

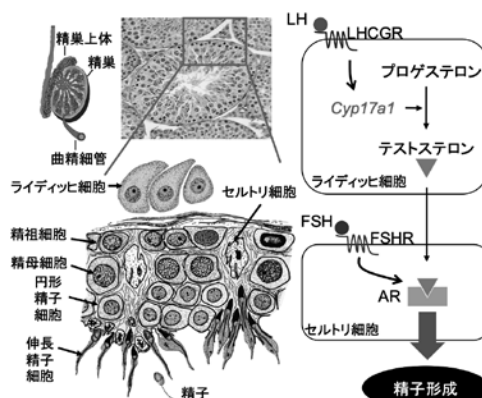
【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：組織特異的トランスフェリン受容体欠損マウスを用いた精子形成不全の究明とその応用	
研究代表者：生物資源科学部生命環境学科（生命科学コース）准教授 山下泰尚	連絡先：yamayasu@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
【研究概要】 家畜の増産や人の男性不妊治療のためには、精子形成メカニズムを理解する必要がある。我々は、精巣のプロテオーム解析を行った結果、鉄輸送タンパク質のトランスフェリン（TF）を見出した。TF 受容体（TFR1）は精巣においてライディッヒ細胞に発現が限局していたことから、Cre-loxp システムを用いてライディッヒ細胞の <i>Tfr1</i> を欠損させた (<i>Tfr1</i> ^{lc-/-}) マウスを作成し、精子形成への影響を調べた。その結果、 <i>Tfr1</i> ^{lc-/-} マウスでは、精子の運動性、精子濃度、精母細胞から伸長精子細胞までの各生殖細胞の数、精子形成促進因子の発現が低下し、この結果精子形成不全となることが初めて明らかになった。	

【研究目的】

乳牛や肉牛を生産するためには、優良形質を仔牛へと遺伝させる雄ウシ（種雄牛）を選抜する必要がある。しかし種雄牛の選抜には、候補牛自身の増体量による直接検定に加え、候補牛の精子を用いた人工授精により誕生した仔牛の形質（間接検定）により評価されることから、長い期間と高いコストを要する。この間、無精子症、精子無力症を発症する牛も多い。またヒトにおいても無精子症、精子無力症による男性不妊症も大きくクローズアップされ始めており、無精子症、精子無力症の要因解析が急務である。

精子形成は、精子形成の起こる曲精細管の精子を支持するセルトリ細胞とその間を埋めるライディッヒ細胞（Leydig Cell; LC）の2つの体細胞が重要である。下垂体由来の LH はライディッヒ細胞の LH 受容体（LHCGR）を刺激し、テストステロン合成遺伝子（CYP17A1）の発現を増加させテストステロンが合成される。また下垂体由来の FSH は、セルトリ細胞に発現する FSH 受容体（FSHR）を刺激すると、テストステロン受容体（Androgen Receptor; AR）の発現を増加させる。ライディッヒ細胞で合成されたテストステロンは、セルトリ細胞の AR を刺激し、この結果、精細管内の精母細胞の減数分裂を促進し、精子が形成される。無精子症や精子無力症は、精子形成メカニズムの破綻によることから、精子形成メカニズム解明を基盤とした究明が求められる。



当研究グループでは、精巣機能に必須の因子を探索する目的で、精巣のプロテオーム解析を実施し結果、精巣には極めて高濃度で鉄輸送タンパク質であるトランスフェリン（TF）が蓄積することを見出した。末梢組織において、TF と結合した鉄は末梢組織に運搬され、TF 受容体（TFR1）と結合し、エンドソームとして取り込まれる。取り込まれた鉄イオンは、代謝酵素の補因子として様々な代謝経路を活性化させる。精巣の TFR1 は精巣のライディッヒ細胞に局在していたことから、Cre-loxp システムを用いてライディッヒ細胞特異的に *Tfr1* を欠損させた *Tfr1*^{lc-/-} マウスを作成した。本研究では、*Tfr1*^{lc-/-} マウスを用いて、精巣における鉄の役割を検討した。

【研究成果】

実験 1:ライディッヒ細胞特異的 *Tfr1* 遺伝子の欠損が体重、精巣重量、精巣鉄濃度に及ぼす影響

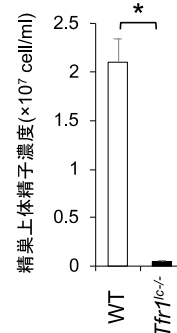
実験 1 では、*Tfr1*^{lc-/-} マウスおよび *Tfr1*-floxed（野生型：Wild type (WT)）マウスにおける体重、精巣重量、精巣内鉄濃度を比較解析した。その結果、体重、精巣重量は、WT マウスおよび *Tfr1*^{lc-/-}

