた研究から、停留精巣では生後早期から精子幹細胞活性が低下していることが明らかにされた (下図)。すなわち停留精巣は先天的

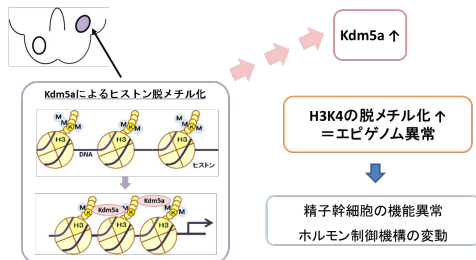


に幹細胞機能低下を内包していると考えられた。このことはヒト停留精巣での検討でも同様の結果であった。

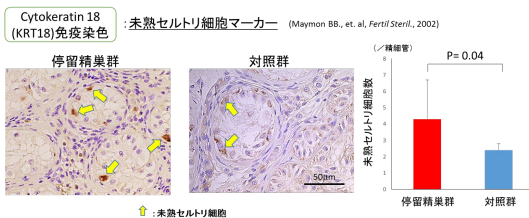
停留精巣と下降精巣の間の遺伝子発現差をスクリーニングするため行ったマイクロアレイ解析では停留精巣において 24 遺伝子の発現亢進と 39 遺伝子の発現低下を認めた。これらすべてに RT-PCR およびウエスタンブロットングを行った。その結果、KDM5A が再現性をもって停留精巣で発現亢進していることを明らかにした。KDM5A はヒストンタンパク H3K4 に結合しているジメチル基とトリメチル基の脱メチル化を行う酵素であり、停留精巣での精子形成障害にエピゲノム異常が存在することが示唆された。

精原細胞株である GC-1 細胞に KDM5A の遺伝子導入を行い、培養細胞でのメチル化解析および遺伝子発現定量を行ったところ、KDM5A の強制発現により精子幹細胞の脱メチル化の亢進と OCT3/4 (幹細胞マーカー) および ESR2 (エストロゲン受容体) の発現亢進を認めた。このことから停留精巣では精子幹細胞に先天的なエピゲノム異常が存在し、幹細胞機能を低下させていることが推察された (下図)。

造精機能障害を有する精巣



さらに男性不妊症検体を用いた研究から、停留精巣では治療を行っても成人期において精子幹細胞の活性低下、アポトーシスの亢進を認めた。また停留精巣では未熟なセルトリ細胞が有意に増加していた。(下図)



このことより停留精巣のような先天的要因から男性不妊症を引き起こす病態が存在し、それらでは精子幹細胞活性の低下と、セルトリ細胞の成熟異常による精子幹細胞のアポトーシス亢進が存在すると推察された。

## 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 40 件)

1. Nishio H, Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K. Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes. *J Urol*. 191:1564-72, 2014 査読有 doi: 10.1016/j.juro.2013.10.071.
2. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Nakane A, Kurokawa S, Kohri K, Hayashi Y. Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome wide analyses. *J Urol*. 192:535-41, 2014 査読有

doi: 10.1016/j.juro.2014.02.044.

3. Moritoki Y, Hayashi Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nishio H, Kurokawa S, Ugawa S, Kojima Y, Kohri K. Expression profiling of microRNAs in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. *J Urol*. 191:1174-80, 2014 査読有 doi: 10.1016/j.juro.2013.10.137.
4. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Kohri K, Hayashi Y. Gene Expression Profile During Testicular Development in Patients With SRY-negative 46,XX Testicular Disorder of Sex Development. *Urology*. 82:1453.e1-7, 2013 査読有 doi: 10.1016/j.urology.2013.08.040.
5. Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Hayashi Y, Kohri K. Attenuation of spermatogonial stem cell activity in cryptorchid testes. *J Urol*. 187:1047-52, 2012 査読有 doi: 10.1016/j.juro.2011.10.170.

〔学会発表〕(計 55 件)

1. Mizuno Kentaro, Hayashi Yutaro, Kamisawa Hideyuki, Moritoki Yoshinobu, Nishio Hidenori, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetuji, Yasui Takahiro: Elucidation of regulatory mechanisms during differentiation of spermatogonial stem cells via androgen action. 26th Congress of the European Society for Pediatric Urology, 2015.10.14-18, Praha (Czech Republic)
2. 林 祐太郎: 小児泌尿器科学における基礎研究のオーバービュー。第 24 回日本小児泌尿器科学会総会、2015.7.1-3、御茶ノ水ソランティカンファレンスセンター (東京都千代田区)
3. 神沢 英幸, 水野 健太郎, 西尾 英紀, 守時 良演, 岩月 正一郎, 黒川 覚史, 梅本 幸裕, 佐々木 昌一, 林 祐太郎, 安井 孝周: 停留精巣が男性不妊症に至る機序とは ~ 閉塞性無精子症患者の精巣検体を用いた研究 ~。第 34 回日本アンドロロジー学会学術大会、2015.6.26-27、福岡大学病院 (福岡県福岡市)
4. 西尾 英紀, 水野 健太郎, 神沢 英幸, 守時 良演, 最上 徹, 林 祐太郎, 郡 健二郎: 精子幹細胞活性に及ぼす精巣固定術の効果。ヒストンタンパク脱メチル化酵素 KDM5A のヒト造精機能障害への関与。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂 他 (石川県金沢市)
5. Hideyuki Kamisawa, Kentaro Mizuno, Satoshi Kurokawa, Yoshinobu Moritoki, Hidenori Nishio, Akihiro Nakane,

Tetsuji Maruyama, Yutaro Hayashi,  
Kenjiro Kohri: Expediency of early  
orchiopexy for spermatogonial stem  
cell activity in cryptorchid testes.  
The 103rd Annual Meeting of the  
Japanese Urological Association,  
2015.4.18-21, Kanazawa (Ishikawa)

〔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

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

### (2) 研究分担者

郡 健二郎 (KOHRI Kenjiro)  
名古屋市立大学・学長  
研究者番号：30122047

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

黒川 覚史 (KUROKAWA Satoshi)  
名古屋市立大学大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：50468253

神沢 英幸 (KAMISAWA Hideyuki)  
名古屋市立大学大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：00551277

西尾 英紀 (NISHIO Hidemori)  
名古屋市立大学大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10621063

小島 祥敬 (KOJIMA Yoshiyuki)  
福島県立医科大学医学部・教授  
研究者番号：60305539

(平成27年3月13日研究分担者より削除)