



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1014 号
氏名	岩月 正一郎
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	Influence of siRNA-expressing Vector Transfection on Adult Rat Testis <i>In Vivo</i> (<i>In vivo</i> における siRNA 発現ベクター導入がラット精巣におよぼす影響) Nagoya Medical Journal (Accept for publication)
論文審査担当者	主査： 杉浦 真弓 副査： 高橋 智, 郡 健二郎

論文内容の要旨

【背景と目的】非閉塞性無精子症(NOA)患者に対する治療として、外科的精子採取術が行われている。NOA患者のおよそ半数からは精子採取が不可能である。したがってNOA患者の精子採取成績の向上が、男性不妊症診療において重要な課題である。私たちの教室ではこれまで、マウス精巣に電気刺激法を用いて遺伝子を導入する技術を確立してきた。この手法は、ラットのようなノックアウト動物の作成が困難な動物種での *in vivo* 実験への応用や、NOA患者に対する遺伝子治療への応用が可能である。本研究では、マウス精巣で精子形成に関与するといわれている遺伝子；*Numb* および *Numb-like (Numbl)* に対する siRNA を発現するベクタープラスミドをラット精巣に導入することで、その影響を評価し、*Numb* および *Numbl* のラット精巣における機能を解析することを目的とした。

【方法】NUMB および NUMBL の発現局在を、8週齢正常精巣を用いて免疫組織化学により調べた。また *Numb* および *Numbl* の発現量の経時的な変化を4週齢～12週齢の正常ラット精巣を用いて評価した。*Numb* および *Numbl* のノックアウトマウスは胎生致死となるため、精子形成の評価が困難である。そこで、*Numb* および *Numbl* に対する siRNA を発現するベクターを構築した。このベクターにはレポーター遺伝子として GFP を組み込んだ。正常8週齢ラットを、Group A: *Numb* ノックダウン群、Group B: *Numbl* ノックダウン群、Group C: *Numb* および *Numbl* ノックダウン群、Group D: ネガティブコントロール群（非特異的 siRNA を発現するベクターを導入）の4群に分類し、対象の左精巣にベクタープラスミドを電気刺激法により導入した。導入7、14日後に精巣組織を採取し、組織学的評価をした。GFP を発現している精細胞をベクター導入細胞とし、GFP 陽性である精原細胞・精母細胞・円形精子細胞・伸長精子細胞を計数し、各群間でその割合を比較した。また組織採取時の精巣重量と hematoxylin & eosin 染色標本による組織学的形態を各群間で比較した。

【結果】NUMB および NUMBL は8週齢正常ラット精巣において、精原細胞・精母細胞・円形精子細胞・伸長精子細胞に発現を認めたが、円形精子細胞に至ると相対的に NUMB 発現量が減少し、NUMBL 発現量が増加していた。*Numb* mRNA 発現量は週齢を経るにつれて減少する傾向であった一方で、*Numbl* の発現量は4週齢から6週齢まで増加し、以後減少していた。電気刺激法により *Numb* および *Numbl* に対する siRNA 発現ベクターを導入したところ、導入後7日目では GFP 陽性細胞の割合に各群間で差はなかったが、導入後14日目において Group A では円形精子細胞以降の GFP 陽性精細胞が、Group B および C では伸長精子細胞以降の GFP 陽性精細胞の割合が有意に減少していた。精巣全体を観察すると、電気刺激・ベクター導入による精巣障害は認めず、精巣容量も各群間で有意差を認めなかった。

【考察】*Numb* および *Numbl* はそれぞれ類似の配列を持つ遺伝子としてクローニングされており、神経発生における細胞の増殖/分化の調節因子と言われている。本研究では精巣における発現を検討したが、その発現パターンは両者で異なっており、類似配列を持つ分子でありながら異なる機能を持つと考えられた。ラットの正常精巣において *Numb* および *Numbl* をノックダウンすると、円形および伸長精子細胞の分化が障害されていたことから、ラット精巣において *Numb* および *Numbl* は精子細胞の分化を調節しているものと推察された。一方で、ラットへの電気刺激では精巣への物理的障害は認めなかったことから、電気刺激法による遺伝子導入が安全な方法であるものと考えられた。本研究によりラット精巣における *Numb* および *Numbl* の機能が明らかとなったとともに、電気刺激による遺伝子導入が安全な方法であることが示され、将来の遺伝子治療の開発に向けての基礎になると考えられた。

