

国際交流助成(海外渡航)

野生動物（象）の停留精巣における正常精子形成の謎を探る：  
ヒト造精機能障害の改善を目指して

佐藤陽子

山口大学共同獣医学部臨床繁殖学教室

(要約)

通常哺乳類では停留精巣では熱ストレスのために精子形成が停止するが、ゾウの精巣は停留精巣下でも正常な精子形成を行う。本研究では熱ストレスにより変動する熱ショック関連タンパクに注目し、ゾウ精巣サンプル及びゾウ線維芽細胞の初代培養細胞を用いて、免疫組織化学法によりその発現動態を検討した。結果、ゾウの線維芽細胞では熱ストレス下において、熱ショックタンパク質が細胞保護のために他の哺乳動物と同様に使用されるが、ゾウの精巣では、異なる仕組みにより精細胞が保護されている可能性があることが示唆された。

(背景)

通常、ヒトを含む哺乳類では、陰嚢内の精巣温度は体温よりも低いですが、体腔に留まる停留精巣では低い精巣温度を維持することができず、精巣内温度が上昇し、精子形成過程で精細胞の細胞死が起こり、完全な精子形成が起こらない(文献 1, 2)。しかし、ゾウの精巣は停留精巣下でも正常な精子形成を行うことが知られている(文献 3)。ゾウと同様に停留精巣で正常精子を行う哺乳類として、他にクジラが知られているが、停留精巣付近に特殊な冷却装置を持つため(文献 4)、停留精巣内での温度上昇による精子形成へのストレスはない。しかしゾウではそのような冷却装置については報告されておらず、ゾウの精巣は停留状態での温度上昇によるストレス存在下で正常精子形成を行う類のない珍しい例である。

停留精巣内での温度上昇によるストレスは、通常、heat shock factor (HSF)を上昇させ、精細胞を細胞死へと誘導するが、heat shock protein (HSP)の発現により、細胞死を回避する機構もあること、また、同ストレスが精細胞の支持細胞であるセルトリ細胞のcystic fibrosis trans membrane conductance

regulator (CFTR)の発現を減少させ、結果として精巣の tight junction の構造を破壊し、精子形成に影響を及ぼす事(文献 5)などが知られており、これらの因子の発現動態の変化が、停留精巣下での異常な精子形成の原因の一つと考えられている。しかしながら、野生動物でかつ絶滅危惧種であるゾウの試料は国外での実験使用が大変難しいため、現在迄調査研究が殆ど進んでおらず、停留精巣下での正常精子形成のメカニズムは全く不明である。

今回、私は通常停留精巣では温度上昇に起因するストレスにより誘導される分子の発現調節がゾウ精巣内では通常の哺乳類とは異なっており、結果として、精細胞の細胞死が回避され、精子形成が正常に進むと仮説をたてた。このストレスの精子形成に対する影響は、精細胞に対する直接影響と精子形成への精巣内環境を作り出す Sertoli 細胞を含む体細胞を介した間接的な影響が考えられる。つまり、精細胞においては、ゾウ精巣内で温度上昇のストレスがあっても、1)HSF が多く発現し、HSP が多く誘導されるため、細胞死が起こらず精子形成が正常に進む。(仮説 1) 2) HSF は通常より多くは誘導されず、精細胞は細胞死を起こさない(仮説 2) 3) セルトリ細胞において、温度上昇ストレスにより CFTR が上昇し、tight junction 形成能が維持されるため、結果として精子形成が正常に進む環境を維持できる(仮説 3) という精細胞をサポートする周囲体細胞に依存する仮説である。

