

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861444

研究課題名(和文) 遺伝子導入による精子形成におけるNotchシグナルの機能解析と不妊症治療への応用

研究課題名(英文) Function analysis of Notch signaling system in spermatogenesis using gene transfer technique and its application for treatment of male infertility

研究代表者

岩月 正一郎 (Iwatsuki, Shoichiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70595397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット精子形成におけるNumbおよびNumb-like(Notchシグナル伝達系の抑制因子)の機能について、in vivo遺伝子導入技術を用いて解析した。

NumbとNumb-likeは精母細胞以降の精細胞に発現があり、分化が進むにつれ、Numb発現は減少していた。In vivoでsiRNAを発現するベクターを導入し、NumbとNumb-likeをノックダウンすると、精母細胞から精子細胞への分化が阻害された。以上より、NumbおよびNumb-likeがNotchシグナルを抑制することで、精子細胞の分化を調節しており、それぞれ拮抗的に作用していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we assessed functions of Numb and Numb-like, which are inhibitory factors of Notch signal pathway, in rat spermatogenesis using in vivo gene transfer technique.

By immunohistochemistry, Numb and Numb-like were expressed in spermatocytes and later germ cells; however, Numb expression level was relatively lower in elongated spermatids than in spermatocytes and round spermatids. We constructed vector plasmid expressing siRNAs against Numb or Numb-like, which were transfected to rat testis in vivo. After knocking down of Numb or Numb-like in rat testis resulted in disturbance of differentiation of spermatocytes to spermatids. Our results suggested that Numb and Numb-like regulates differentiation of spermatids by inhibiting Notch signal pathway; Furthermore, it is suggested that Numb and Numb-like acts antagonistically each other.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：精子形成 遺伝子導入 Notchシグナル 機能解析

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 男性不妊症の治療とその限界

少子化問題は近年のわが国が抱える問題の中でも重大な問題であり、その対策は国家的急務である。現在、無精子症患者に対する標準的な治療は、顕微鏡下精巣内精子採取術 (microdissection testicular sperm extraction; micro-TESE) である。micro-TESE で精子採取ができなかった場合、そのカップルに残された治療は、他人の精子を利用する非配偶者間人工授精もしくは養子縁組しかない。したがって、精子採取術では治療不可能であった患者に対する新たな治療法の開発が望まれている。無精子症に対する新たな治療法の開発のためには、精子形成のメカニズムの解明が必須である。

### (2) これまでの私たちの研究と本研究に至った着想

私たちはこれまで、精子形成メカニズムの *in vivo* における解析ツールの確立を目的として、*in vivo* での遺伝子導入を行い、マウス精巣において *in vivo* で外因性の遺伝子を強制発現させる技術を確立した。

一方、私たちは精子形成を調節する細胞内シグナル伝達因子の検索を行うため、遺伝子の網羅的解析を行った。精子形成障害のある精巣で発現低下している遺伝子として、その結果、Numb (*Drosophila* Numb homolog) および Numb-like (*Drosophila* Numb-like homolog) を同定した。両遺伝子とともに、細胞間シグナル伝達系の Notch シグナルの抑制因子である。

## 2. 研究の目的

私たちは前に述べた Numb および Numb-like が精子形成に重要な役割を果たしていると考え、その精子形成における機能を解析することを計画した。

Numb および Numb-like の遺伝子は中枢神経系の発生に必須の遺伝子で、そのノックアウトマウスは胎生致死となる。したがってノックアウトマウスを用いた精子形成における機能解析は不可能である。

そこで私たちが確立した *in vivo* 遺伝子導入技術を用い、Numb および Numb-like にたいする siRNA (small interference RNA) を発現するベクタープラスミドを精巣に導入し、Numb および Numb-like のノックダウンによる機能喪失 (loss-of-function) 実験を計画した。本研究の目的は、哺乳類精巣での精子形成における Numb および Numb-like の機能、Notch シグナル伝達経路の役割を解明し、将来の Notch シグナル伝達経路からみた男性不妊症治療の新規治療の開発を目標としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常ラット精巣における Numb および Numb-like の発現