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】非閉塞性無精子症(NOA)患者に対する治療として、外科的精子採取術が行われているが、半数からは精子採取が不可能である。先行研究ではマウス精巣に電気刺激法を用いて遺伝子を導入する技術を確認してきた。本研究では、マウス精巣で精子形成に関与するといわれている遺伝子；*Numb* および *Numb-like (Numb1)* に対する siRNA を発現するベクタープラスミドをラット精巣に導入することで、その影響を評価し、*Numb* および *Numb1* のラット精巣における機能を解析することを目的とした。

【方法】NUMB および NUMBL の発現局在を、8 週齢正常精巣を用いて免疫組織化学により調べた。また *Numb* および *Numb1* の発現量の経時的な変化を 4 週齢～12 週齢の正常ラット精巣を用いて評価した。*Numb* および *Numb1* に対する siRNA を発現するベクターを構築した。正常 8 週齢ラットを、Group A: *Numb* ノックダウン群、Group B: *Numb1* ノックダウン群、Group C: *Numb* および *Numb1* ノックダウン群、Group D: ネガティブコントロール群の 4 群に分類し、左精巣にベクタープラスミドを電気刺激法により導入した。導入 7、14 日後に精巣組織を採取し、組織学的評価をした。GFP を発現している精細胞をベクター導入細胞とし、GFP 陽性である精原細胞・精母細胞・円形精子細胞・伸長精子細胞を計数し、各群間でその割合を比較した。また組織採取時の精巣重量と組織学的形態を各群間で比較した。

【結果】NUMB および NUMBL は 8 週齢正常ラット精巣において、精原細胞・精母細胞・円形精子細胞・伸長精子細胞に発現を認めたが、円形精子細胞に至ると相対的に NUMB 発現量が減少し、NUMBL 発現量が増加していた。*Numb* mRNA 発現量は週齢を経るにつれて減少する傾向であった一方で、*Numb1* の発現量は 4 週齢から 6 週齢まで増加し、以後減少していた。ベクター導入後 14 日目において Group A では円形精子細胞以降の GFP 陽性精細胞が、Group B および C では伸長精子細胞以降の GFP 陽性精細胞の割合が有意に減少していた。電気刺激・ベクター導入による精巣障害は認めず、精巣容量も各群間で有意差を認めなかった。

【考察】*Numb* および *Numb1* はそれぞれ類似の配列を持つ遺伝子としてクローニングされており、神経発生における細胞の増殖/分化の調節因子と言われているが、発現パターンは両者で異なっており、類似配列を持つ分子でありながら異なる機能を持つと考えられた。ラットの正常精巣において *Numb* および *Numb1* をノックダウンすると、円形および伸長精子細胞の分化が障害されていたことから、ラット精巣において *Numb* および *Numb1* は精子細胞の分化を調節しているものと推察された。一方で、ラットへの電気刺激では精巣への物理的障害は認めなかったことから、電気刺激法による遺伝子導入が安全な方法であるものと考えられた。

【審査の内容】

主査の杉浦から、ヒトにおいてどのような遺伝子導入によって精子形成が期待できるかなど 11 項目、副査高橋教授からは電気刺激によって精細管の大小不同があり、障害はないとはいえないなど 12 項目、郡教授からは男性不妊症と精巣腫瘍との関係、今後の研究における夢についての質問があり、良好な回答が得られた。申請者は学位論文について十分理解しているとともに、生殖医学に関する知識を有していると考えられた。本研究により *Numb* および *Numb1* が精子形成に関与していることが明らかとなった。以上を持って本論文の筆者は博士（医学）の称号を与え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 高橋 智、郡 健二郎