



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1948号
学位記番号	第1378号
氏名	武田 知樹
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	Identification of active spermatogenesis using a multiphoton microscope (多光子顕微鏡を用いた活動的な精子形成部位の同定)  Andrology 2023 (Online ahead of print)
論文審査担当者	主査： 杉浦 真弓 副査： 鵜川 真也, 濱野 高行

## 論文内容の要旨

【背景】非閉塞性無精子症（non-obstructive azoospermia：NOA）は無精子症の約 70%を占める。NOA の標準治療である顕微鏡下精巣内精子採取術（microdissection testicular sperm extraction：micro-TESE）では、精子を含む可能性が高い太く蛇行した精細管を採取する。しかし NOA における micro-TESE の精子採取率は 25～60%と低く、報告によって差がある。その原因として、採取する精細管の選択基準が精細管の外観に基づいた術者の主観によることが挙げられる。そこで本研究では、精子を含む精細管を客観的に選択できる方法を開発することを目的とした。

本研究では、精子形成のマーカーとしてアクチンフィラメント（F-actin）を用いた。F-actin は、apical ectoplasmic specialization（apical ES）と呼ばれる伸長精子細胞に特異的な接着複合体に強く発現する。Apical ES が存在する精細管は、精上皮において最も成熟した精細胞である伸長精子細胞を含むと考え、私たちは apical ES の F-actin を蛍光標識し、精子を含む精細管を同定することを試みた。

.....

【方法】10 週齢正常ラットの精巣組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。精細管の細胞核と F-actin をそれぞれ NucSpot™ Live 488 Nuclear Stains と Phalloidin-iFluor555 reagent で蛍光標識し、組織を薄切することなく多光子顕微鏡で観察した。また、伸長精子細胞を欠損した精子形成障害モデルラットを作成し、正常な精細管の多光子顕微鏡像と比較した。次に、精巣内に SPY555-Actin を注入することで 10 週齢正常ラットの精細管を蛍光標識し、組織を固定することなく多光子顕微鏡で観察した。また蛍光標識剤の精巣毒性を評価するため、正常精巣と蛍光標識剤を注入した精巣を TUNEL（Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling）染色し、比較した。

.....

**【結果】** 固定した精細管において、伸長精子細胞が同定された。また、伸長精子細胞に一致して apical ES の F-actin が観察された。さらに、精細管における細胞核の配列と F-actin の局在を見ることで伸長精子細胞の分化段階が識別された。精子形成障害モデルでは、伸長精子細胞と apical ES の F-actin は観察されなかった。蛍光標識剤を注入した非固定の精巣では、apical ES の F-actin が観察され、精細管における F-actin の局在を見ることで伸長精子細胞の分化段階が識別された。

正常精巣と蛍光標識剤を注入した精巣において、1 精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数に有意差は見られなかった。

.....

**【結論】** 蛍光標識剤と多光子顕微鏡を用いることで、精細管を薄切することなく精上皮を観察できた。精細管の F-actin を蛍光標識することによって、組織の固定の有無に関わらず精細胞の分化段階を識別できた。さらに、蛍光標識剤の明らかな精巣毒性は見られなかった。本研究の方法は、活動的な精子形成部位を同定するライブイメージングを実現する可能性がある。

(注) 和文で 2, 0 0 0 字以内でまとめる

## 論文審査の結果の要旨

【背景】非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia : NOA) は無精子症の約 70%を占める。NOA の標準治療である顕微鏡下精巣内精子採取術 (microdissection testicular sperm extraction : micro-TESE) では、精子を含む可能性が高い太く蛇行した精細管を採取する。しかし NOA における micro-TESE の精子採取率は 25~60%と低く、報告によって差がある。その原因として、採取する精細管の選択基準が精細管の外観に基づいた術者の主観によることが挙げられる。そこで本研究では、精子を含む精細管を客観的に選択できる方法を開発することを目的とした。本研究では、精子形成のマーカーとしてアクチンフィラメント (F-actin) を用いた。F-actin は、apical ectoplasmic specialization (apical ES) と呼ばれる伸長精子細胞に特異的な接着複合体に強く発現する。Apical ES が存在する精細管は、精上皮において最も成熟した精細胞である伸長精子細胞を含むと考え、apical ES の F-actin を蛍光標識し、精子を含む精細管を同定することを試みた。

【方法】10 週齢正常ラットの精巣組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。精細管の細胞核と F-actin をそれぞれ NucSpot™ Live 488 Nuclear Stains と Phalloidin-iFluor555 reagent で蛍光標識し、組織を薄切することなく多光子顕微鏡で観察した。また、伸長精子細胞を欠損した精子形成障害モデルラットを作成し、正常な精細管の多光子顕微鏡像と比較した。次に、精巣内に SPY555-Actin を注入することで 10 週齢正常ラットの精細管を蛍光標識し、組織を固定することなく多光子顕微鏡で観察した。また蛍光標識剤の精巣毒性を評価するため、正常精巣と蛍光標識剤を注入した精巣を TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 染色し、比較した。

【結果】固定した精細管において、伸長精子細胞が同定された。また、伸長精子細胞に一致して apical ES の F-actin が観察された。さらに、精細管における細胞核の配列と F-actin の局在を見ることで伸長精子細胞の分化段階が識別された。精子形成障害モデルでは、伸長精子細胞と apical ES の F-actin は観察されなかった。蛍光標識剤を注入した非固定の精巣では、apical ES の F-actin が観察され、精細管における F-actin の局在を見ることで伸長精子細胞の分化段階が識別された。正常精巣と蛍光標識剤を注入した精巣において、1 精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数に有意差は見られなかった。

【考察・結論】蛍光標識剤と多光子顕微鏡を用いることで、精細管を薄切することなく精上皮を観察できた。精細管の F-actin を蛍光標識することによって、組織の固定の有無に関わらず精細胞の分化段階を識別できた。さらに、蛍光標識剤の明らかな精巣毒性は見られなかった。本研究の方法は、活動的な精子形成部位を同定するライブイメージングを実現する可能性がある。

【審査内容】申請者による約 20 分の研究内容発表を行った。その後、主査の杉浦教授から、不妊症における男性不妊因子の割合変化への考察、造精機能障害の原因、micro-TESE 成績の不均一性の原因、先行研究との違い、論文の投稿過程など 13 項目、第一副査の鵜川教授から、SPY プローブの構造、蛍光標識剤の毒性評価、二光子顕微鏡観察での注意点、研究の発展性など 6 項目、第二副査の濱野教授から、非閉塞性無精子症の病態、精子採取術の成績向上の可能性、micro-TESE の成績評価、in vivo 応用への課題、など 8 項目の質問があった。これらの質問に対して申請者から、一部回答に窮したものの概ね適切な回答が得られ、本論文の内容について十分に理解し、専攻分野 (腎・泌尿器科学) に関する知識を習得しているものと判断された。本研究は、多光子顕微鏡を用いて、精巣内の F-actin の蛍光標識から伸長精子細胞を含むと考えられる精細管の同定を行った。本研究の発展は、多光子顕微鏡を用いた活動的な精子形成部位を同定して採取する治療法へ応用されることが期待された。よって、本論文の筆頭著者である申請者は、博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 杉浦 真弓 副査 鵜川 真也、濱野 高行