

P-007 ヒト精巣組織へのレンチウイルスを用いた分化多能性マーカーの導入による多能性幹細胞の誘導

○小林 秀行, 永尾 光一, 岡 祐輔, 石渡 誉朗, 神戸 茂樹, 永田 雅人, 山辺 史人, 高杉啓一郎, 石井 玄一, 田中 祝江, 原 啓, 石井 延久
東邦大学

【目的】精巣内における精原幹細胞は精子形成の源となる細胞である。最近、ヒトにおいて、培養条件を変えることによって精巣由来の多能性幹細胞が得られたとの報告がある。我々は、分化多能性マーカーを精巣組織に強制導入することにより、細胞に変化がみられるかどうか検討を行なった。【方法】東邦大学医学部倫理委員会の承認を経て実験を行なった。東邦大学医療センター大森病院リプロダクションセンターを受診し、精巣生検にて採取した検体の一部を使用した。精巣組織は DNAase 処理およびトリプシン処理を行ない数日間の培養を行った。NANOG, LIN28, Oct3/4, Sox2 又は Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc をレンチウイルスにて精巣由来細胞に導入した。数日培養後に MEF フィーダープレートにまきなおし、ES 培養液にて培養を行ない、細胞に変化がないかどうか観察を続けた。【成績】NANOG, LIN28, Oct3/4, Sox2 の組み合わせでは、形態学的に細胞の変化は 30 日間でみられなかった。Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc の組み合わせでは、実験開始 16 日後より、扁平な ES 様コロニーの形成がみられた。20 日目に、これらの ES 様コロニーをピックアップした。MEF feeder 上で、増殖を続けて、形態は、ES 様コロニーを呈していた。STR 法にてこれらのコロニーが実験に用いた精巣組織由来であることを確認した。さらに RT-PCR を行ない、NANOG や Oct3/4 などの ES 細胞で発現する遺伝子の発現を確認した。また、生殖細胞の特異的な遺伝子である VASA や DAZL の発現はみられなかった。【結論】Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc の導入で、ES 細胞様コロニーが得られ、増殖させることができた。将来的に男性不妊症患者から ES 様細胞を作製し、男性不妊の解明に役立てていきたい。

P-008 Buslfan 投与による造精機能障害マウスに対する GnRH agonist, r-hFSH および hCG 投与による精子形成回復効果の検討

○平井 利明¹, 辻村 晃², 福原慎一郎², 高尾 徹也², 宮川 康², 西村 憲二¹, 奥山 明彦²
兵庫県立西宮病院泌尿器科¹, 大阪大学医学部泌尿器科²

【背景と目的】精巣内精子採取術による非閉塞性無精子症における精子回収率は約 50% にすぎず、これを向上させるためには造精機能を回復させる治療法の開発が重要である。以前より GnRH analogue には精細胞の分化誘導効果があることが知られており、今回我々は酢酸リユープロレリン (GnRH agonist), フォリトロピン α (r-hFSH) および胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) を用いて buslfan 投与による非閉塞性無精子症モデルマウスにおける造精機能の改善効果について検討した。【方法】5 週齢 C57/BL6 マウスに buslfan (35mg/kg) を皮下注射し造精機能障害を発症させ、2 週間後より以下のように群分けして薬剤投与を開始した。A: saline 投与群, B: GnRH agonist のみ投与, C: r-hFSH+hCG 投与, D: GnRH agonist+r-hFSH+hCG 投与 (各群 9-10 匹)。buslfan 投与後 2 週間目に saline (0.2ml/mouse) または GnRH agonist (3.75mg/kg) を皮下注射した。さらに 2 週間経過後に saline (0.2ml/mouse, 週 5 回皮下注) または r-hFSH (1IU/mouse, 週 5 回皮下注), hCG (0.5IU/mouse, 週 2 回皮下注) を 4 週間投与した。薬剤投与終了後、両側精巣を摘除し、精巣組織所見の変化を評価した。評価には精母細胞以上の分化を認める精細管数の全精細管に占める割合 (% of differentiating tubules: %dt) を用いた。なお、本実験は大阪大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。【結果】%dt はそれぞれ A 群 0.94 ± 0.26 , B 群 7.22 ± 0.92 , C 群 1.70 ± 0.34 , D 群 21.1 ± 3.04 であった。【考察】Buslfan による造精機能障害マウスにおいて、GnRH agonist+r-hFSH+hCG を投与することにより精巣組織所見が改善される傾向を認めた。GnRH agonist 投与により造精機能障害に伴うゴナドトロピンの持続的高値を低下させると同時に、Sertoli・Leydig 細胞のホルモン応答性も回復させた後、さらにゴナドトロピンの補充を行う事により精細胞の分化が一部回復または保持されたと考えられる。

P-009 日本人パリンドローム複合体 gr/gr 再組換えによる AZF (Azoospermia factor) c 領域の部分欠失と精子濃度の解析

○Ho-Su Sin¹, 高 栄哲¹, 杉本 和宏¹, 重原 一慶¹, 前田 雄司¹, 吉田 淳², 並木 幹夫¹
金沢大学医薬保健研究域医学系集学的治療学 (泌尿器科学)¹, 木場公園クリニック²

【目的】ヒトゲノムプロジェクトが完遂し、ヒトゲノムの構造的な多様性が注目されている。Y 染色体上に精子形成領域は AZF (azoospermia factor) と呼ばれ 3 つの領域 (AZFa, b, c) に分類され、この領域の完全欠失は、精子形成障害を惹起するので、精子形成領域と考えられている。しかし AZFc の部分欠失は未だ造精機能に影響を与えるどうかは、論争のあるところである。それは、ゲノムの構造的バリエーション (多様性) によるところが多く、この領域に partial AZFc deletion と duplication, さらにこの領域での相同再組換えによる、コピー数が関与する可能性が報告されている。Y 染色体の遠位側には AZFc 領域を含む、パリンドローム複合体から成り、AZFc 部分欠失、特にパリンドローム複合体の 1 部である gr/gr 再組換えが注目されている。【方法】ゲノム分析に対する文書により同意を得た 128 症例について精子濃度および gr/gr 再組換えのパターンを分析した。不妊患者は原因不明のものを選択した。Krauz らの方法 (J Med Genet vol 46, 2009) によって、sY1291 の有無を確認し、gr/gr 欠失のあるものから、CDY1, DAZ のコピー数を算定し、RFLP 法によって CDY1, DAZ のコピー数について分析した。レファレンス配列を、DAZ が 4 コピー, CDY1 が 2 コピーある。gr/gr 欠失は DAZ と CDY のコピー数によって特徴づけられる。subtype として 1) DAZ1/DAZ2+CDY1a 2) DAZ3/DAZ4+CDY1a 3) DAZ1/DAZ2+CDY1b 4) DAZ3/DAZ4+CDY1b の 4 種が最も頻度が多い。【成績】妊孕性の確認された日本人中 29.6% (38/128) が gr/gr 再組換えによる欠失をもつ。38gr/gr 再組換えのうちサブタイプ 1+2 が 90% であった。これらと、非 gr/gr 欠失間に精子有意差はなかった。【考察】DAZ と CDY は AZFc 領域内にある精子形成遺伝子である。これらのコピー数によって、発現量が変化すると考えられ、すなわち gene dosage によって、日本人の精子数に変化を与えないことがわかった。