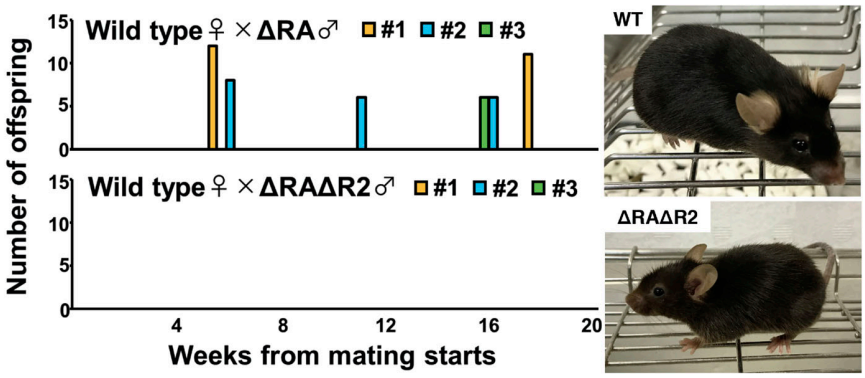
47　非閉塞性乏精子症の発症機序・予防・治療に関する研究	高島　誠司

【目的】我が国は人口減少局面に際しており少子化対策は喫緊の課題であり、実際カップルの 6 組に 1 組は不妊治療を必要としている。不妊の原因の半数は男性にあり、そのうち 3 割は補助生殖医療適用が困難な非閉塞性乏精子症／無精子症である。本研究の目的はヒト疾患モデル動物を用いた非閉塞性乏精子症の病態メカニズム解明である。

【方法】本研究で用いる遺伝子改変マウスは東京理科大学の岩倉洋一郎教授より導入し繁殖させて使用した。精巣その他の組織解析は病理切片作製、遺伝子発現解析はリアルタイム PCR により行なった。

【結果】我々はヒト乏精子症を発症するヒト疾患モデルマウス『ΔRAΔR2 マウス』を見出した。このマウスは炎症性サイトカイン IL1 の拮抗阻害分子 IL1RA 及びおとり受容体 IL1R2 の双方を欠損しており、IL1 シグナルが過剰に入力される。このマウスは雄性不妊であり、精巣重量の低下、精巣内伸長精子細胞の減少、精巣上体内での精子消失と円形精子細胞の異所性局在、ライディッヒ細胞の退縮、を確認した。さらに、下垂体における生殖ホルモンの発現抑制、及び精巣におけるテストステロン合成遺伝子の発現低下を見出した。IL1 シグナルの過剰入力は、何らかの形で下垂体機能低下をもたらし、結果として精巣機能低下を誘導したと推察される。

雄性不妊を示すΔRAΔR2 マウス



47. 非閉塞性乏精子症の発症機序・予防・治療に関する研究

高島　誠司

信州大学 繊維学部 応用生物科学科

Key words：雄性不妊，精子幹細胞，サイトカイン，ヒト疾患モデル動物

緒　言

我が国は有史以来初の人口減少局面にあり、その原因である少子化に対する対策が喫緊の課題である。カップルの6組に一組は不妊に悩んでいるとされており、その半数は男性側に問題を抱えている。雄性不妊の半数以上は、作られた精子が何らかの原因で射出できないもの、あるいは血管閉塞により精巣に対する流入血液に異常（量の低下、温度の上昇など）が生じ、精子形成に異常をきたすものとされている。これらの場合は男性不妊の3割ほどが、乏精子症或いは無精子症と呼ばれる、補助生殖医療による妊孕性救済ができないタイプの不妊であるとされている。加えて、婚姻年齢の高年齢化がこの問題に拍車をかけている。このような背景から、男性不妊対策の重要性が高まっている。