8 週齢の正常オス Sprague-Dawley (SD) ラットの精巣組織を用い、免疫組織化学にて Numb および Numb-like の発現局在を検討した。検討は蛍光抗体を用いた免疫染色により Numb および Numb-like の多重染色を用いた。

### (2) ラット週齢による Numb および Numb-like の発現量変化の検討

4、5、6、7、8、12 週齢の正常オス SD ラットの精巣組織を用い、Numb および Numb-like の mRNA 発現量の変化を、定量 RT-PCR 法を用いて検討した。

### (3) Numb および Numb-like に対する siRNA 発現ベクターの構築

Numb および Numb-like に対する siRNA の配列を、BLOCK-iT™ RNAi Designer tool を用いて設計した。それぞれ、以下の siRNA 配列を得た。

・ Anti-Numb: 5'-TGC TGC ATA GTG GAA GGC AGC TCA TTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AAT GAG CTC TTC CAC TAT GCA GG-3'

・ Anti-Numb-like: 5'-TGC TGT TCA ACC GTA GAC TCA GCT GAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TCA GCT GAC TAC GGT TGA ACA GG-3'

これらの配列を持つ siRNA と、陰性コントロール用として非特異的な配列を持つ siRNA を発現する配列の、計 3 種の配列を、pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR ベクターにそれぞれ挿入し、3 種類のベクタープラスミドを作成した。このプラスミドはレポーターとして EmGFP を発現するため、ベクターが導入された細胞は蛍光顕微鏡にて確認が可能である。

設計したベクタープラスミドは、TOP10 を competent cell として以後の研究に必要な量を増幅し、精製した。

### (4) 構築した siRNA 効果の確認

構築したベクタープラスミドを、ラット腎尿管上皮由来の細胞株である NRK-52E にカチオンリポフェクション方を用いて導入した。導入後 48 時間培養の後、定量 RT-PCR 法で Numb および Numb-like の mRNA 発現量が低下することを確認した。

### (5) ラット精巣への siRNA 発現ベクターの *in vivo* 導入

Numb および Numb-like に対する siRNA 発現ベクターをラット精巣に *in vivo* 導入するため、8 週齢オス SD ラットを、以下の 4 群に分けた。

・ A 群: Numb ノックダウン群

・ B 群: Numb-like ノックダウン群

・ C 群: Numb および Numb-like の二重ノックダウン群

・ D 群: 陰性コントロール群 (非特異的 siRNA を発現するベクターを導入)

ベクター溶液を可視化するために400mg/mLのトリパンブルーで着色した。最終的にベクタープラスミドの濃度が3.0□g/□LになるようにPBSで調整した。

調整したベクター溶液をラットの左精巣に30ゲージ針を用いて50□L注入し、100V 100ミリ秒の矩形波を1Hzで18回電気刺激し、遺伝子導入した。

導入7、14日後にラットを解剖し精巣を摘出した。摘出した精巣は薄切、切片作成の後、蛍光顕微鏡で観察した。GFP陽性(=ベクタープラスミドが導入された)細胞のうち、精細胞を精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞、伸長精子細胞の4段階に分類し、それぞれの割合を算出した。

#### 4. 研究成果

(1) 正常ラット精巣における Numb および Numb-like の発現

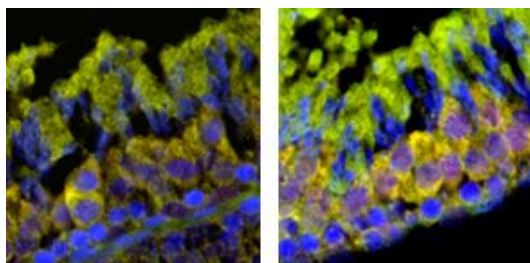


図1 ラット精巣における Numb(赤)および Numb-like(緑)の発現局在 青: DAPI による核染色

8週齢正常ラット精巣における Numb および Numb-like の発現局在を図1に示す。Numb および Numb-like は精母細胞、円形・伸長精子細胞に発現が認められた。精母細胞は黄色に発色しているが、精子細胞では緑色に発色しているため、Numb は精母細胞に比較し相対的に精子細胞で発現が少ないものと推察された。

