

令和元年5月13日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18976

研究課題名(和文) 精細管の三次元構造と精子形成能の空間的「偏り」の解明

研究課題名(英文) Three-dimensional structure and analysis of seminiferous tubules

研究代表者

仲田 浩規 (Nakata, Hiroki)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：80638304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光染色またはPAS染色を用いた半自動の三次元再構築方法を考案し、0日齢、21日齢、70日齢の精細管の三次元再構築を各3例行い、生後発達におけるマウス精細管の本数・分岐・長さ・走行・相互関係を明らかにした。また、精子形成が開始した場所と精子形成の波を三次元で明らかにし、精子形成に関わる空間的な偏りを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス精巣の形態の詳細を明らかにすることは精巣研究の基盤となり、多くのデータを定量的に扱うことを可能にする。本研究により、生後発達における精細管の本数、長さも含めその三次元構造が定量的に明らかとなった。また、精子形成が開始した場所と精子形成の波の詳細を三次元で明らかにすることができた。今後は、正常および病的なヒト精巣の三次元構造の詳細も明らかにし、診断・治療を見据えた正確な定量解析を可能にしていきたい。

研究成果の概要(英文)：We developed a technique to analyze the high-resolution three-dimensional (3D) structure of seminiferous tubules. It consists of the segmentation of tubules in serial paraffin sections of the testis by marking the basement membrane with periodic acid-Schiff or a fluorescent anti-laminin antibody followed by the 3D reconstruction of tubules with high-performance software. Using this method, we analyzed testes from mice at different ages and accurately elucidated the 3D structure of seminiferous tubules, including the number and length of tubules as well as the numbers of connections with the rete testis, branching points, and blind ends. We also analyzed the distribution and direction of spermatogenic waves along the length of adult seminiferous tubules as well as the site of the first onset of spermatogenesis in postnatal seminiferous tubules.

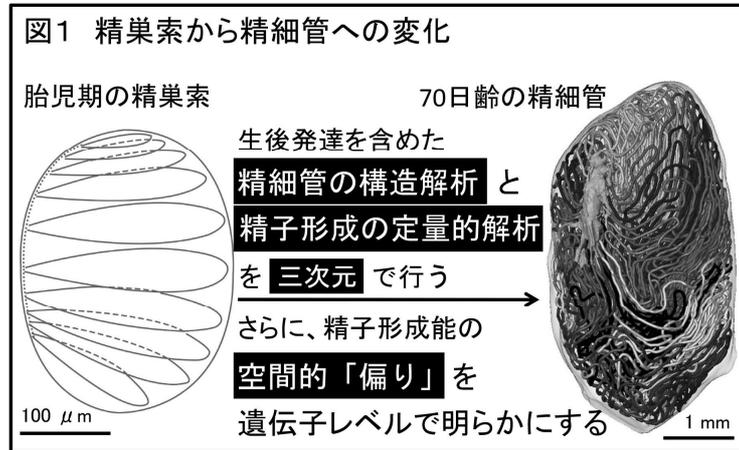
研究分野：生殖生物学

キーワード：精巣 精細管 三次元 三次元再構築 マウス 3D

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カップルの 15% が不妊であり、半数は男性側に原因があるとされている。原因の多くは精子形成障害であるが、機序が解明されたものは少なく、その解明と治療のために精子を作る精巣の研究が多数報告されてきた。しかし、精巣内の大部分を占める精細管の構造と機能に関しては、今もなお未解明な点が多く、研究段階にある。



2015 年、申請者は 70 日齢のマウス精巣の連続切片と高機能三次元再構築ソフトを用いて、全ての精細管を高解像度で再構築することに成功し、その本数・分岐・長さ・走行・相互関係の詳細を報告した (J Anat 2015)。本報告での再構築方法は高解像度であったものの、精細管の輪郭のトレースが手作業であったために、長時間を要することが課題として残った。今回、申請者は精細管の基底膜成分であるラミニンの免疫染色を含む蛍光 3 重染色を用いることで半自動となる再構築方法を考案し、前回の方法より所要時間を 1/5 以下に短縮、さらに再構築した精細管に精子形成に伴う細胞の定量的情報を付加することで、生後発達を含めた精細管の構造解析と精子形成の定量的解析を三次元で行うことが可能であるという着想に至った。さらに、再構築した別の組織切片を使って、精子形成能の空間的「偏り」を遺伝子レベルで解析・同定することが可能となり、その偏りを形成する遺伝子の機能を明らかにすることで、精子形成機構の解明の一助となるという着想に至った (図 1)。

2. 研究の目的

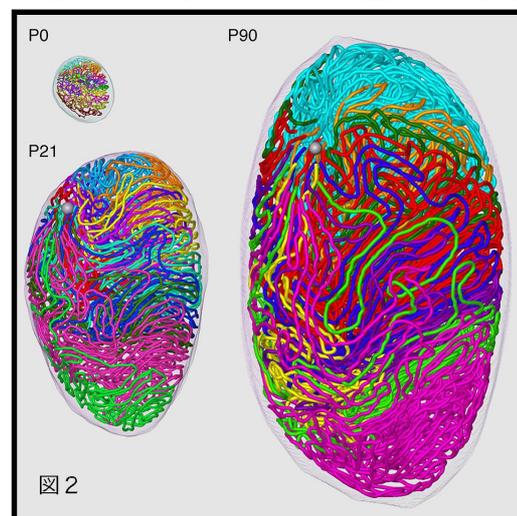
上記研究背景をもとに、本研究は蛍光 3 重染色を用いた半自動の三次元再構築法により、生後発達を含めた精細管の構造解析と精子形成の定量的解析を三次元で行う。さらに、精子形成能の高い場所において遺伝子発現のプロフィールを精巣全体と比較することで、精子形成能の空間的「偏り」に伴う遺伝子レベルの変化を網羅的に解析・同定し、その遺伝子がコードする分子の機能を解明する。