しかしながら、男性不妊症の病態メカニズムの理解はほとんど進んでいない。不妊症のモデルマウスとしては、抗がん剤投与による生殖細胞除去マウス［1］、精子形成が途中で中断してしまう実験的停留睾丸精巣モデルマウス［2］、生殖細胞の発生異常を来すマウス［3］、精子の機能異常を示すもの［4］、等々多く存在するが、いずれもヒトの乏精子症・無精子症の病態発症過程を反映したものではない。つまり、病態モデルの不在がこの研究分野の進展のボトルネックとなっている。

こうした背景から我々は、ヒトの乏精子症・無精子症病態を反映するヒト疾患モデル動物の作製を目指した。2013年、非閉塞性乏精子症患者精巣で炎症性サイトカインIL1の拮抗分子IL1RAの発現低下が確認された［5］。個体においてIL1-IL1RAバランスが崩れると、過剰な炎症反応が惹起され、関節リウマチ等多彩な症状が現れることが知られていた［6］。この症状はBalb/c系統のみでみられ、C57BL6/Jなどほかの系統では見られないが、何れにしてもIL1RAを欠損するマウス（ΔRAマウス）は雌雄ともに妊孕性を有していた。一方、IL1シグナルについてはおとりレセプターIL1R2が存在し、関節リウマチ病態の進展を抑制する働きを担っている。そこで我々は、IL1シグナルをより強力に入力するべく、IL1RAとIL1R2の双方を欠損するΔRAΔR2マウスを作出したところ、オスが妊孕性を喪失することを突き止めた。このマウスの精巣では、精子形成過程での伸長精子の形成効率が悪く、精巣上体には伸長精子になる前段階の円形精子様細胞の細胞の滞留が見られ、精子形成過程での何らかの機能低下があることが伺われた。

そこで本研究では、我々が新しく見出したヒト雄性不妊モデルマウス『ΔRAΔR2マウス』が呈する雄性不妊の病態メカニズムの解明を目的とした。

方　法

1.　実験動物

野生型のC57BL6/Jマウスは日本SLCより入手した。遺伝子改変マウス（*Il1rn*$^{<tm1Yiw>}$, *Il1r2*$^{<tm1Yiw>}$）［7，8］は、東京理科大学生命医科学研究所ヒト疾患モデル研究センターの岩倉洋一郎博士のグループで作製されたマウスを、Material Transfer Agreementを締結し導入した。遺伝子の多重欠損マウスについては、当該マウスを掛け合わせることで作出し使用した。本研究は、信州大学実験動物委員会により承認を受けて遂行された（承認番号： 260013 及び 280120）。組換えDNA実験計画については、信州大学DNA組換え実験委員会による承認を受けて遂行された（承認番号：No.17-052）。

2. 妊孕性評価

8〜10 週齢のオスのΔRAΔR2 マウスあるいはΔRA マウスをケージにアイソレートし、1 週間後に 8 週齢のメスの C57BL6/J マウスを入れて mating させ、産仔数を計測した。

3. 病理切片解析

12 週齢のオスのΔRAΔR2 マウスより精巣を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定ののちパラフィンブロックに包埋し、病理切片（ヘマトキシリン・エオジン染色）を作製、光学顕微鏡にて観察した。

4. 遺伝子発現解析

4、8、12 週齢のオスのΔRAΔR2 マウスより精巣、下垂体、視床下部を摘出し、セパゾール super G（nacalai tesque）を用いて total RNA を抽出、Rever-Tra Ace with gDNA remover（東洋紡）で cDNA を合成した。このサンプルについて、TB Green™ *Premix Ex Taq*™ II 及び Thermal Cycler Dice® Real Time System（共にタカラバイオ）を用い定量的 RT-PCR により遺伝子発現量を測定した。目的遺伝子について、ハウスキーピング遺伝子 *Hprt* を用いてノーマライズしたのちに定量比較を行った。

結果及び考察

まず、野生型メスとの交配による妊孕性の比較を行った（図 1）。IL1RA のみを欠損するΔRA マウスは子孫を作成することが可能で、リッターサイズも野生型のオスと差は見られなかった。しかし、ΔRAΔR2 マウスは同様の条件で掛け合わせを行なっても全く産仔を得られず、不妊であることが確認された。

