

造精機能獲得のための未来の治療

小島 祥敬, 林 祐太郎, 水野健太郎, 黒川 覚史
中根 明宏, 丸山 哲史, 佐々木昌一, 郡 健二郎
名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野

FUTURE TREATMENT STRATEGIES FOR CRYPTORCHIDISM
TO IMPROVE SPERMATOGENESIS

Yoshiyuki KOJIMA, Yutaro HAYASHI, Kentaro MIZUNO, Satoshi KUROKAWA,
Akihiro NAKANE, Tetsuji MARUYAMA, Shoichi SASAKI and Kenjiro KOHRI

The Department of Nephro-urology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

Orchiopexy is one of the most frequently used surgical procedures for cryptorchidism and has been shown to have a beneficial effect on fertility. However, orchiopexy, especially for bilateral cryptorchidism, does not always guarantee subsequent fertility and paternity. Compared with a control group, paternity was significantly compromised in men with previous bilateral, but not unilateral cryptorchidism. Recent techniques of assisted reproductive technology, especially testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection (TESE-ICSI), have brought revolutionary changes in clinical therapy for infertility. If spermatozoa exists in testis of infertile men, logically there is a possibility of paternity. However, our study demonstrated that about 20% of pubertal boys who had had orchiopexy, were predicted to have lost their future paternity potential even if TESE-ICSI were conducted, because they were predicted to have no spermatozoa in the testis. To prevent or reverse the damage of spermatogenesis at prepuberty or puberty, we should not take a wait-and-see attitude but should consider a countermeasure for the pubertal boys who had had bilateral orchiopexy in childhood, especially when the serum follicle stimulating hormone level is elevated and testicular volume is lowered, before paternity is lost. In this review, we discuss the potential approaches including epidermal growth factor therapy, gene therapy and stem-cell therapy for cryptorchid patients in the future.

(Hinyokika Kiyo 53 : 517-522, 2007)

Key words : Cryptorchidism, Male infertility, Spermatogenesis, Fertility, Paternity

緒 言

近年補助生殖技術, 特に卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の臨床応用により生殖医療に革命的变化がもたらされた。今日では特発性男子不妊症のみならず停留精巣に合併した男子不妊症症例にも不妊治療の適応となり, 一定の成績をおさめている。しかし ICSI に対する種々の問題点も十分には議論されていないのも事実である。また, 一般的には, 正常な性行為による自然妊娠が望ましいと考えられる。

停留精巣は治療を受けた症例でもその妊娠性は片側例で60~70%, 両側例で20~30%とされ, 不妊症は停留精巣の重大な合併症の1つである。つまり精巣固定術には限界があり, 今後精巣固定術に加えた新しい治療法が望まれる。本稿では, われわれがこれまでに実験動物を用いて行ってきた停留精巣の造精機能獲得に向けた基礎的研究成果を紹介し, 未来の治療の可能性について概説した。

停留精巣に対する精巣固定術
術後の妊娠性と父性獲得

1990年代前半に開発された顕微授精である卵子細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) により補助生殖医療に革命的变化がもたらされた。精巣内 (もしくは精巣上体) より精子を採取 (testicular sperm extraction; TESE もしくは micro-surgical epididymal sperm aspiration; MESA) し ICSI を行えば, 理論的には精巣内に精子が1つでも存在すれば, 挙児を得る可能性が存在する。今日では TESE-ICSI は無精子症に対する最も一般的な治療として位置づけられている。

一方, 不妊症は悪性腫瘍と並んで, 停留精巣の重大な合併症の1つである。小児期に精巣固定術を行うことにより, 将来の造精機能や妊娠性が改善する確率が上昇する。逆に精巣固定術をしたからといって必ずしも将来の造精機能や妊娠性が改善するとは限らない。Lee らは精巣固定術を受けた患児のうち片側例で89.7

%, 両側例で65.3%妊孕性を有していたと報告している¹⁾.

