

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	堀 淳一
<p>学位論文題目</p> <p><b>Differential effects of depot formulations of GnRH agonist leuprorelin and antagonist degarelix on the seminiferous epithelium of the rat testis</b></p> <p>(GnRH agonistのリュープロレリンとantagonistのデガレリックスがラット曲精細管上皮の微細構造に及ぼす影響の比較)</p> <p>共著者名</p> <p>甲賀大輔、柿崎秀宏、渡部 剛</p> <p><b>Biomedical Research</b></p> <p>平成30年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>精巣の曲精細管上皮では、体細胞分裂及び減数分裂で幹細胞である精祖細胞から、順次、精母細胞、精子細胞が生成し、精子細胞はさらに特異な形態をとる成熟精子に上皮内で分化・成熟した後、管腔内に放出される。上皮内で造精細胞に隣接するSertoli細胞は、この精子形成の開始・促進・維持に深く関与している。</p> <p>ヒトにおける精子形成過程は、視床下部-下垂体-精巣系の液性調節機構で制御され、視床下部ニューロンから放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)は下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞を刺激して黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH)の分泌を促進する。LHは精巣におけるtestosterone産生を促進し、Sertoli細胞に直接作用するFSHとともに精子形成を維持・促進する。</p> <p>泌尿器科学領域で前立腺癌の治療に用いられているGnRH誘導体は、作用機序の違いからagonistとantagonistに大別される。GnRH agonistは投与初期には本来の作用を発揮して下垂体前葉のGnRH受容体に促進的に働くが、作用が持続すると逆説的に受容体不応現象を誘起し、LH/FSHの合成及び分泌を強く抑制する。一方、GnRH antagonistは投与直後から、強力な競合阻害によりLH/FSHの合成及び分泌を抑制する。このように両剤とも持続的に作用させるとLH/FSHの合成及び分泌を強く抑制できることから、臨床的には、testosterone依存的な前立腺癌などの増悪を抑えるため、一定期間持続的に有効量のGnRH誘導体が放出される徐放性製剤が実用化されている。しかし、本来の作用機序が対称的なGnRH agonistとantagonistが精子形成過程に与える経時的な影響の差異を系統的に検討した研究はこれまで見当たらない。</p> <p>そこで本研究では、これら2種類のGnRH誘導体徐放性製剤投与で生じる曲精細管上皮の形態学的変化を経時的に比較検討し、精子形成過程に及ぼす両剤の影響の差異を明らかにすることを目的とした。</p>			

## 対 象 ・ 方 法

実験には雄 Wistar ラット (8 週齢、200g) を用い、72 匹には GnRH agonist 徐放性製剤 (リュープリン：武田薬品工業) 1.5mg/kg を、別の 72 匹には GnRH antagonist 徐放性製剤 (ゴナックス：アステラス製薬) 2mg/kg を背部皮下に単回投与し、以下の解析に供した<sup>(1)</sup>。

血漿 LH 濃度と精巣重量の測定：各薬剤投与後 4 時間、8 時間、1 日、2 日、4 日、7 日、14 日、28 日で各群 4 匹から採血し、ELISA kit を用いて血漿 LH 濃度を測定した。また、採血後に摘出した精巣は、重量測定後、ブアン固定/パラフィン包埋し組織学的検討に供した。

組織形態評価：上記の精巣組織標本を薄切/HE 染色し、光顕で曲精細管組織像の変化を観察した。また、精巣切片上で、曲精細管径と多核巨細胞の出現頻度を測定した。

曲精細管壁の微細構造変化の観察：2% glutaraldehyde (GA) -2% paraformaldehyde (PFA) で灌流固定した各群 3 匹のラット精巣を、常法に従ってエポン樹脂に包埋し、1 $\mu$  厚の準超薄切片を作成した。トルイジンブルー (TB) 染色した切片を光顕で観察後、電子染色/オスミウム蒸着し、SEM で同一部位の反射電子像 (BSE-SEM 像) を観察した<sup>(2)</sup>。

曲精細管の立体微細構造の観察：2% GA で灌流固定した各群 2 匹のラットから精巣を摘出し、KOH 消化法で膠原線維を除去した後、走査電顕 (SEM) で曲精細管の立体微細構造を観察した<sup>(3)</sup>。

蛍光免疫組織化学染色：4% PFA で灌流固定した各群 3 匹のラット精巣を、OCT コンパウンドに凍結包埋し、クライオトームで 12 $\mu$  厚の切片を作成した。切片は、常法に従って、ウサギ抗 espin 抗体とマウス抗 ZO-1 抗体、および 1 次抗体に対応する Alexa488 及び 594 標識ヤギ 2 次抗体で各抗原の局在を可視化した後、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