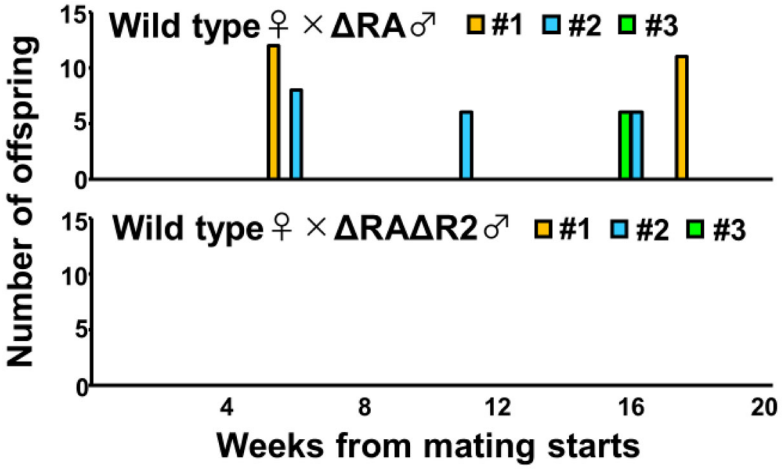


図 1. ΔRAΔR2 マウスオスは自然交配による子孫作成ができない

研究対象マウス（ΔRAΔR2 及びΔRA）それぞれ三匹を個別ケージで 1 週間単独飼育したのち、オス一匹あたり三匹の野生型のメスと掛け合わせを行なった。ΔRA マウスからは野生型メスとの子孫が得られたが、ΔRAΔR2 マウスからは子孫が得られなかった。

また、精巣における遺伝子発現解析を行なったところ、テストステロン合成に関わる遺伝子 *Cyp17a1* の発現低下が見られた（図 2A）。これらのことは、予備実験で確認していた精巣重量の低下（図 2B）、精巣におけるライディッヒ細胞の退縮、及び伸長精子の減少（図 2C）と一致していた。

