



Adenoviral-mediated HGF expression inhibits germ cell apoptosis in rats with cryptorchidism

合田, 上政

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3167

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003167>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 5 3 】

氏 名・（本 籍） 合田 上政 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1613号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年9月30日

【 学位論文題目 】

ADENOVIRAL-MEDIATED HGF EXPRESSION INHIBITS GERM
CELL APOPTOSIS IN RATS WITH CRYPTORCHIDISM

（ラット停留精巣モデルにおける hepatocyte growth factor
遺伝子導入の造精機能に対する効果について）

審 査 委 員

主 査 教 授 千原 和夫

教 授 黒田 義和

教 授 横崎 宏

1. 序文

不妊症の約半数は男性要因であり、原因として造精機能障害の占める割合は大きい。精子形成は細胞増殖、減数分裂、機能分化の過程からなり、精巣内には複雑な細胞間調節機構が存在する。精巣機能を調べるために最もよく用いられる動物実験モデルの一つに停留精巣モデルがある。ラット停留精巣モデルにおいて停留精巣作成後4日から2週の間に精巣重量は減じ、病理組織学的には精細管径の減少と精子形成の障害を認め、造精機能障害は停留精巣作成6週後には精巣固定術を施行しても不可逆となることが知られている。

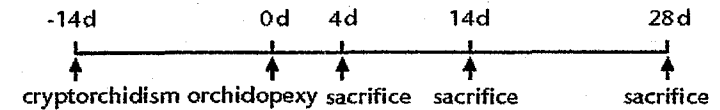
肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は1984年 Nakamura らにより肝細胞のDNA合成を最も強力に促進する蛋白として発見された。以後HGFは肝細胞のみでなく他の細胞に対してもmitogen, motogen, morphogenとして多様な生物活性を有することが報告され、精巣内においてもHGFはラット、ヒトのLeydig細胞に存在し、HGF受容体であるc-Metは精祖細胞、一次精母細胞、精子細胞および精子の細胞膜に存在することが報告されている。これまでの研究では精巣の細胞増殖に大きく関わっている因子としてHGFやFGF9が注目されている。またin-vitroの研究でSertoli細胞の管腔形成能にもHGFは重要な役割を果たしていることが証明されている。そこでin-vivoの研究でHGFの精子形成に及ぼす影響を調べることは意義あるものと考ええる。

本研究ではラット停留精巣化による造精機能障害モデルを用いて精巣局所のHGFを強発現させ、精子形成に対するHGFの影響について検討した。

2. 方法

- I. 実験動物 本研究では8週齢Sprague-Dawleyラットを用いた。すべての動物実験はNational Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsの指針に沿って行った。
- II. 組換えアデノウイルス作製 E1領域欠失アデノウイルスベクターにCAGプロモーター下、ラットHGFおよびLacZ遺伝子をCOS-TPC法により組み込み、組換えアデノウイルスを作製、293細胞で増殖させ高力価ウイルス液を得た。
- III. 造精機能障害モデル ラット片側停留精巣作成後14日間、造精機能を障害した精巣間質に組換えアデノウイルスベクター、pAxCaHGF (1×10^9 pfu)、pAxCALacZ (1×10^9 pfu) およびphosphate-buffered saline (PBS)を注入した。さらに注入と同時に精巣固定術を行い、造精機能回復過程の14日と28

日目に精子形成、精巣重量を評価した。実験の概略を以下に示す。



- IV. 精子形成の評価 精子形成は少なくとも150精細管以上で評価しLeblond and Clermont の分類を用いて spermatogonia, spermatocytes, round spermatids (steps 1-8), elongating spermatids (steps 9-14), elongated spermatids (steps 15-19)をcountした。またelongated spermatids (steps 15-19)細胞数をSertoli細胞数で除した比、elongated spermatid / Sertoli cell (E-S) ratioを用いて精子形成を比較検討した。
- V. X-gal染色、免疫組織染色 組換えアデノウイルス感染4日目にX-gal染色(pAxCALacZ群)および免疫組織染色(pAxCaHGF群)で遺伝子導入を確認した。
- VI. RT-PCR 組換えアデノウイルス感染4日、14日、28日目にHGF mRNA発現を確認した。
- VII. Western blot 組換えアデノウイルス感染4日にHGF発現を確認、さらにERK, Aktのリン酸化を確認した。
- VIII. TUNEL 精巣固定および遺伝子導入後14日と28日目にTUNEL法により一精細管あたりのアポトーシス細胞数を評価した。
- IX. 統計解析 統計学的処理はStudent's *t* testを用い、 $p < 0.05$ を以て有意と判定した。