## 結 果

血漿 LH 濃度と精巣重量の経時的推移：agonist 投与群では、投与後一過性に血漿 LH 濃度が上昇したが、投与 2 日目までには基礎分泌レベルに低下し、この抑制状態は 28 日間持続した。一方、antagonist 投与群では、投与直後から測定感度以下まで血漿 LH 濃度が低下し、この状態が 28 日間に渡り維持された。また、精巣重量については、agonist 投与群では投与後 7 日間で対照群の 1/2 程度まで急激に減少し、その後 28 日間で 1/3 程度まで徐々に精巣が萎縮した。一方、antagonist 投与群では、投与直後の精巣重量減少は顕著ではないが、7 日後から 14 日目までに一転して対照群の 1/4 程度まで急激に精巣が萎縮した。

曲精細管の組織像の経時的変化：どちらの GnRH 誘導体投与群でも、徐放性製剤投与後 28 日間で曲精細管径は顕著に減少し、上皮が萎縮性変化を呈して大型の精母細胞が管腔側へ露出した。加えて、agonist 投与群では、投与後 1 日目から多数の未熟な精子細胞が曲精細管腔内に剥落し、上皮内には体細胞分裂及び減数分裂が不完全だった精子細胞に由来する異形の多核巨細胞が出現した。一方、antagonist 投与

群では、7日目までは形態学的に大きな変化は認められないものの、投与14日目には精細管径及び精細管上皮厚が劇的に減少した。ただし、agonist投与群とは異なり、多核巨細胞は観察期間を通して認められなかった。

曲精細管上皮の微細構造の経時的変化：投与後7日目で両GnRH誘導体投与群間での精巣重量及び組織像の差が最も顕著だったことから、まずこの時点で曲精細管上皮の微細構造を比較した。その結果、この時点では、antagonist投与群の曲精細管上皮内で造精細胞は対照群と同様の形態を呈し、多核巨細胞は認められなかった。一方、agonist投与群では未成熟な精子細胞や多核巨細胞が管腔に大量に剥落し、上皮内に成熟精子はほとんど認められなかった。このagonist投与群に特徴的な多核巨細胞は、5-10個の核を有し、精子細胞に特徴的なゴルジ装置や先体小胞の断片などの細胞内小器官を含んでいた。また、ヘテロクロマチンが核膜直下に集積する像が高頻度に観察され、同細胞がアポトーシスの初期過程にあることが示唆された。この後、antagonist投与群でも次第にSertoli細胞の丈が減少し、精子細胞が上皮内から消失し、大型の精母細胞が上皮表面に露出した。この過程で、Sertoli細胞質内への脂肪滴の蓄積が顕著になることから、上皮内で陳旧化した精子細胞の少なくとも一部はSertoli細胞に貪食処理される可能性が示唆された。

曲精細管上皮の立体微細構造の変化：対照群では、管腔側で柱状に積層した精子細胞の間をSertoli細胞の細胞質がよく伸展して埋めているが、GnRH agonist投与群では投与後早期からSertoli細胞の変形と退縮が顕著で、曲精細管壁の萎縮が急激に進んだ。一方、antagonist投与群では投与後7日目までSertoli細胞の立体微細構造に目立った変化は認められないものの、28日目にはagonist投与群同様にSertoli細胞の変形と退縮が進み、精母細胞が管腔側に露出した。

## 考 案

曲精細管上皮の管腔側には、普遍的な細胞接着装置に加えて、ectoplasmic specialization (ES)と呼ばれる特殊な細胞間結合が存在し、この細胞間結合の維持と適切なタイミングでの解離の両方が精子形成・放出に重要である。本研究で示されたように、GnRH誘導体の作用が長期に渡りLH/testosteroneとFSHが枯渇すると未成熟な精子細胞の剥落が生じることから、Sertoli細胞と精子細胞との間の細胞接着構造の維持には、上記のホルモンが必須であることが示唆された。一方で、この精子細胞の剥落が一過性のLH/FSHの爆発的放出が起こるagonist投与初期に特に顕著であることは、過剰のLH、FSH、testosteroneもまた、Sertoli細胞と精子細胞との間の細胞接着を損なうことを示唆している。GnRH agonist投与初期に起こるLH/testosterone及びFSHの爆発的放出はまた、曲精細管上皮基底部分で血液精巣閥門を形成する細胞接着装置の強度に影響する可能性もあり、この変化と呼応して起こる異形の多核巨細胞の出現は、過剰のLH/FSHがこの細胞接着強度を減弱させる可能性を示している。