われわれは特発性男子不妊症の血清 FSH 値と平均

精巣容量により精巣内精子の陽性率を検討し, これをもとにして, 両側停留精巣に対して固定術を受け思春期に至った患者の精巣内精子陽性率について算定し

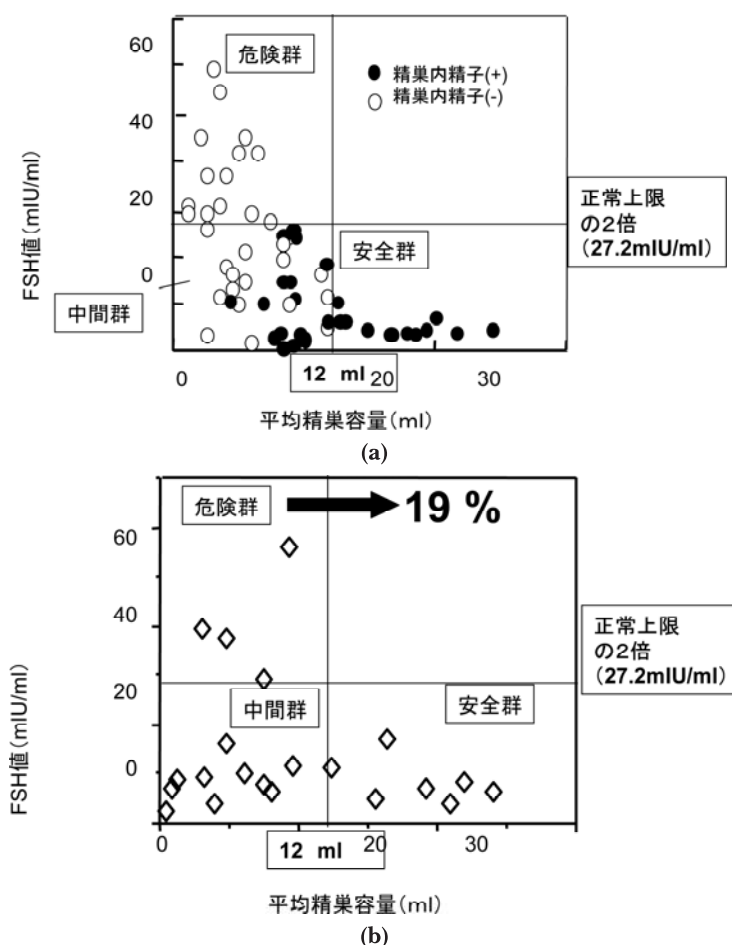


Fig. 1. (a) Correlation between serum FSH/average testicular volume and presence of spermatozoa in the testis in idiopathic infertile men. (b) Correlation between serum FSH level and testicular volume in the pubertal boys who had bilateral orchiopexy in their childhood.