3. 結果

- I. 精巣でのHGFおよびc-Metの発現 pAxCALacZ精巣間質注入4日目のX-gal染色で、peritubular cellsとLeydig cellsの精巣間質に遺伝子導入を確認し、CAGプロモーター下の組換えアデノウイルスによる精巣への効果的な遺伝子導入が確認された。同様にpAxCaHGF精巣間質注入によってperitubular cellsとLeydig cellsの精巣間質にHGFの強発現を免疫組織染色で認めた(Figure 1A)。HGF受容体のc-Metはperitubular cellsとspermatogonia, primary spermatocytes, spermatids, spermatozoaのgerm cellsに発現を認めた(Figure 1B)。RT-PCRによる解析でHGF(76 bp)mRNAは、pAxCaHGF注入後4日目に最も強く発現し、14日目にかけて徐々に減じた(Figure 2)。PBS

control 群ではほとんど HGF mRNA 発現を認めなかった。c-Met (312 bp) mRNA 発現は pAxCAHGF 群と PBS control 群で差を認めなかった。HGF 蛋白 (69 kD) についても western blot により pAxCAHGF 群で強発現していることを確認した。c-Met 蛋白 (145 kD) も pAxCAHGF 群と PBS control 群で差を認めなかった。また HGF と c-Met 発現は pAxCALacZ 群と PBS control 群で差を認めなかった。さらに片側精巣への pAxCAHGF による遺伝子導入は対側精巣への HGF 発現に影響せず、アデノウイルスによる遺伝子導入は精巣局所で HGF を強発現させた。

Ⅱ. HGF の精子形成と精巣重量に対する効果 停留精巣作成 14 日後の精巣固定による PBS control 群の精子形成回復に比べて、pAxCAHGF 群は精巣固定および遺伝子導入後 14 日目に round spermatids 細胞数を除いて差を認めなかったが、28 日目には spermatocytes (12.3 ± 1.4 vs. 11.0 ± 1.4 , $p < 0.005$), round spermatids (14.7 ± 0.9 vs. 12.6 ± 2.2 , $p < 0.0001$), elongating spermatids (4.0 ± 1.1 vs. 3.2 ± 1.2 , $p < 0.05$), elongated spermatids (1.0 ± 0.7 vs. 0.6 ± 0.4 , $p < 0.05$) の各細胞数で増加を認めた (Figure 3A)。E/S 比においても pAxCAHGF 群で改善を認めた (0.096 vs. 0.050 , $p < 0.005$; Figure 3B and Table 1)。同様に精巣重量についても遺伝子導入後 28 日目に pAxCAHGF 群 (0.92 ± 0.16 g) は PBS control 群 (0.69 ± 0.08 g), pAxCALacZ 群 (0.70 ± 0.13 g) と比べ増加を認めた ($p < 0.05$ and $p < 0.05$, respectively, Figure 4 and Table 1)。また精子形成と精巣重量は pAxCALacZ 群と PBS control 群で差を認めなかった。このようにラット造精機能障害モデルにおいて HGF 強発現により精子形成と精巣重量の回復が促進されることが確認された。

Ⅲ. ERK および Akt のリン酸化 精巣における HGF/c-Met シグナルを調べるため ERK および Akt のリン酸化を western blot により確認した。遺伝子導入後 4 日目の pAxCAHGF 群では PBS control 群に比べて phosphorylated ERK と phosphorylated Akt 蛋白の増加を認め (Figure 5)、これらの protein kinases に関連した HGF/c-Met interactions は造精機能障害モデル精巣の精子形成回復に重要な役割を果たしたと考えられた。

