



Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele

田中, 浩之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-07-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2703

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002703>

※ 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。



【 177 】

氏 名 ・ (本 籍) 田 中 浩 之 (兵 庫 県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1885号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成15年7月9日

【 学位論文題目 】

Apoptosis-related proteins in the testes of
infertile men with varicocele
(精索静脈瘤患者の精巣における
アポトーシス関連蛋白の発現)

審 査 委 員

主 査 教 授 守 殿 貞 夫

教 授 丸 尾 猛

教 授 横 崎 宏

目的 正常の精子形成過程においては 25~75%の精細胞がアポトーシスによる細胞死をきたしており、このアポトーシスは精子形成における重要な調節機構のひとつとされている。近年、このアポトーシスに関連する種々の遺伝子が報告されているが Bcl-2 の発現はアポトーシスを抑制し、Bax はアポトーシスを促進する。さらには、caspase family に属する caspase-1(ICE)と caspase-3(CPP32)もアポトーシスを促進する。我々はすでに精索静脈瘤を伴った男性不妊患者の精巣では正常人の精巣に比べアポトーシスが抑制されていることを報告している。今回はそれらの精巣におけるアポトーシス関連蛋白の発現を調べ、精子形成障害との関連性について検討した。

対象と方法 男性不妊症を主訴として来院した左精索静脈瘤患者 26 症例、52 精巣を対象とした。精索静脈瘤は、鈴木らの分類を用いて 3 グループに分類した。術前に精液検査ならびに血中 FSH、LH、testosterone、estradiol を測定し、両側の精巣生検は、内精静脈高位結紮術の際に行った。すべての精巣生検は informed consent を得て行った。6 例の volunteer の精巣生検組織を正常 control とした。得られた精巣組織は、一部をブアン固定後、H.E.染色を行い Johnsen's mean score を算定し、残りの組織をホルマリン固定、パラフィン包埋し免疫組織化学的検索を行った。

パラフィン包埋ブロックより厚さ 4 μ m の切片を作成し脱パラフィン後、microwave oven あるいは pressure cooker にて加熱処理を行い抗原を賦活し、0.3% H₂O₂-メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、mouse あるいは rabbit の正常希釈血清にて非特異的反応をブロックした。免疫染色は Bcl-2、Bax、ICE、CPP32 を抗原とし ABC 法を用いてペルオキシダーゼで標識し DAB にて発色させた。また、すべての細胞の核はメチルグリーンで対比染色した。

免疫染色された細胞は 400 倍の光学顕微鏡で観察し、精細管内の Sertoli cell を除く全精細胞数と陽性に染色された細胞数の比を I_{All}(%)とし、また全精細胞数と陽性に染色された精細胞数の比を I_{Sp}(%)として算出した。

結果 正常人と精索静脈瘤患者の精細胞において Bcl-2 の発現は認めなかった。Bax は精細胞のすべての分化段階で発現し、ICE、CPP32 は主に精細胞で発現していた。

正常人の精巣と精索静脈瘤患者の左および右の精巣で Bax の I_{All} はそれぞれ 15.5 \pm 4.3%、13.8 \pm 7.1%および 12.9 \pm 5.6%であった。ICE の I_{All} はそれぞれ 27.4 \pm 5.1%、20.2 \pm 8.2%および 18.7 \pm 11%であった。CPP32 の I_{All} はそれぞれ 34.9 \pm 6.1%、25.2 \pm 7.1%および 24.8 \pm 5.8%であった。ICE の I_{All} と CPP32 の I_{All} とが有意な正の相関を示した(P=0.0116)。

正常人の精巣と精索静脈瘤患者の左および右の精巣で ICE の I_{Sp} はそれぞれ 40.3 \pm 6.7%、23.9 \pm 10.9%および 23.0 \pm 14.6%であった。CPP32 の I_{Sp} はそれぞれ 64.2 \pm 9.4%、43.0 \pm 12.2%および 45.4 \pm 10.8%であった。ICE の I_{Sp} と CPP32 の I_{Sp} とが有意な正の相関を示した(P=0.0058)。

Index と精索静脈瘤の分類との関係では CPP32 の I_{All} と I_{Sp} が grade II あるいは III に比べ grade I が有意に高かった。血清ホルモン値との関係では、血清 LH 値と CPP32 の I_{All} のみが正の相関を示した。

考察 今回の結果は ICE と CPP32 がヒトの精巣に発現し、特に精細胞のような基底膜近傍の精細胞で強く発現した。精索静脈瘤患者の精巣の全精細胞における CPP32 の発現は正常人に比べ有意に低く(P<0.001)、また精索静脈瘤患者の精巣の精細胞における ICE と CPP32 の発現は正常人に比べ有意に低い(P=0.0012、P<0.001)。また、精索静脈瘤患者の精巣では ICE、CPP32 の発現に左右差はなく、ICE の発現は CPP32 の発現と正の相関を示した。

これらの結果は、精索静脈瘤を伴った男性不妊患者の精巣におけるアポトーシスの調節に ICE と CPP32 が関連していることを示し、特に全精細胞における発現で有意差を認めた CPP32 が精細胞のアポトーシスの調節で重要な役割を担っていると考えられた。つまり、精索静脈瘤を伴った男性不妊患者の精巣においては、なんらかの影響により CPP32 の発現が減少することによってアポトーシスが抑制されているのではないかと考えられた。

今回の研究では Bcl-2 はヒトの精細胞では発現せず、Bax は低いレベルで発現したが精索静脈瘤患者と正常人では発現の有意差を認めなかった。したがって、Bcl-2 と Bax を含むミトコンドリア経路のアポトーシスの調節と精子形成障害との明らかな関係は認められなかった。