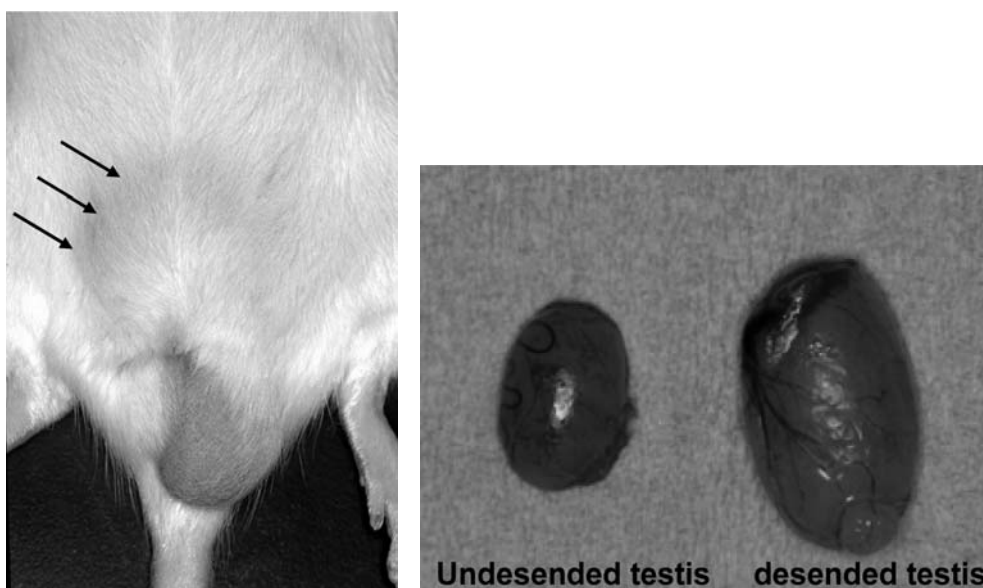


Fig. 2. Flutamide-induced cryptorchid rat.

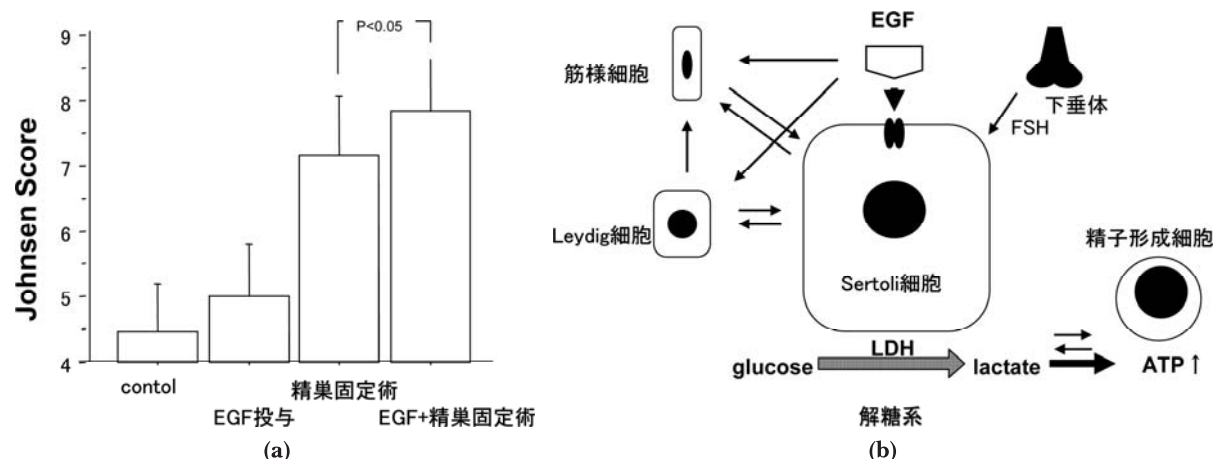


Fig. 3. (a) Improvement of spermatogenesis by EGF injection to seminiferous tubules of cryptorchid rat. (b) Role of EGF in spermatogenesis (hypothesis).

た²⁾. 58人の特発性無精子症患者のうち27人 (47%) に精巣内精子を認めた. これら58人の血清 FSH 値と平均精巣容量を測定し精巣内精子の有無との関係について検討した (Fig. 1a). FSH 値の正常値の2倍値 (27.2 mIU/ml) 以上かつ平均精巣容量 12 ml 以下の場合, 精巣内精子の存在する患者の確率 (精巣内精子陽性率) は 0%であった. そこでこの2項目を基準として, これら58人の患者を, Fig. 1b に示すように, 危険群 (14人, 24%), 中間群 (32人, 55%), 安全群

(12人, 21%) の3群に分類し, 精巣内精子陽性率を検討したところ, 危険群 0%, 中間群 49%, 安全群 100%であった.

