



Seminal level of clusterin in infertile men as a significant biomarker reflecting spermatogenesis

Fukuda, Teruo

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6701号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006701>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Seminal level of clusterin in infertile men as a significant biomarker reflecting spermatogenesis

不妊男性における精子形成を反映する有意な
バイオマーカーとしての精漿クラスτεリンレベル

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腎泌尿器科学
(指導教員： 藤澤 正人 教授)

福田 輝雄

<内容要旨>

【背景と目的】

クラスτεリンは多種の組織に発現し、多くの体液中に分泌されているタンパクである。クラスτεリンはアポトーシスの抑制、細胞周期のコントロール、DNA 修復、精子成熟を含めたさまざまな活性を有するとされている。

クラスτεリンはアポトーシスの進行している様々な正常組織、悪性組織で高発現しており、細胞死のマーカーとみなされてきた。一方、最近の研究ではそれと対立する説も示されている。つまり、クラスτεリンはタンパクの恒常性、転写網、シグナル伝達を維持するストレス反応を制御するシャペロン様の活性を通して、強力な抗アポトーシス機能を有しているというものである。

精巣において分泌型クラスτεリンはセルトリ細胞で合成される主要タンパクであり、精細管に分泌され、伸長する精子細胞膜や成熟した精子にみられる。他臓器と同様、胚細胞上のクラスτεリンからの抗アポトーシス効果が報告されている。しかし、生理的状況下での男性生殖器におけるクラスτεリンの役割についての情報は現在でも少ない。特に、クラスτεリンが正常な精子形成を助長するかどうか、という点については議論の余地が残されたままである。

以上を踏まえて、我々は不妊男性における精漿クラスτεリン濃度を測定し、その結果を精子形成との関連に注目して解析した。

【対象】

2009 年 2 月から 2014 年 10 月までに当科男性不妊外来を受診し、精液検査を行った 89 例。

【方法】

精液所見に基づいて、正常群(精子濃度 ≥ 1500 万/ml) 28 例、乏精子症群(精子濃度 < 1500 万/ml) 33 例、非閉塞性無精子症群 28 例に分類し、各種パラメーター(年齢、精巣容量、FSH、LH、Testosterone 値)、Sandwich ELISA 法により測定した精漿 clusterin 濃度について各群間で比較、検討した。

臨床所見から非閉塞性無精子症と診断した 28 例には、顕微鏡下精巣内精子採取術(MD-TESE)を行った。MD-TESE は全身麻酔下に陰嚢を切開し、精巣を露出させ、25 倍の手術用顕微鏡下に精細管の発達している部位から組織を採取した。精子を認めたら手術は終了し、認めなければ両側精巣から組織を採取した。

MD-TESE を行った 28 例において、手術時に採取した精巣組織にクラスτεリン抗体を用いて免疫染色を行った。そして、染色の強度、範囲を考慮して 4 段階(weak, medium weak, medium strong, strong) に分類した。クラスτεリンの免疫染色発現レベルと精漿クラスτε

リン濃度との相関について検討した。

さらに非閉塞性無精子症群の術前因子についてロジスティック回帰分析を行い、各因子と精子回収との相関について検討した。

2群比較の方法としてStudent's t-test、または χ^2 乗検定を用い、免疫染色と精漿クラステリン濃度の相関を調べる方法としてはスピアマンの順位相関係数を使用した。

【結果】

Sandwich ELISA 法によって測定した精漿クラステリン濃度は、正常群 47.9±20.9 ng/ml、乏精子症群 28.2±8.6 ng/ml、非閉塞性無精子症群 18.4±9.5ng/mlであり、有意に非閉塞性無精子症群<乏精子症群<正常群という関係を認めた。

MD-TESEを行った28例において、精子を回収することができたのは9例(32.1%)だった。この28例を精漿クラステリン濃度によって分類したところ、 $\geq 18\text{ng/ml}$ の群は<18ng/mlの群と比較して精漿容積は有意に高値だった。しかし、その他の項目では2群間に有意差を認めなかった。

28例の精巣組織標本をクラステリン発現レベルで分類したところ、weak 7例、medium weak 6例、medium strong 11例、strong 4例だった。クラステリン発現レベルと精漿クラステリン濃度について調べると、weak 14.3±4.8 ng/ml、medium weak 15.8±3.3 ng/ml、medium strong 18.2±6.2 ng/ml、strong 33.0±19.8 ng/mlであり、クラステリンの精漿濃度と精巣組織発現度には有意に正の相関を認めた。(p=0.026)