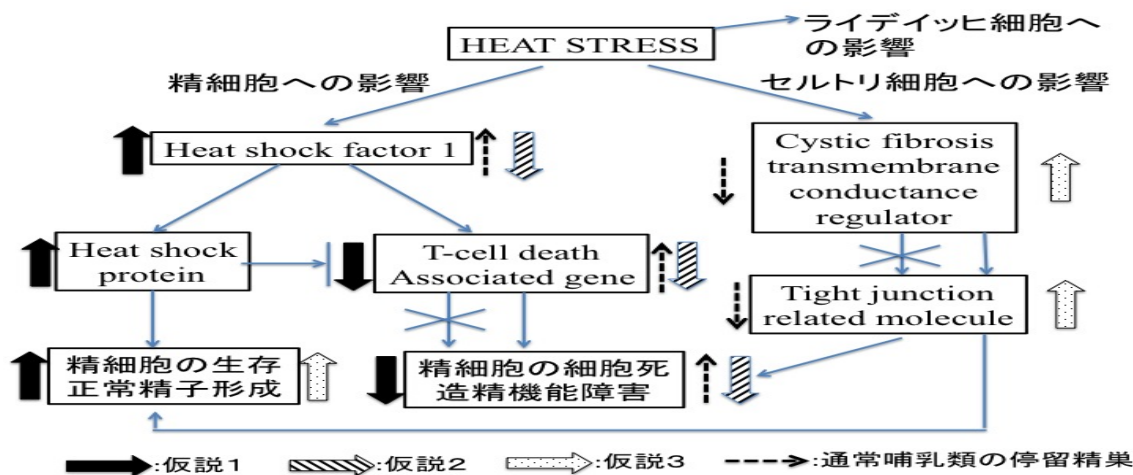


図 1) ゾウ停留精巣における正常精子形成のメカニズム (仮説)

これらの仮説検証のため、ゾウ (*Asian elephant, Elaphas maximus*) 生息地であるタイにおいて精巣サンプルを収集し、免疫組織化学的手法を用いて、ゾウ精巣内で、精原細胞における HSFs, HSPs, T cell death associated gene (TDAG51)発現状態及び、Sertoli 細胞における CFTR、tight junction molecule

の解析を行い、これらの因子の発現挙動を明らかにすることを目的として実験を行った。

#### (材料及び方法)

ゾウサンプルはチェンマイ大学ゾウ野生動物研究室においてホルマリン標本として保存されていた成獣 2 頭、未成熟な幼獣 1 頭の精巣、及びゾウ保護センターで冷凍保管されていた幼獣 1 頭の精巣を用いた。チュラロンコーン大学獣医学部で、ホルマリン標本サンプルを PBS で洗浄後脱水し、パラフィン包埋したブロックを作製、パラフィン切片を作製し免疫抗体染色に用いた。冷凍保管されていた幼獣の精巣は、一部を oct compound に包埋し、凍結切片を作製後、4%PFA/PBS で固定し免疫抗体染色に用いるか、又は、4%PFA/PBS で固定後にパラフィン包埋したブロックを作製、パラフィン切片を作製し、免疫抗体染色に用いた。さらに、熱ストレスの影響を *in vitro* で検討するため、ゾウ幼獣皮膚由来の初代線維芽細胞培養系と、幼獣精巣をスライスした器官培養系を用いて、熱ショックを与えた後継続培養し、熱ショックによる分子の発現動態を免疫抗体染色により検討した。免疫組織染色の結果は組織切片の写真撮影を行い、画像解析装置を用いて輝度を測定し、定量的解析を行った。

#### (結果)

今回、熱ショックタンパク質関連の因子の発現状態を免疫組織化学法によりゾウ精巣切片上で検討したところ、幼獣、成獣ともに、HSF1 の発現は見られたが HSP70 の発現は見られなかった(図 2)。

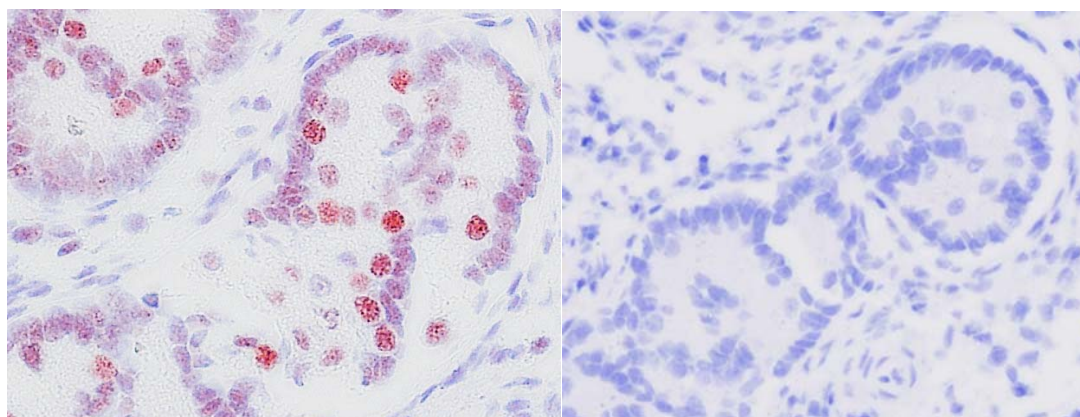


図 2) ゾウ精巣での HSF1 発現 (左) と HSP70 未発現 (右)