次に, 当院で両側精巣固定術を行い, 思春期外来で経過観察している15歳に至った21名の患児の血清 FSH 値と平均精巣容量を測定した²⁾. 驚くべきことに, これら患児を血清 FSH 値と平均精巣容量により, 上述した危険群, 中間群, 安全群に分類したところ, 危険群 (19%), 中間群 (48%) の患児がすでに存在していることがわかった (Fig. 1b). すなわち, 精子形成が始まった15歳の時点ですでに19%の患児が精巣内に精子を持たないことを意味し, これらの患児は TESE-ICSI を含めたいかなる補助生殖医療を用いても, 挙児を得ることがまったくできないことが予測された. 中間群の半数が精巣内精子を持たないという男子不妊症患者のデータを合わせると, これら患児の 43%が精巣内精子を持たないことが予測される. つま

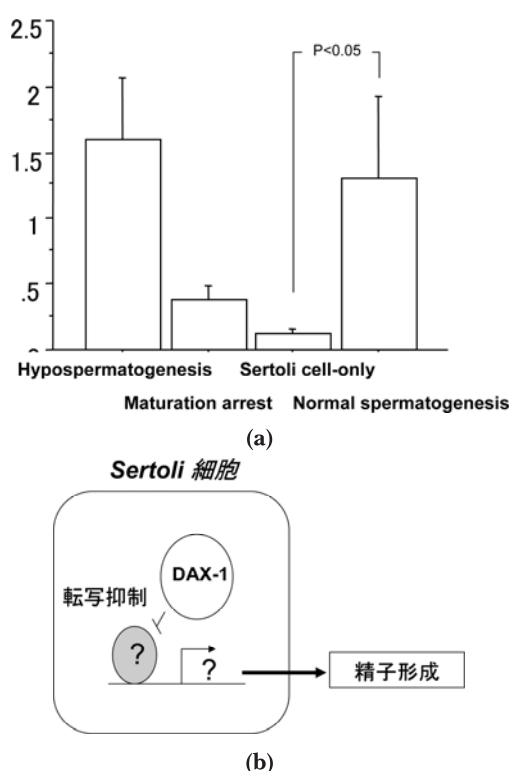


Fig. 4. (a) Correlation between pathological findings of male infertility patients and expression of DAX-1 mRNA. (b) Model for DAX-1 control of spermatogenesis in human testis.

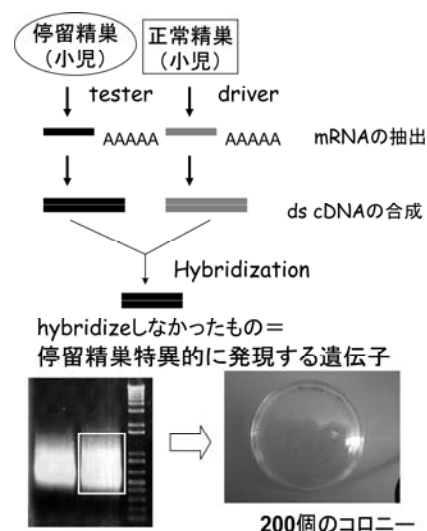


Fig. 5. Detection of genes that express in the cryptorchid testis by subtractive hybridization method.