非閉塞性無精子症患者の精漿クラステリン濃度がMD-TESEの結果を予測することに役立つバイオマーカーとなりうるかどうか調べるために、術前に利用可能な因子を用いてロジスティック回帰分析を行った。その結果、単変量解析ではFSH低値と精漿クラステリン濃度高値が精子回収の成功を予測する有意な因子として示された。しかし、FSHは多変量解析でも精子回収と有意な相関を認めたが、精漿クラステリンは精子回収の独立した予測因子とはなりえなかった。

【考察】

クラステリンは精巣においてストレスによって誘導されるアポトーシスに対して強力な効果があると報告されているが、このタンパクの正常な生理的状況下での機能的役割はほとんどいまだに解明されていない。特に、生殖器官におけるクラステリン発現と精子形成の関連については対照的な報告がされている。この研究では、我々は不妊男性における精漿クラステリン濃度を測定し、MD-TESEの結果を含めた各種因子との関連を解析することで、ヒト精巣の精子形成におけるクラステリンの重要性を調べることにした。

我々の研究では、精漿クラステリン濃度は非閉塞性無精子症群<乏精子症群<正常群が有意に成立した。また、精漿クラステリン濃度と精子奇形率、プロタミン欠損、精子DNA断片化には負の相関があるという報告がされている。これらのことから、精漿クラステリ

ンは精子機能の維持に関連があることが示唆された。

今回の研究では、MD-TESEを行った28例において精漿クラステリン高値群と低値群に分類したところ、高値群では有意に低値群と比較して精漿容積が大きかった。さらに、胚細胞を認めないJohnsen's score ≤ 2 の症例は高値群の22%、低値群の50%であり、有意差は認めなかったが、精漿クラステリン高値群で精子成熟が進んでいる傾向を認められた。精巣生検組織において、特発性精子形成不全群はコントロール群と比較してクラステリン mRNAレベルが有意に低いという報告もされている。これらのことからクラステリンは精子形成過程において補助的役割を果たしていることが示唆された。

男性生殖器官において、クラステリンは精巣、精巣上体、精嚢で合成、分泌され、精液における主要な糖タンパク質である。本研究では非閉塞性無精子症患者において精漿クラステリン濃度と精巣組織クラステリン発現度が有意に相関するという結果を示し、精漿クラステリン濃度が精巣のクラステリン発現を直接反映するという可能性が示唆された。さらに、精子形成不全と精巣のクラステリン発現低下の関連について示した動物研究がいくつか報告されている。以上より、精漿クラステリン濃度は精子形成の評価におけるバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

これまでに精子形成不全を予測する分子的マーカーについて各種の報告があるが、いずれもMD-TESEを行う前の評価は難しいものばかりだった。本研究は症例数が少なく後ろ向き研究ではあったが、精漿クラステリン濃度がMD-TESEの術前における精子回収の予測因子となりうる可能性を示唆するものだった。

【結語】

精子濃度と精漿クラステリン濃度には、有意に正の相関が認められた。また、精漿クラステリン濃度と精巣組織クラステリン発現度には有意な相関を認めた。精漿クラステリン濃度はMD-TESEにおける精子回収に関して単変量解析では有意な相関を認めたが、独立した予測因子とはなりえなかった。以上より、精漿クラステリン濃度は精子形成状態を評価するのに有意なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2603号	氏名	福田 輝雄
論文題目 Title of Dissertation	不妊男性における精子形成を反映する有意なバイオマーカーとしての精漿クラステリンレベル Seminal level of clusterin in infertile men as a significant biomarker reflecting spermatogenesis		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	白川 利朗	
	副 査 Vice-examiner	西尾 久英	
	副 査 Vice-examiner	中村 誠	

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

(要旨は1,000字~2,000字程度)