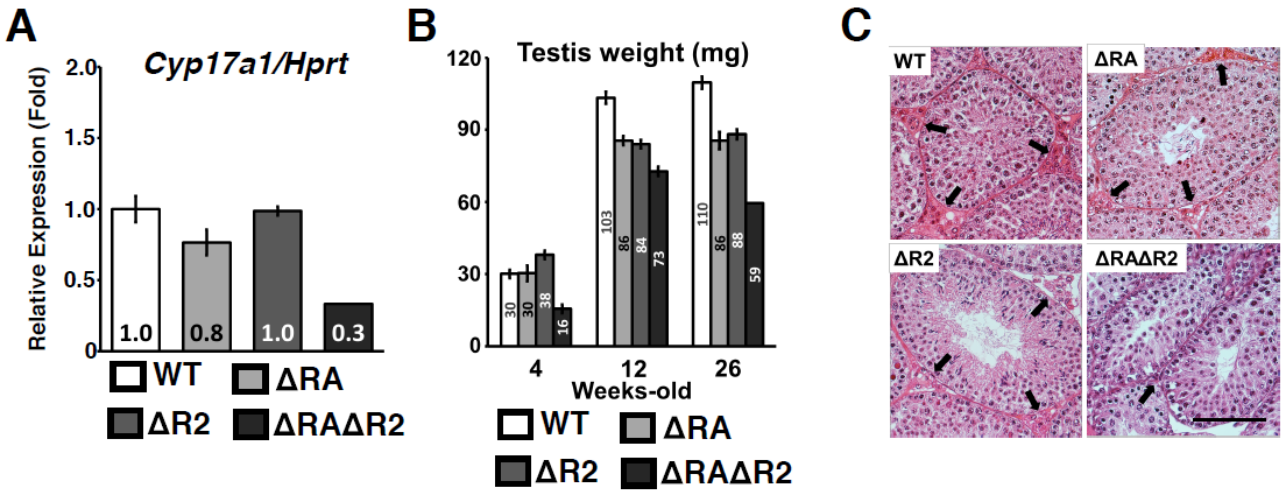


図 2.　ΔRA ΔR2 マウス精巣が示す異常

A. 精巣における遺伝子発現解析。ΔRA ΔR2 マウス精巣ではテストステロン合成関連遺伝子の発現が低下していた。B. 精巣重量。ΔRA ΔR2 マウス精巣は他の精巣に比較し重量が軽かった。C. 精巣病理切片。矢印はライディッヒ細胞を示す。ΔRA ΔR2 マウス精巣ではライディッヒ細胞の退縮が見られた。加えて、伸長精子細胞を含む精細管も減少していた。Bar = 100 μm（C）.

一方、視床下部における *Gnrh* 発現は正常であったが、下垂体における *Lhb* 及び *Fshb* の発現が抑制されていることから（図 3A、3B、3C）、過剰な IL1 シグナルが何らかの形で下垂体の機能抑制あるいは細胞障害を引き起こしているものと推察された。IL1 は関節リウマチなど自己免疫疾患を引き起こすことがしられており、このことを考慮すると、ΔRA ΔR2 マウスの雄性不妊も自己免疫疾患によるものである可能性が考えられた。

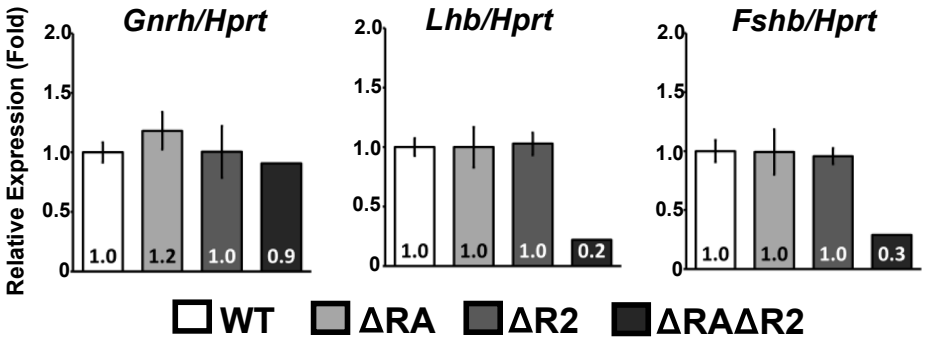


図 3.　ΔRA ΔR2 マウスの視床下部・下垂体機能

視床下部で発現するゴナドトロピン放出ホルモン（*Gnrh*）の発現は変化が見られなかったが、下垂体における黄体形成ホルモン（*Lhb*）及び卵胞刺激ホルモン（*Fshb*）の発現抑制が見られた。