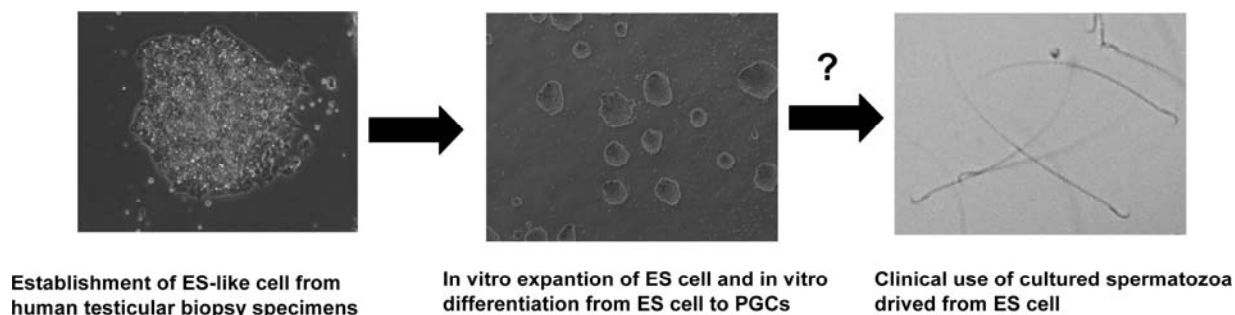


Fig. 6. Stem-cell therapy for cryptorchid patients in the future.

り TESE-ICSI を用いれば、精巣内に精子が1つ存在すれば挙児を得る可能性が残されるわけであるが、43%の患児は TESE-ICSI を用いたとしても、将来挙児を得ることができない、つまり父性獲得の可能性がないということが予測されてしまうということになる。

造精機能獲得のための未来治療

上述したように、われわれの検討では両側停留精巣に対して精巣固定術を施行したとしても、精巣内に精子を有しない患者が少なからず存在する。精巣内に精子が存在しない場合の治療法は今日では存在しない。小児期にホルモン療法 (GnRH 療法) を行い、短期における造精機能の改善が予測される報告は散見されるが、長期にわたる報告は今のところない^{3,4)}。私達も実験レベルで造精機能を回復させるさまざまな未来の治療法の開発に力を注いでおり、その一端を紹介する。

(1) EGF 精細管内導入による造精機能獲得

われわれは、妊娠雌ラット (妊娠14~20日) にアンドロゲン遮断薬であるフルタミド 7.5 mg を連日投与し、胎仔に暴露させることにより、正常の精巣下降を障害させ、停留精巣モデルラットを作成した⁵⁾ (Fig. 2)。ラットの精巣下降は生後3~4週齢で完了し、7週齢前後で精子形成が始まる。本モデルの4週齢で精巣固定術をした場合、造精機能はほぼ正常まで改善するものの、10週齢以降で精巣固定術を施行しても、造精機能の回復は不十分であることがわかった。

上皮成長因子 (epidermal growth factor) は顎下腺で分泌されるタンパクとして当初見いだされ、顎下腺摘除マウスにおいて造精機能障害を引き起こすことが知られている⁶⁾。創傷治癒を促進するのみならず、脳の神経幹細胞やグリア細胞の再生を誘導することが最近わかってきている⁷⁾。そこで、精巣固定術に追加して成長因子である EGF を精細管内に注入することにより、造精機能の回復が期待できるか否か検討した。精巣固定術のみでもある程度の造精機能の改善を認めたが、精巣固定術のみ施行した群に比べ、精巣固定術施行時に EGF を精細管に注入した群では、造精機能が

顕著に改善した (Fig. 3a)⁸⁾。おそらく、セルトリ細胞に EGF 受容体が存在することから、セルトリ細胞における解糖系を介して ATP 産生を誘導し、精子形成細胞を賦活化したことにより引き起こすと考えている (Fig. 3b)。

(2) 転写因子 DAX-1 を用いた遺伝子治療の可能性

男子不妊症に対する遺伝子治療の可能性を検討するために、マウスを用いてリポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルスベクター法を用いて、それぞれの遺伝子導入効率と安全性を検討した⁹⁻¹¹⁾。その結果、リポフェクション法、エレクトロポレーション法は、導入される細胞は非特異的で、制御できないことがわかった^{9,10)}。それに対して、アデノウイルスベクター法は、生殖細胞に遺伝子導入されることなく、体細胞のみに遺伝子導入され、最も遺伝子導入効率が優れていることがわかった。また次世代への影響もないことが証明された¹¹⁾。このことより、Sertoli 細胞を標的とした遺伝子治療に用いる上で、アデノウイルスベクターは最も有用である可能性が示唆された。