3. 研究の方法

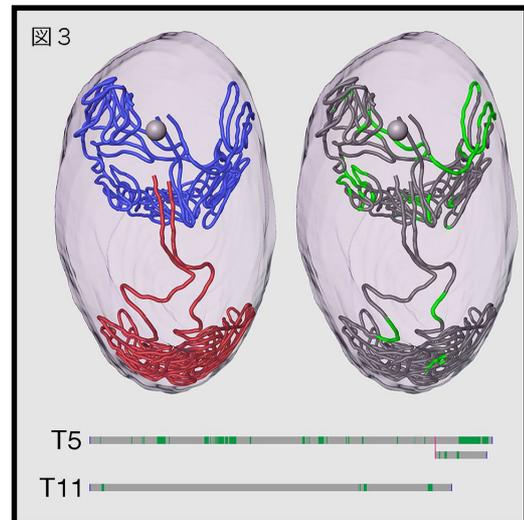
マウス精細管の三次元再構築、精子形成の三次元定量解析、精子形成能の「偏り」に伴う位置特異的遺伝子の網羅的探索に分けて行う。蛍光 3 重染色を行い、精細管の再構築および精子形成の定量的解析に用いる。位置情報を有する組織切片から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に解析する。精子形成能の「偏り」を作り出す位置特異的な遺伝子を同定し、その遺伝子がコードする分子の精巣における発現と局在を調べる。

4. 研究成果

生後発達におけるマウス精細管の本数・分岐・長さ・走行・相互関係を明らかにするために、0 日齢、21 日齢、70 日齢の精細管の三次元再構築を各 3 例行った。70 日齢において、蛍光染色を用いた半自動の三次元再構築は技術的に困難であり、PAS 染色を使った半自動の再構築方法を考案し、実行した。生後発達を含め、9 例の精巣におけるすべての精細管の三次元構造を報告した (図 2)。個体により細部に多様性



があるものの、基本的な構造が変わらないことを示した。また、再構築した精細管に精子形成が最初に開始した場所を三次元上にマッピングし、その場所が頭部側かつ精巣網側に偏っていることを明らかにした(図3)。さらに、3ヶ月齢において精子形成のすべてのステージを含む精細管の「wave」の三次元解析を行い、1つの精巣において wave が76個存在し、その平均長が16.9mmであることも明らかにした。精巣は均一な器官ではなく、精子形成能に空間的な「偏り」があることを証明した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Nakata H, Iseki S. Three-dimensional structure of efferent and epididymal ducts in mice. *Journal of Anatomy* (in press) 【査読有】

Nakata H. Morphology of mouse seminiferous tubules. *Anatomical Science International* 94(1):1-10 (2019). 【査読有】

Nakata H, Sonomura T, Iseki S. Three-dimensional analysis of seminiferous tubules and spermatogenic waves in mice. *Reproduction* 154(5):569-579 (2017). 【査読有】

Nakata H, Yamamoto M, Kumchantuek T, Adhapanyawanich K, Nishiuchi T, Iseki S. Synthesis, localization and possible function of serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a (Serpinb6a) in mouse submandibular gland. *Cell and Tissue Research* 369:513-526 (2017). 【査読有】

Nakata H, Wakayama T, Asano T, Nishiuchi T, Iseki S. Identification of sperm equatorial segment protein 1 in the acrosome as the primary binding target of peanut agglutinin (PNA) in the mouse testis. *Histochemistry and Cell Biology* 147(1):27-38 (2017). 【査読有】

仲田浩規 マウス精巣の形態学 金沢大学十全医学会雑誌 125(3):119-123 (2016). 【査読無】

〔学会発表〕(計10件)

仲田浩規、マウス精巣輸尿管・上体管の三次元構造、第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019年

仲田浩規、ワークショップ「生殖生物学研究のためのイメージング技術」PNAレクチンと精巣研究、第59回日本組織細胞化学学会総会・学術集会、2018年

仲田浩規、シンポジウム「TESE周辺状況のアップデート」精巣の解剖学、日本アントドロロジー学会第37回学術大会、2018年

仲田浩規、マウス精細管を三次元で見る、第54回北陸生殖医学会学術講演会、2018年

仲田浩規、平成29年度日本解剖学会奨励賞受賞者公演「マウス精巣の解剖学的基礎」、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018年

仲田浩規、マウス精細管三次元構造の規則性、日本アントドロロジー学会第36回学術大会、2017年

仲田浩規、シンポジウム(招待)「基礎と臨床から見た男性不妊治療の展望」マウス精細管三次元構造の規則性、第35回日本受精着床学会総会・学術講演会、2017年

仲田浩規、シンポジウム「生殖器の組織生物学」三次元で見る精細管の構造、第122回日

本解剖学会総会・全国学術集会、2017年

仲田浩規、生後発達に置けるマウス精細管の三次元構造、第76回日本解剖学会中部支部学術集会、2016年

仲田浩規、マウス精細管の三次元構造日本アントドロロジー学会第35回学術大会、2016年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。