しかしながら、下垂体や視床下部では免疫細胞の浸潤など自己免疫疾患の徴候を示す所見は得られなかった（図 4）。

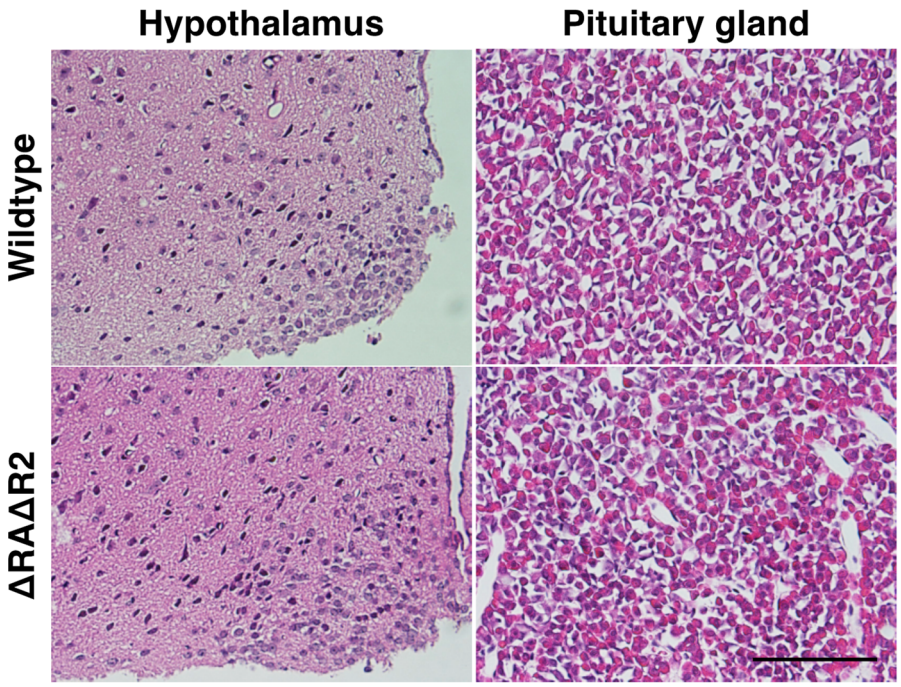


図 4.　ΔRAΔR2 マウスの視床下部・下垂体組織解析
それぞれの組織で免疫担当細胞の浸潤など自己免疫性の炎症などを示す兆候は見られなかった。Bar = 100 μm.

ΔRAΔR2 マウス体内では全身性に IL1 刺激の過剰入力がなされやすい状況になっており、それが何らかの形で雄性不妊をもたらすと予想していた。上記解析から、下垂体の機能低下によるテストステロン産生低下が原因である可能性が示唆された。しかし、関節リウマチなど IL1 シグナル過剰入力が引き起こす自己免疫疾患で見られるような免疫細胞の浸潤は、下垂体・精巣双方で見られなかった。今後は、IL1 分子の作用点探索、及び IL1 下流で活性化される分子の探索を通じ、IL1 シグナルがどのようにして精巣機能低下を招くかを明らかにする。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻病態動物医科学講座実験動物学研究室の角田茂准教授、理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤研究室の越後貫成美専任技師、持田慶司専任技師である。

文　献

1)　Kanatsu-Shinohara M1, Toyokuni S, Morimoto T, Matsui S, Honjo T, Shinohara T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. Biol Reprod. 2003 May;68(5):1801-7. Epub 2002 Dec 11. PMID: 12606387 DOI: 10.1095/biolreprod.102.012575

2)　Nishimune Y, Aizawa S, Komatsu T. Testicular germ cell differentiation in vivo. Fertil Steril. 1978 Jan;29(1):95-102. PMID: 23321

3)　Takashima S, Shinohara T. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. Stem Cell Res. 2018 Mar 15;29:46-55. PMID: 29587218 doi: 10.1016/j.scr.2018.03.006.

4)　Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. J Clin Invest. 2010 Apr;120(4):984-94. PMID: 20364096 doi: 10.1172/JCI41585. Epub 2010 Apr 1.

5) Malcher A1, Rozwadowska N, Stokowy T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M. The gene expression analysis of paracrine/autocrine factors in patients with spermatogenetic failure compared with normal spermatogenesis. Am J Reprod Immunol. 2013 Dec;70(6):522-8. Epub 2013 Jul 19. PMID: 23869807 DOI: 10.1111/aji.12149
6) Iwakura Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Aug-Oct;13(4-5):341-55. PMID: 12220548
7) Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. J Exp Med. 1998 May 4;187(9):1463-75. PMID: 9565638
8) Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Liu Y, Mizoroki A, Ikarashi T, Horai R, Kakuta S, Watanabe T, Iwakura Y. IL-1 receptor type 2 suppresses collagen-induced arthritis by inhibiting IL-1 signal on macrophages. J Immunol. 2015 Apr 1;194(7):3156-68. PMID: 25725107 doi: 10.4049/jimmunol.1402155. Epub 2015 Feb 27.