(2) ラット週齢による Numb および Numb-like の発現量変化の検討

次に、4週齢から12週齢までの正常ラット精巣を用いて、Numb および Numb-like の mRNA 発現変化を検討した(図2)。なお、ラット精巣では、6週齢ころがヒトの第二次性徴にあたり、精子形成が開始される。

Numb は4週齢以降、発現は増加することがなかったが、Numb-like は6週齢(精子形成が開始する)でピークを示した後は徐々に低下した。

(3) Numb および Numb-like に対する siRNA 発現ベクターの構築

方法の欄で述べた方法により siRNA 発現ベクターを構築した。

(4) 構築した siRNA 効果の確認

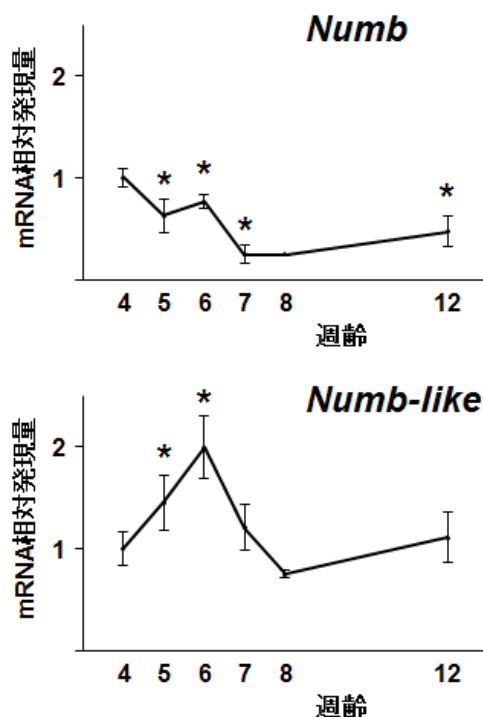


図2 週齢による Numb(上)および Numb-like(下) mRNA の発現変化 \* : 4週齢の発現量に対する  $p < 0.05$

方法の欄で述べた方法により siRNA ベクターの mRNA 発現抑制効果を確認した。

細胞回収後の定量 RT-PCR により、コントロールに比べ Numb は  $0.160 \pm 0.115$  倍、Numb-like は  $0.364 \pm 0.145$  倍に発現低下しており、構築したベクタープラスミドが siRNA を発現し、mRNA 発現を抑制していることを確認した。

(5) ラット精巣への siRNA 発現ベクターの in vivo 導入

構築した siRNA ベクタープラスミドをラット精巣に電気刺激を加えることにより遺伝子導入した。図3に導入7日(左写真)、14日目(右写真)の精巣組織を示す。病理組織所見においては電気刺激による組織障害は7日目、14日目では確認できないまで軽度であることがわかった。

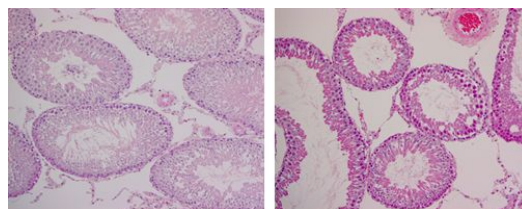


図3 電気刺激による遺伝子導入後7日(左)および14日(右)の精巣組織所見 Hematoxylin-eosin 染色。

次に siRNA 発現ベクター導入により Numb および Numb-like をノックダウンした精巣において、GAP 陽性(=ベクター導入された)細胞

の、精粗細胞/精母細胞/円形精子細胞/伸長精子細胞の割合を調べた(図4)。その結果、導入14日後にはNumbをノックダウンした群(A群)では円形および伸長精子細胞が減少(グラフ黒、\*および\*\*)し、Numb-likeをノックダウンすると伸長精子細胞が減少(グラフ白および薄灰、\*\*)した。