次に、熱ショックタンパク質の発現動態をゾウで検討するため、はじ

めにゾウの線維芽細胞の初代培養細胞を用いて検討を行った。ゾウの線維芽細胞に培養下で熱ショックを与えたところ、**HSF1** の発現上昇は熱ショック後1時間後に見られ、また **HSF1** の上昇に引き続き **HSP70** の発現が見られた。さらに、細胞死誘導と関与する **TDAG51** の発現は熱ショック直後からみられたが、**HSF1** の発現上昇後に減少した。これらの結果から、ゾウ線維芽細胞には、これらの熱ショック関連タンパク質が存在すること、そして、熱ストレス下において、他の哺乳類の体細胞及び精細胞と同様に **HSF1** の発現量が上昇し、**HSF1** により熱ショックタンパク質が誘導され、また細胞死に関連する因子が抑制され細胞が保護されることが明らかとなった。

そこで、さらにゾウ精巣断片の組織培養を試み、熱ショックを与えたところ、**HSF1** の発現上昇が熱ショック後に見られたが、**HSP70** の発現はまったく見られなかった。この結果は、熱ショックによってゾウ精巣の精細胞での **HSF1** の発現は誘導されても、**HSP70** の発現は誘導されていないことを示している。また、**TDAG51** の発現はゾウ線維芽細胞への熱ショック時とは異なり、熱ショック後すぐには誘導されず、熱ショック後4時間に若干の上昇が見られた。このことから、熱ショック直後の細胞死を抑制するために **HSP70** の発現に依存しない何らかの異なる機構が働いていることが示唆される。

#### (考察及び今後の展望)

哺乳動物の体細胞及び精細胞では、熱ストレスにおいて、熱ショック後にまず、**HSF1** が誘導され、さらにその下流にある **HSP70** の発現上昇により、細胞死に関与する **TDAG51** の発現が減少し、細胞を保護することが示唆されている。本実験より、ゾウ初代線維芽細胞では、熱ストレス下において、他の哺乳類の体細胞及び精細胞と同様に、熱ショックタンパク質の誘導により細胞が保護されることが明らかとなったが、ゾウの精巣の精細胞では、**HSF1** が熱ショックによって誘導されるものの、他の哺乳動物とは異なる仕組みにより精細胞が保護されている可能性があることが示唆された。

本研究を始めるにあたり、予想した精細胞に直接働きかける仮説1及び2は少なくとも、**HSP70** を経由し細胞を保護するという意味では棄却されると考えられる。しかしながら、**HSF1** が熱ストレスに反応して上昇することから、精細胞を守るために、**HSF1** の上昇により誘導される精細胞内の何らかの因子を経由して精細胞が保護されている可能性があり、今後はその因子の検討

が必要である。また、今回は検討できなかった精細胞を保護、及び支持するセルトリ細胞またライディッヒ細胞に着目し、ゾウ精巣においてどのような分子の発現変化が起こっているのかを検討していく予定である。今後、ゾウ精巣内で他の哺乳類精巣との各種分子の発現状態の比較を行うことにより、ゾウ停留精巣下で正常精子形成を誘導する仕組みを明らかにし、ヒト造精機能障害の改善に寄与していきたいと考えている。

(謝辞)

本研究を遂行するにあたり、ご協力、ご指導いただきました、タイ王国チュラロンコーン大学獣医学部 Prof. M. Techakumphu, Assist. Prof. T. Thalasanit, チェンマイ大学獣医学部 Assist. Prof. C. Thitaram, ゾウ保護センター Dr. S. Mahasawangkul、山口大学共同獣医学部音井威重教授に感謝いたします。また、今回の渡航に際しまして海外渡航助成をいただきました中山科学振興財団、公益信託林女性自然科学者研究助成基金に感謝いたします。尚、タイ王国滞在費用及び研究費の一部につきましては、タイ王国チュラロンコーン大学在外研究者派遣交流プログラムによる補助を受け、本研究を遂行することができました。重ねて感謝いたします。

(文献)

1. Chowdhury AK & Steinberger E. A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testes. *Am. J. Anat.* 115: 509-524. (1964)
2. Kocak I, Dundar M, Hekimgil M, Okyay P. Assessment of germ cell apoptosis in cryptorchid rats. *Asian J. Androl.* 4:183-186. (2002)
3. Rommel SA, Pabst DA, McLellan WA, Mead JG, Potter CW. Anatomical evidence for a countercurrent heat exchanger associated with dolphin testes. *Anat. Rec.* 232:150-156. (1992)
4. Hayashida N, Inouye S, Fujimoto M, Tanaka Y, Izu H, Takaki E, Ichikawa H, Rho J, Nakai A. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J.* 25:4773-4783. (2006)
5. Chen J, Fok KL, Chen H, Zhang XH, Xu WM, Chan HC. Cryptorchidism-induced CFTR down-regulation results in disruption of testicular tight junctions through up-regulation of NF- $\kappa$ B/COX-2/PGE2. *Hum Reprod.* 27:2585-2597. (2012)