最近のいくつかの報告では精子形成におけるアポトーシスは性ホルモンにより調節されているとしている。今回の研究では精細胞のアポトーシス関連蛋白の発現と血清ホルモン値との関係で、CPP32 の発現と血清 LH 値のみが正の相

関を示しており、LH が CPP32 の発現と関連している可能性が示唆された。この関連が、直接的なものかあるいは間接的なものかについては今後の検討が必要と考えられる。

結語 精索静脈瘤を伴った男性不妊患者の精巣でのアポトーシスの調節において CPP32 の発現の減少が重要な役割を担っている可能性が示唆され、CPP32 の発現は LH と関係していると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1888 号	氏 名	田 中 浩 之
論文題目	Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele 精索静脈瘤患者の精巣における アポトーシス関連蛋白の発現		
審査委員	主 査 宇 殿 貞 夫 副 査 丸 尾 強 副 査 横 崎 宏		
審査終了日	平成 15 年 6 月 23 日		

（要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度）

目的 正常の精子形成過程において 25～75%の精細胞がアポトーシスによる細胞死をきたしており、このアポトーシスは精子形成における重要な調節機構のひとつとされている。近年、このアポトーシスに関連する種々の遺伝子が報告されている。我々はすでに精索静脈瘤を伴った男性不妊患者の精巣では正常人の精巣に比べアポトーシスが抑制されていることを報告している。今回はそれらの精巣におけるアポトーシス関連蛋白の発現を調べ、精子形成障害との関連性について検討した。

対象と方法 男性不妊症を主訴として来院した左精索静脈瘤患者 26 症例、52 精巣を対象とした。両側の精巣生検は内精静脈高位結紮術の際に行った。6 例の volunteer の精巣生検組織を正常 control とした。得られた精巣組織は、一部をブアン固定後、H.E.染色を行い Johnsen's mean score を算定し、残りの組織をホルマリン固定、パラフィン包埋し免疫組織化学的検索を行った。

パラフィン包埋ブロックより切片を作成し脱パラフィン後、加熱処理を行い抗原を賦活した。免疫染色は Bcl-2、Bax、ICE、CPP32 を抗原とし ABC 法を用いて標識し DAB にて発色させた。また、すべての細胞の核はメチルグリーンで対比染色した。

免疫染色された細胞は光学顕微鏡で観察し、精細管内の全精細胞数と陽性に染色された細胞数の比を $I_{All}(\%)$ とし、また全精祖細胞数と陽性に染色された精祖細胞数の比を $I_{Sp}(\%)$ として算出した。

結果 正常人と精索静脈瘤患者の精細胞において Bcl-2 の発現は認めなかった。Bax は精細胞のすべての分化段階で発現し、ICE、CPP32 は主に精祖細胞で発現していた。

正常人の精巣と精索静脈瘤患者の左および右の精巣で Bax の I_{All} はそれぞれ $15.5 \pm 4.3\%$ 、 $13.8 \pm 7.1\%$ および $12.9 \pm 5.6\%$ 、ICE の I_{All} はそれぞれ $27.4 \pm 5.1\%$ 、 $20.2 \pm 8.2\%$ および $18.7 \pm 11\%$ 、CPP32 の I_{All} はそれぞれ $34.9 \pm 6.1\%$ 、 $25.2 \pm 7.1\%$ および $24.8 \pm 5.8\%$ であった。ICE と CPP32 の I_{All} が有意な正の相関を示した。

正常人の精巣と精索静脈瘤患者の左および右の精巣で ICE の I_{Sp} はそれぞれ $40.3 \pm 6.7\%$ 、 $23.9 \pm 10.9\%$ および $23.0 \pm 14.6\%$ 、CPP32 の I_{Sp} はそれぞれ $64.2 \pm 9.4\%$ 、 $43.0 \pm 12.2\%$ および $45.4 \pm 10.8\%$ であった。ICE と CPP32 の I_{Sp} が

有意な正の相関を示した。

Index と血清ホルモン値との関係では、血清 LH 値と CPP32 の I_{All} のみが正の相関を示した。

考察 今回の結果は ICE と CPP32 がヒトの精巣に発現し、特に精祖細胞のような基底膜近傍の精細胞で強く発現した。精索静脈瘤患者の精巣の全精細胞における CPP32 の発現は正常人に比べ有意に低く、また精索静脈瘤患者の精巣の精祖細胞における ICE と CPP32 の発現は正常人に比べ有意に低い。また、精索静脈瘤患者の左右精巣では ICE、CPP32 の発現に差はなく、ICE の発現は CPP32 の発現と正の相関を示した。

これらの結果は、精索静脈瘤を伴った男性不妊患者の精巣にけるアポトーシスの調節に ICE と CPP32 が関連していることを示し、特に全精細胞における発現で有意差を認めた CPP32 が精細胞のアポトーシスの調節で重要な役割を担っていると考えられた。つまり、精索静脈瘤を伴った男性不妊患者の精巣においては、なんらかの影響により CPP32 の発現が減少することによってアポトーシスが抑制されているのではないかと考えられた。

最近の報告では精子形成におけるアポトーシスは性ホルモンにより調節されているとしている。今回の研究では精細胞のアポトーシス関連蛋白の発現と血清ホルモン値との関係で、CPP32 の発現と血清 LH 値のみが正の相関を示しており、LH が CPP32 の発現と関連している可能性が示唆された。

本研究は精索静脈瘤患者の精巣について、そのアポトーシス関連蛋白の発現を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった精細胞における Bcl-2、Bax、ICE、CPP32 の発現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。