本研究より、NumbおよびNumb-likeは精巢内で、おもに減数分裂を行う精母細胞の時期より、精子細胞の分化にかけての分化に必要な因子であることが明らかとなった。

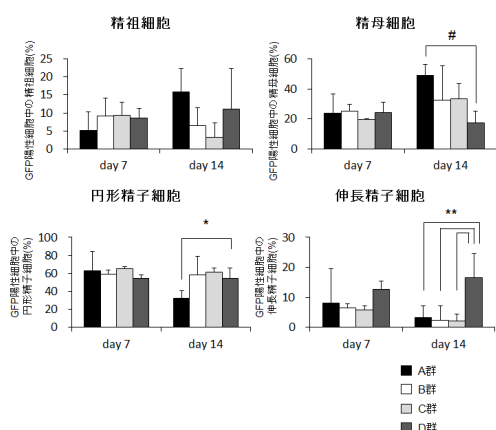


図4 Numb および Numb-like ノックダウンによる精細胞割合の変化 #, \*, \*\*: p<0.05

本研究期間内にすべてを明らかにすることはできなかったが、Numb および Numb-like が Notch シグナル伝達系の抑制因子であることを考えると、Notch シグナルが精巢における細胞分化抑制および幹細胞自己複製能の維持に関与していることが推察された。

また本研究で用いた in vivo 遺伝子導入法に関して、マウス精巢への遺伝子導入については報告があるものの、ラット精巢への遺伝子導入は、本研究が初の報告である。また精子形成障害にともなう男性不妊症の新たな治療ストラテジーとしての遺伝子導入治療への応用の可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Iwatsuki Shoichiro, Naiki Taku, Ando Ryosuke, Mizuno Kentaro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Proinflammatory and metabolic changes facilitate renal crystal deposition in an obese mouse model of metabolic syndrome. *Journal of Urology*, 2015 (doi:10.1016/j.juro.2015.07.083.) (査読あり)
2. Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Ando Ryosuke, Hamakawa Takashi, Iwatsuki Shoichiro, Taguchi Kazumi, Kobayashi

Daichi, Naiki Taku, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Umamoto Yukihiro, Kawai Noriyasu, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Laparoscopic versus open radical cystectomy for patients older than 75 years: a single-center comparative analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(15):6353-6358, 2015

(doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.15.6353) (査読あり)

3. 岩月 正一郎, 林 祐太郎, 梅本 幸裕, 佐々木 昌一: 停留精巣術後の無精子症と生殖補助医療。小児外科, 47(8): 869-872, 2015 (URL:http://www.tokyo-igakusha.co.jp/f/b/show/b01/820/zc01/5.html) (査読なし)
4. Iwatsuki Shoichiro: Influence of siRNA-expressing Vector Transfection on Adult Rat Testis In Vivo. *Nagoya Med J.* 54:9-21, 2014 (URL:http://id.ndl.go.jp/bib/026767859) (査読あり)
5. 梅本 幸裕, 岩月 正一郎, 佐々木 昌一: 特集: 泌尿器科医のためのクリニカル・パール(2) 男性不妊症のクリニカル・パール。臨床泌尿器科, 68(12):936-939, 2014 (URL:http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.1413200034) (査読なし)

〔学会発表〕(計70件)