一方 DAX-1 は、胎生期の性腺形成および性分化に大きな役割を果たしている転写因子であり、視床下部—下垂体—性腺系の細胞で発現を認め、特に、精巣ではステロイド合成と精子形成にかかわっている可能性が、成人マウスを用いた解析により最近示唆されている^{12,13)}。

われわれは DAX-1 の発現をラットとヒト精巣において検討した¹⁴⁾。DAX-1 はラット、ヒトともに思春期より発現の増加を認め、その発現部位は主に Sertoli 細胞であった。特にラットにおいては、精子形成周期依存性の発現を認め、精子形成に大きく関与していることが示唆された。ヒトにおいても精子形成に強く関与しており、特に男子不妊症の中で精巣組織が maturation arrest や Sertoli-cell only の場合、Sertoli 細胞における DAX-1 の発現が著しく低下していることを見だし (Fig. 4)、今後 Sertoli 細胞を標的とした、DAX-1 を用いた精巣内遺伝子導入が新しい治療法になる可能性があると考えている。

(3) 停留精巣特異的に発現する遺伝子

停留精巣に対する精巣生検は, 上皮内癌の存在を発見することや将来の造精機能の予測を組織学的にする上で重要な検査となりうる¹⁵⁾. 以前は生検そのものが将来の造精機能の悪化につながる可能性があるとして, 精巣生検することを躊躇する意見もあったが, われわれのデータも含めて, 将来の造精機能や妊孕性に悪影響を及ぼすことはないことが証明された^{16, 17)}. つまり, 将来的には停留精巣の組織を用いて, 将来の造精機能の予測を分子生物学的手法を用いて行ったり, 遺伝子発現を調べることで, 停留精巣の責任遺伝子を同定できる可能性がある.

そこで停留精巣に特異的に高発現もしくは低発現する遺伝子を同定することは, 停留精巣の造精機能に与する遺伝子を同定できる可能性があるのではないかと考えた. われわれは停留精巣を tester, 正常精巣を driver とした subtractive hybridization 法を用いて, 停留精巣に特異的に高発現する遺伝子コロニーを200個得ることができた (Fig. 5). その中で造精機能に与する遺伝子をピックアップし, 現在機能解析を進めている.

(4) ES 細胞を用いた生殖細胞の発生・分化に関わる遺伝子の同定およびその機能解析

ES 細胞は今日組織再生や臓器再生をめざした, いわゆる再生医学分野の研究において大きな役割を果たしている.

一方で, 哺乳類の生殖細胞は, 胚発生のある時期において周囲組織からの刺激・誘導因子の影響を受けてその特性を獲得するものと考えられている. 私達は, これまでに Knock-in ES 細胞を LIF (Leukemia inhibitory factor) 非存在下に浮遊培養し, グルコース濃度を変えることにより, マウス ES 細胞からの生殖細胞系列への分化誘導を効率的に行う手法を開発した. また, in vitro における ES 細胞から生殖細胞への分化・誘導系を用いた研究から, 生殖細胞の発生・分化にかかわる遺伝子として, 現在のところ3つの候補遺伝子を得ることができた¹⁸⁾.

ES 細胞を臨床応用する場合, 他人の胚を用いることになるため倫理上の問題が生じる. ただ最近になって成体マウスの精巣から ES 細胞と同様な性質を示す幹細胞が単離することに成功したとの報告もあり¹⁹⁾, ES 細胞に代わる幹細胞の供給源になりうるかもしれない. ES 細胞から生殖細胞系列への分化誘導系を利用した生殖細胞分化機構の解明を試み, 停留精巣を含めた男子不妊症に対する将来の造精機能獲得に向けた治療の可能性に関する基礎的研究を行いたいと考えている (Fig. 6).