【研究区分：先端的研究】

マウスに同等の値を示したが、精巣内鉄濃度は *Tfr1*^{lc-/-}マウスにおいて有意に低下した。

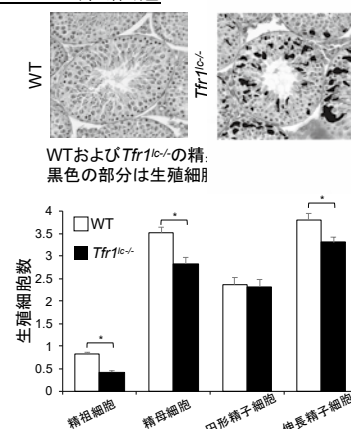
実験 2：ライディッヒ細胞特異的 *Tfr1* 遺伝子の欠損が精巣上体精子の運動性および精子濃度に及ぼす影響

哺乳動物では精巣で作られた精子は一旦、精巣上体に蓄積され、前進運動性を獲得し、射出されることから、WT マウスおよび *Tfr1*^{lc-/-}マウスの精巣上体精子の運動性と精子濃度の比較解析を行った。その結果、WT マウスの精巣上体から回収した精子は、前進運動を行っていたが、*Tfr1*^{lc-/-}マウスの精子のほとんどが旋回運動をし、濃度も WT マウスに比べ *Tfr1*^{lc-/-}マウスで有意に低い値を示した（右図）。



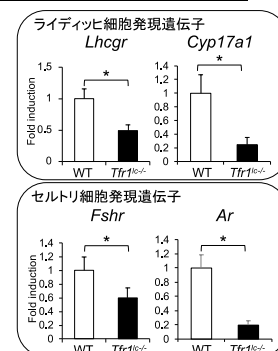
実験 3：ライディッヒ細胞特異的 *Tfr1* 遺伝子の欠損が精巣内景および生殖細胞数に及ぼす影響

精巣内において精子は曲精細管内で作成され、基底膜側から管腔内に向かい精粗細胞（精子幹細胞）、精母細胞（減数分裂直前期）、円形精子細胞、伸長精子細胞の順で作成される。実験 3 では、WT マウスと *Tfr1*^{lc-/-}マウスの精巣切片を作成し、これらの各種生殖細胞数をカウントし、比較解析した。その結果、WT マウスの精巣切片においては、各種生殖細胞が規則的に配列し、精子形成が正常に行われていた。一方、*Tfr1*^{lc-/-}マウスの精巣切片においては精粗細胞、精母細胞、伸長精子細胞において脱落が認められ、これらの細胞数は WT マウスと比較して有意に低下していた（右図）。



実験 4：ライディッヒ細胞特異的 *Tfr1* 遺伝子の欠損が精子形成促進因子の発現に及ぼす影響

哺乳動物の精子形成は、ライディッヒ細胞およびセルトリ細胞の精子形成促進因子（LHCGR, CYP17A1, FSHR および AR）が誘導することが明らかになっている。このことから、実験 4 では、ライディッヒ細胞特異的 *Tfr1* 遺伝子の欠損が、*Lhcgr*, *Cyp17a1*, *Fshr*, *Ar* の発現に及ぼす影響を調べる目的で、9 週齢の WT マウスと *Tfr1*^{lc-/-}マウスの精巣における発現量を比較解析した。その結果、WT マウスに比べ *Tfr1*^{lc-/-}マウスでは、これらの精子形成促進因子の発現が有意に低下していた（右図）。



【考察および今後の展望】

本研究により、ライディッヒ細胞における *Tfr1* 遺伝子欠損による精巣における鉄欠乏は、精子形成促進因子の発現を有意に下げ、この結果、精巣内の精粗細胞から伸長精子細胞に至るまでの各種生殖細胞の脱落を誘導し、精子形成不全が生じることが明らかになった。しかし、令和元年度の研究では、「なぜ精巣内で鉄量が低下すると精子形成促進因子の発現量低下が起こるのか？」のメカニズム究明には至らなかった。このことから、今後はこの機構について明らかにしていく予定である。また、現在ウシの凍結精液販売大手のジェネティクス北海道との共同研究として、種雄牛候補となりながら精液正常の低下により選抜に漏れたウシの血液、精巣上体、精巣のサンプリングを行っていることから、種雄牛候補から漏れるウシの何%が精巣の鉄量不足によるものなのかを明らかにする応用研究を進めているところである。さらに、男性不妊において鉄の重要性はこれまで科学的根拠が示されていないことから、精子形成に必要な条件検討を基盤とした鉄量を配合したサプリメントの開発などに応用展開していきたい。