1. 神沢 英幸, 林 祐太郎, 岩月 正一郎, 水野 健太郎, 梅本 幸裕, 佐々木 昌一, 安井 孝周: 停留精巣が男性不妊症に至る機序の解明~閉塞性無精子症患者の精巣組織を用いた研究~。第20回日本生殖内分泌学会学術集会、2016.1.9、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
2. 武田 知樹, 永井 隆, 梅本 幸裕, 岩月 正一郎, 窪田 泰江, 神谷 浩行, 窪田 裕樹, 阪野 里花, 佐々木 昌一, 林 祐太郎, 郡 健二郎, 安井 孝周: 高度乏精子症における精子採取の検討。第65回日本泌尿器科学会中部総会、2015.10.23-25、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
3. 岩月 正一郎, 佐々木 昌一, 梅本 幸裕, 安井 孝周: 非閉塞性無精子症患者のテストステロンと性機能障害・男性更年期症状の関連。日本性機能学会第26回学術総会、2015.9.18-20、福岡国際会議場 他(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, 岩月 正一郎, 梅本 幸裕, 佐々木 昌一, 林 祐太郎, 安井 孝周: ヒストンタンパク脱メチル

- 酵素 KDM5A によるヒト停留精巣での造精機能障害機序の解明。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）
5. 岩月 正一郎、佐々木 昌一、西尾 英紀、神沢 英幸、窪田 裕樹、梅本 幸裕、安井 孝周：肥満が無精子症患者の精子採取率と内分泌環境に及ぼす影響。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）
  6. 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）
  7. 梅本 幸裕、佐々木 昌一、岩月 正一郎、窪田 裕樹、出原 麻里、佐藤 剛、杉浦 真弓、郡 健二郎、安井 孝周：高度乏精子症における精子採取の検討。第 37 回中部生殖医学会学術集会、2015.6.6、名古屋大学（愛知県名古屋市）
  8. Iwatsuki Shoichiro, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Kamiya Hiroyuki, Umemoto Yukihiro, Kohri Kenjiro: Influence of radical prostatectomy on serum bioavailable testosterone level in Japanese patients with localized prostate cancer: a longitudinal study. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
  9. Sasaki Shoichi, Iwatsuki Shoichiro, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Umemoto Yukihiro, Kohri Kenjiro: Accuracy of percutaneous measurement of testicular volume using caliper in Japanese infertile men. IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015.4.26-29, Yokohama (Japan)
  10. Iwatsuki Shoichiro, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Umemoto Yukihiro, Kohri Kenjiro: Sperm retrieval rate and sertoli cell maturity in azoospermic men with a history of cryptorchidism. IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015.4.26-29, Yokohama (Japan)
  11. Sawada Yuki, Sato Takeshi, Saito Chieko, Matsukawa Yasushi, Izuhara Mari, Sugiura Mayumi, Iwatsuki Shoichiro, Umemoto Yukihiro, Sasaki Shoichi: Time-lapse monitoring of oocytes activated artificially with electrical stimulation following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with immotile sperm retrieved by micro-dissection testicular sperm extraction (MD-TESE). IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015.4.26-29, Yokohama (Japan)
  12. Umemoto Yukihiro, Sasaki Shoichi, Iwatsuki Shoichiro, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Kamiya Hiroyuki, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Can sperm be retrieved in men with an FSH level less than 10 mIU/mL? A study of aspermic patients with an FSH level less than 10 mIU/mL. IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015.4.26-29, Yokohama (Japan)
  13. 梅本 幸裕、佐々木 昌一、岩月 正一郎、窪田 裕樹、窪田 泰江、神谷 浩行、神沢 英幸、内木 拓、藤田 圭治、水野 健太郎、戸澤 啓一、林 祐太郎、郡 健二郎：FSH10mIU/ml 未満における無精子症患者の検討。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）
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
岩月 正一郎 (IWATSUKI, Shoichiro)  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
 研究者番号：70595397
  - (2) 研究協力者  
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：10347403
  - 梅本 幸裕 (MEMOTO, Ukihiro)  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
 研究者番号：80381812
  - 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
  - 郡 健二郎 (KOHRI, Kenjiro)  
 名古屋市立大学・学長  
 研究者番号：30122047