

氏 名	おお 久 保 かず とし 大 久 保 和 俊
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2895 号
学位授与の日付	平 成 17 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Over expression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism (トランスジェニックマウスにおけるチオレドキシン1の過剰発現は手術的停留精巣化による精子形成細胞のアポトーシスを軽減する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司    教 授 藤 井 信 吾    教 授 三 嶋 理 晃

### 論 文 内 容 の 要 旨

【背景】停留精巣は新生児の100人に1人に認められ、男性不妊症の原因のひとつである。実験動物においても手術的に停留精巣化を作成すると精子形成が障害されることが知られており、古くから男性不妊症研究の実験モデルとして用いられている。同法は、精巣を腹腔内という、陰囊よりも若干高い温度環境にさらすことで精子形成細胞にアポトーシスを引き起こし精子形成障害に至らしめる。この分子機構は完全には明らかでないが、温度ストレスや酸化ストレスの関与が知られている。Thioredoxin-1 (TRX1) は原核生物からヒトまで保存されている 12kDa の蛋白で、-Cys-Xxx-Yyy-Cys-という活性部位を有している。この2つのシステイン残基の間でのジチオール/ジスルフィド交換反応によって酸化還元活性を示す。TRX1 は生体内の酸化還元状態の維持に携わり、酸化ストレスに対する生体防御機構のなかで重要な役割を担っている。ヒト TRX1 (hTRX1) を全身に過剰発現させた TRX1 トランスジェニック (TRX1-Tg) マウスでは、脳、肝、腎、心、網膜などの臓器において、酸化ストレスによる組織障害に対し TRX1 が保護的に働くことが知られている。精子特異的な TRX ファミリー分子も近時報告されているので、全組織に発現する TRX1 の精子機能へ果たす役割の検討は興味もたれる。

【目的】TRX1 が停留精巣化による精子形成障害を軽減するかを明らかにするために、TRX1-Tg マウスに手術的停留精巣化をほどこし精子形成障害を評価検討した。

【方法】Tg マウスと wild type (WT) マウス精巣での hTRX1 およびマウス TRX1 (mTRX1) の発現状況を免疫染色とウェスタンブロッティングで確認した。次に10週齢の Tg および WT マウスに手術的に片側停留精巣化をほどこした。対側の精巣は同一個体のコントロールとして用いた。術後4, 7, 10, 14, 28日目に両側精巣を摘出し重量を測定、左右の精巣重量比(停留精巣側/陰囊側)を算出した。さらに組織学的検討として HE 染色とアポトーシスの指標として TUNEL 染色を行い、精子形成障害の指標とされている Multinucleated giant cell (MGC) の精細管あたりの数と、精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数を計測した。

【結果】①mTRX1 は WT, Tg とともに精巣で同程度の発現が認められ、hTRX1は Tg の精巣でのみ強く発現していた。hTRX1 の強制発現操作は内因性 mTRX1 の発現レベルに影響していないと考えられた。②術後7, 10, 14日目での精巣重量比の平均値は WT で0.64, 0.43, 0.32に対し Tg では0.79, 0.62, 0.42で、Tg で有意に高かった。組織学的検討でも、WT にくらべ Tg において精子形成障害が軽減しており、Tg の10日目と WT の7日目が、Tg の14日目と WT の10日目がほぼ同程度の障害を示していた。同様に、MGC 数の計測でも確認できた。また術後4, 7日目における TUNEL 陽性細胞数は Tg では WT に比べ有意に少なかった。しかし、28日目には Tg, WT とともに精子形成はほぼ消失していた。

【考察】TRX1 の過剰発現は停留精巣化に伴う精子形成障害を軽減したが、その機序のひとつとしてアポトーシスの抑制が考えられた。元来、停留精巣化モデルは精巣温度を上昇させる男性不妊症の病態(精索静脈瘤、発熱、停留精巣など)のモデルとされており、本研究結果は、TRX1 の誘導や投与が男性不妊症治療への応用につながるものと期待された。

## 論文審査の結果の要旨

男性不妊症の疾患モデルのひとつである停留精巣モデルでは精子形成細胞のアポトーシスから精子形成障害に至る。この分子機構は完全には明らかでないが、温度ストレスや酸化ストレスの関与が知られている。

Thioredoxin-1 (TRX1) は生体内の酸化還元状態の維持に携わる蛋白で、酸化ストレスに対する生体防御機構のなかで重要な役割を担っている。TRX1 が停留精巣化による精子形成障害を軽減するかを明らかにするために、TRX1 トランスジェニック(Tg)マウスに手術的に停留精巣化をほどこし精子形成障害を評価検討した。

成熟マウスに手術的片側停留精巣化をほどこし、Tg と wild type (WT) とを術後4-28日目の6点で比較した。精巣の機能障害の指標となる停留精巣側/陰囊側の精巣重量比では7, 10, 14日目において WT に対し Tg で有意に高かった。HE 染色による組織学的検討では、WT に比し Tg において精子形成障害が軽減していた。さらに TUNEL 染色では、術後4, 7日目の TUNEL 陽性細胞数は WT に比べ Tg で有意に少なかった。

TRX1 の過剰発現は停留精巣化に伴う精子形成障害を軽減したが、その機序のひとつにアポトーシスの抑制が考えられた。元来、停留精巣化モデルは精巣温度を上昇させる男性不妊症の病態モデルとされており、本研究結果は、TRX1 の誘導や投与が男性不妊症治療への応用につながるものと期待された。

以上の研究は男性不妊症の病態解明と治療法の開発に貢献し、今後の生殖医療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年3月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。