Ⅳ. HGF による抗アポトーシス効果 最後に HGF による抗アポトーシス効果を TUNEL 法により検討した。停留精巣作成によりアポトーシス細胞は増加し精巣固定により減少した。精巣固定および遺伝子導入後 14 日、28 日目ともに PBS control 群に比べ、pAxCAHGF 群でアポトーシス細胞の減少を認めた (Figure 6A)。一精細管あたりのアポトーシス細胞数を apoptosis index (AI) として定量化し、比較検討した (Figure 6B)。このことから停留精巣による胚細胞数の減少にアポトーシスが関与し、HGF の抗アポトーシス効果によ

り精子形成の回復が促進されたと考えられた。

4. 考察

これまでの精巣における HGF に関する国内外の研究の端は 1991 年 Wolf らがラットおよびヒト精巣の Leydig 細胞に HGF が発現することを発見したことに始まる。HGF のレセプターである c-Met は 1996 年 Depuydt らによりヒト精祖細胞、精母細胞、精子細胞および精子に発現していることが明らかにされた。1994 年 Naz らがマウス精巣上体に発現する HGF は精子運動能の獲得に必要である可能性を示唆している。1999 年 Ricci らは胎生期マウス胚での精巣の分化、精細管形成を HGF が促進する可能性を示し、また同年 van der Wee らはマウス Sertoli 細胞の管腔形成に HGF が関わる可能性を示している。Catizone らは 1999 年 prepubertal ラット精巣内で HGF、c-Met が精細管上皮筋様細胞に発現し、autocrine 作用により細胞分散に関与していることを示している。2001 年には postpubertal ラット精巣で HGF は Sertoli 細胞の管腔形成をおこすことをしめした。さらに同グループにより 2002 年ラット精巣上体での精子の運動能獲得に HGF が必要であることがわかっている。上記のことはいずれも in-vitro の研究であり、これまでに in-vivo の研究は行われていない。本研究において精巣間質の HGF を強発現させることによる造精機能障害モデルでの精子形成の変化を調べたことは HGF の精子形成との関連と機序を調べることを可能とする点で意義があり、将来的には HGF の治療効果を期待しうるものと考ええる。

5. 結論

ラット造精機能障害モデルにおいて HGF 遺伝子導入による精子形成および精巣重量の回復を認め、精巣における HGF の重要性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1614 号	氏 名	合田 上政
論文題目	ADENOVIRAL-MEDIATED HGF EXPRESSION INHIBITS GERM CELL APOPTOSIS IN RATS WITH CRYPTORCHIDISM ラット停留精巣モデルにおける hepatocyte growth factor 遺伝子導入の造精機能に対する効果について		
審査委員	主 査 千原和夫 副 査 黒田嘉和 副 査 横 崎 宏		
審査終了日	平成 16 年 7 月 2 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は肝細胞の DNA 合成を最も強力に促進する蛋白として 1984 年 Nakamura らによって発見されたが、肝細胞の他の細胞にも多様な生物活性を示すことが報告されてきた。1991 年 Wolf らがラットおよびヒト精巣の Leydig 細胞に HGF が発現することを見出し、HGF 受容体である c-Met はヒト精祖細胞、精母細胞、精子細胞および精子に発現していることを 1996 年 Depuydt らが報告した。マウス精巣上体に発現する HGF は精子運動能の獲得に必要であること (1994 年 Naz ら)、胎生期マウス胚で精巣の分化、精細管形成を HGF が促進すること (1999 年 Ricci ら)、またマウス Sertoli 細胞の管腔形成に HGF が関わる可能性 (1999 年 van der Wee ら) も報告されている。さらに思春期前のラット精巣内で HGF、c-Met が精細管上皮様細胞の細胞分散に関与し (1999 年 Catizone ら)、また HGF が Sertoli 細胞の管腔形成をおこすことを示した (2001 年)。しかし、これらの報告はいずれも in-vitro の研究であり、これまでに in-vivo の研究は行われていない。そこで我々は HGF の精子形成に及ぼす影響を検討するため、ラット停留精巣化による造精機能障害モデルを用いて精巣局所の HGF を強発現させ、精子形成に対する HGF の影響について検討した。実験動物として、8 週齢 Sprague-Dawley ラットを用いた。すべての動物実験は National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals の指針に沿って行った。まず、E1 領域欠失アデノウイルスベクターに CAG プロモーター下、ラット HGF および LacZ 遺伝子を COS-TPC 法により組み込み、組換えアデノウイルスを作製、293 細胞で増殖させ高力価ウイルス液を得た。次に、ラット片側停留精巣作成後 14 日間経た造精機能障害モデルラットの精巣間質に組換えアデノウイルスベクター、pAxCAGHGF (1×10^9 pfu)、pAxCALacZ (1×10^9 pfu) あるいは phosphate-buffered saline (PBS) を注入した。同時に精巣固定術を行い、造精機能回復過程の 14 日と 28 日目に精子形成、精巣重量を評価した。精子形成は 150 精細管以上で評価し Leblond and Clermont の分類を用いて spermatogonia, spermatocytes, round spermatids (steps 1-8), elongating spermatids (steps 9-14), elongated spermatids (steps 15-19) を count した。また elongated spermatids (steps 15-19) 細胞数を Sertoli 細胞数で除した比、elongated spermatid / Sertoli cell (E-S) ratio を用いて精子形成を比較検討した。遺伝子導入の確認は、組換えアデノウイルス感染 4 日目に X-gal 染色 (pAxCALacZ 群) および免疫組織染色 (pAxCAGHGF 群) で行った。また、組換えアデノウイルス感染 4 日、14 日、28 日目に HGF mRNA 発現を RT-PCR で確認した。さ