結 語

われわれは基礎的研究レベルで造精機能を回復させ

るさまざまな治療法の開発に力を注いでいるが, 残念ながら今すぐ臨床応用できる段階ではない. 今日のクローン技術や ES 細胞を用いた再生医学の進歩はめざましく, こうした技術がいつの日か TESE-ICSI に勝る“革命的”治療の開発につながることを期待したい.

文 献

- 1) Lee PA and Coughlin MT: Fertility after bilateral cryptorchidism. evaluation by paternity, hormone, and semen data. *Horm Res* **55**: 28-32, 2001
- 2) Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, et al.: Assessment of serum follicle-stimulating hormone level and testicular volume for prediction of paternity potential in pubertal boys who underwent bilateral orchiopexy in childhood. *J Urol* **175**: 2290-2294, 2006
- 3) Huff DS, Snyder HM 3rd, Rusnack SL, et al.: Hormonal therapy for the subfertility of cryptorchidism. *Horm Res* **55**: 38-40, 2001
- 4) Schwentner C, Oswald J, Kreczy A, et al.: Neoadjuvant gonadotropin-releasing hormone therapy before surgery may improve the fertility index in undescended testes: a prospective randomized trial. *J Urol* **173**: 974-977, 2005
- 5) Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, et al.: Influence for testicular development and histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. *Int J Urol* **14**: 67-72, 2007
- 6) Tsutsumi O, Kurachi H and Oka T: A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* **233**: 975-977, 1986
- 7) Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, et al.: Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* **17**: 5820-5829, 1997
- 8) Kurokawa S, Kojima Y, Mizuno K, et al.: Effect of epidermal growth factor on spermatogenesis in the cryptorchid rat. *J Urol* **174**: 2415-2419, 2005
- 9) Umemoto Y, Sasaki S, Kojima Y, et al.: Gene transfer to mouse testes by electroporation and its influence on spermatogenesis. *J Androl* **26**: 264-271, 2005
- 10) Kojima Y, Sasaki S and Kohri K: Therapeutic options: Current research and future prospects for gene therapy in andrology. Hargreave T, Comhaire F, Schill W-B (eds) In: *Andrology for clinician*. Springer, Heiderberg, Germany, 2006
- 11) Kojima Y, Sasaki S, Umemoto Y, et al.: Effects of adenovirus mediated gene transfer to mouse testis in vivo on spermatogenesis and next generation. *J Urol* **170**: 2109-2114, 2003
- 12) Yu RN, Ito M, Saunders TL, et al.: Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat*

- Genet **20**: 353-357, 1998
- 13) Jeffs B, Ito M, Yu RN, et al.: Sertoli cell-specific rescue of fertility, but not testicular pathology, in Dax1 (Ahch)-deficient male mice. *Endocrinology* **142**: 2481-2488, 2001
 - 14) Kojima Y, Sasaki S, Hayashi Y, et al.: Role of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 in steroidogenesis and spermatogenesis in human testicular development and idiopathic azoospermia. *Int J Urol* **13**: 783-791, 2006
 - 15) Hadziselimovic F and Herzog B: The importance of both an early orchidopexy and germ cell maturation for fertility. *Lancet* **358**: 1156-1157, 2001
 - 16) Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, et al.: Effect of testicular biopsy in childhood on spermatogenesis, fertility, and paternity in adulthood—a mouse model study. *Urology* **66**: 682-686, 2005
 - 17) Rusnack SL, Wu HY, Huff DS, et al.: Testis histopathology in boys with cryptorchidism correlates with future fertility potential. *J Urol* **169**: 659-662, 2003
 - 18) Mizuno K, Tokumasu A, Nakamura A, et al.: Genes associated with the formation of germ cells from embryonic stem cells in cultures containing different glucose concentrations. *Mol Reprod Dev* **73**: 437-445, 2006
 - 19) Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al.: Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**: 1199-1203, 2006

(Received on March 1, 2007)

(Accepted on March 15, 2007)