クラステリンは多種の組織に発現し、多くの体液中に分泌されているタンパクである。クラステリンはアポトーシスの抑制、リン脂質の輸送、DNA 修復、精子成熟を含めたさまざまな活性を有するとされている。クラステリンはアポトーシスの進行している様々な正常組織、悪性組織で高発現しており、細胞死のマーカーとみなされてきた。一方、最近の研究ではそれと対立する説も示されている。つまり、クラステリンはタンパクの恒常性、転写網、シグナル伝達を維持するストレス反応を制御するシャペロン様の活性を通して、強力な抗アポトーシス機能を有しているというものである。精巣において分泌型クラステリンはセルトリ細胞で合成される主要タンパクであり、精細管に分泌され、伸長する精子細胞膜や成熟した精子にみられる。他臓器と同様、胚細胞上のクラステリンからの抗アポトーシス効果が報告されている。しかし、生理的状況下での男性生殖器におけるクラステリンの役割についての情報は現在でも少ない。特に、クラステリンが正常な精子形成を助長するかどうか、という点については議論の余地が残されたままである。本研究では、不妊男性における精漿クラステリン濃度を測定し、その結果を精子形成との関連に注目して解析した。

2009年2月から2014年10月までに当科男性不妊外来を受診し、精液検査を行った89例を対象に研究を実施した。

精液所見に基づいて、正常群(精子濃度 ≥ 1500 万/ml)28例、乏精子症群(精子濃度 < 1500 万/ml)33例、非閉塞性無精子症群28例に分類し、各種パラメーター(年齢、精巣容量、FSH、LH、Testosterone 値)、Sandwich ELISA 法により測定した精漿 clusterin 濃度について各群間で比較、検討した。結果、Sandwich ELISA 法によって測定した精漿クラステリン濃度は、正常群 47.9 ± 20.9 ng/ml、乏精子症群 28.2 ± 8.6 ng/ml、非閉塞性無精子症群 18.4 ± 9.5 ng/ml であり、有意に非閉塞性無精子症群 $<$ 乏精子症群 $<$ 正常群という関係を認めた。

また、臨床所見から非閉塞性無精子症と診断した28例には、顕微鏡下精巣内精子採取術(MD-TESE)を行った。MD-TESEは全身麻酔下で陰嚢を切開し、精巣を露出させ、25倍の手術用顕微鏡下に精細管の発達している部位から組織を採取した。精子を認めたら手術は終了し、認めなければ両側精巣から組織を採取した。MD-TESEを行った28例において、手術時に採取した精巣組織にクラステリン抗体を用いて免疫染色を行った。そして、染色の強度、範囲を考慮して4段階(weak, medium weak, medium strong, strong)に分類した。クラステリンの免疫染色発現レベルと精漿クラステリン濃度との相関について検討した。さらに非閉塞性無精子症群の術前因子についてロジスティック回帰分析を行い、各因子と精子回収との相関について検討した。2群比較の方法として Student's t-test、または χ^2 乗検定を用い、免疫染色と精漿クラステリン濃度の相関を調べる方法としてはスピアマンの順位相関係数を使用した。以上の結果、MD-TESEを行った28例において、精子を回収することができたのは9例(32.1%)だった。この28例を精漿クラステリン濃度によって分類したところ、 ≥ 18 ng/mlの群は < 18 ng/mlの群と比較して精巣容積は有意に高値だった。しかし、その他の項目では2群間に有意差を認めなかった。28例の精巣組織標本をクラステリン発現レベルで分類したところ、weak 7例、medium weak 6例、medium strong 11例、strong 4例だった。クラステリン発現レベルと精漿クラステリン濃度について調べると、weak 14.3 ± 4.8 ng/ml、medium weak 15.8 ± 3.3 ng/ml、medium strong 18.2 ± 6.2 ng/ml、strong 33.0 ± 19.8 ng/ml であり、クラステリンの精漿濃度と精巣組織発現度には有意な相関を認めた。

非閉塞性無精子症患者の精漿クラステリン濃度が MD-TESE の結果を予測することに役立つバイオマーカーとなりうるかどうか調べるために、術前に利用可能な因子を用いてロジスティック回帰分析を行った。その結果、単変量解析では FSH 低値と精漿クラステリン濃度高値が精子回収の成功を予測する有意な因子として示された。

以上の結果より、精漿クラステリン濃度は精子形成の評価におけるバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

本研究は、精液所見上、非閉塞性無精子症と診断された症例における精子形成のバイオマーカーとしての精漿クラステリン濃度の有用性を検討した研究であるが、従来、非閉塞性無精子症における精子形成のバイオマーカーはほとんど存在せず、精漿クラステリン濃度がバイオマーカーとなりうる可能性示したことは重要な知見であり、価値ある集積と認める。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。