<p>らに、組換えアデノウイルス感染4日に Western blot 法で HGF 発現を確認、加えて ERK、Akt のリン酸化を確認した。精巣固定および遺伝子導入後14日と28日目に TUNEL 法により一精細管あたりのアポトーシス細胞数を評価した。pAxCaHGF の精巣間質注入によって peritubular cells と Leydig cells の精巣間質に HGF が強く発現していることを免疫組織染色で確認した。HGF 受容体の c-Met は peritubular cells と spermatogonia、primary spermatocytes、spermatids の germ cells に発現していた。RT-PCR による解析で HGF mRNA 発現は、pAxCaHGF 注入後4日目に最も強く、14日目にかけて徐々に減弱した。HGF の精子形成と精巣重量に対する効果を調べたところ、PBS control 群の精子形成回復に比べて、pAxCaHGF 群では、精巣固定および遺伝子導入後14日目に round spermatids 細胞数の増加、28日目には spermatocytes、round spermatids、elongating spermatids、elongated spermatids の各細胞数で増加を認めた。E/S 比においても pAxCaHGF 群で改善を認めた。また、精巣重量も遺伝子導入後28日目に pAxCaHGF 群で増加を認めた。これらの成績より、ラット造精機能障害モデルにおいて、HGF 強発現は精子形成と精巣重量の回復を促進されることが明らかとなった。C-met の下流に位置する ERK および Akt のリン酸化を調べたところ、pAxCaHGF 群では PBS control 群に比べて phosphorylated ERK と phosphorylated Akt 蛋白の増加を認めたことより、これらの protein kinases が HGF/c-Met interactions の結果として重要な役割を果たしたと考えられた。一方、停留精巣作成によりアポトーシス細胞は増加し精巣固定により減少した。しかし、精巣固定および遺伝子導入後14日、28日目ともに PBS control 群に比べ、pAxCaHGF 群ではアポトーシス細胞の減少を認めたことより、停留精巣による胚細胞数の減少にアポトーシスが関与し、HGF の抗アポトーシス効果により精子形成の回復が促進されたと考えられた。</p>
<p>以上、本研究は、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) の精子形成における役割について、造精機能障害ラットモデルの精巣間質にアデノウイルスベクターを用いて HGF を強制発現させ、精子形成に及ぼす影響を研究したものであるが、従来知られていなかった in vivo における HGF の精子形成促進作用を見出し、HGF と精子形成との関連およびその機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。</p>