一方で、GnRH誘導体の作用が長期間にわたった際には、どちらも曲精細管の萎縮が著明になる。ただし、この変化と呼応して、特にantagonist投与群ではSertoli細胞内への脂肪滴の蓄積が顕著になることから、長期間に渡るLH/testosterone及びFSHの分泌抑制は上皮内で陳旧化した精子細胞の細胞死と隣接するSertoli細胞による貪食処理を促進することが示唆された。一方、agonist投与群では、投与初期の細胞接着の減弱が著明で早期に精子細胞が上皮から剥落・喪失するため上皮内での貪食処理は活発ではなく、Sertoli細胞内への脂肪滴の蓄積は軽度にとどまるのではないかと推察された。




### 結 論

以上の研究結果から、臨床的には同等の効果を有すると考えられていたGnRH agonistとantagonistの徐放性製剤投与が、曲精細管上皮の微細構造に及ぼす影響に関しては明瞭な差があることが示された。このことは、精子形成能を温存しなければならない患者に対してGnRH誘導体制剤を投与する際には、今後、精巣に対する影響も考慮して適切な薬剤を選択する必要があることを示唆している。ただし、GnRH誘導体のどちらが精子形成能の温存に有利であるかについては、さらにGnRH誘導体投与終了後の曲精細管上皮の回復過程を形態学的・機能的に解析していく必要があると思われた。

### 引 用 文 献

- 1) Kitahara K, Sakai Y, Hosaka M, Hira Y, Kakizaki H and Watanabe T (2007) Effects of a depot formulation of the GnRH agonist leuprorelin on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes. *Arch Histol Cytol* 70:79-93.
- 2) Koga D, Kusumi S, Shodo R, Dan Y and Ushiki T (2015) High-resolution imaging by scanning electron microscopy of semithin sections in correlation with light microscopy. *Microscopy (Oxf)* 64:387-394.
- 3) Ushiki T and Ide C (1988) A modified KOH-collagenase method applied to scanning electron microscopic observations of peripheral nerves. *Arch Histol Cytol* 51:223-232.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	堀 淳一
		審査委員長	千石一雄 
		審査委員	吉田成孝 
		審査委員	山本明美 
学位論文題目			
Differential effects of depot formulations of GnRH agonist leuprorelin and antagonist degarelix on the seminiferous epithelium of the rat testis (GnRH agonist のリュープロレリンと antagonist のデガレリックスが ラット曲精細管上皮の微細構造に及ぼす影響の比較)			
掲載雑誌 : Biomedical Research			

(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)

GnRH アゴニストとアンタゴニストはともに、アンドロゲン感受性前立腺癌の治療薬として臨床で汎用されている。しかし、これまで両薬剤の精子形成に及ぼす影響に関する報告は認めない。本研究はラットを用い両剤投与後の精巣曲精細管上皮の形態学的変化を経時的に比較検討し、精子形成過程に及ぼす両剤の影響の差異を明らかにすることを目的としたものである。

実験では、雄 Wister 系ラットに GnRH アゴニスト徐放性製剤（リュープロレリン）、GnRH アンタゴニスト徐放性製剤（デガレリックス）を投与し、投与後の血清 LH の動態、曲精細管の組織像および微細構造の経時的変化を検討するとともに、espin 抗体を用い免疫組織学的にも検討した。アゴニスト投与初期には LH の一次的増加を認め、一方、アンタゴニストは投与初期より急激な LH の低下を示した。両剤投与 28 日後では、いずれも曲精細管径は減少し、上皮は萎縮性変化を示し精巣重量は減少を示した。しかし、投与初期では両薬剤に差異が認められ、アゴニスト投与では未熟精子細胞の管腔への排出、曲精細管上皮に多核巨細胞の出現を認めた。この現象は免疫組織学的検討からも、アゴニスト投与初期に認められる LH/FSH、テストステロンの一時的な増加が精子細胞とセルトリ細胞の細胞間結合不全を誘起し、多量の精子細胞が排出された結果であることを示唆している。また、投与 7 日目では、未成熟な精子や細胞分裂を完遂できなかった精子細胞のアポトーシスの初期過程にあると考えられる多核巨細胞が管腔内に大量に剥落し、上皮内には成熟精子はほとんど認められなかった。

一方、アンタゴニスト投与初期では形態学的に大きな変化は認められず、その後も多核巨細胞は観察されなかったが、精子細胞は上皮内より消失し、大型の精母細胞が表面に露出、セルトリ細胞質内に脂肪滴の沈着を認めた。脂肪滴の沈着は、アンタゴニスト投与による初期からの長期間にわたる LH/テストステロン、FSH の抑制が精子細胞の細胞死を誘発し、セルトリ細胞による貪食処理を促進した結果であると考えられた。

以上の結果より、本研究は GnRH アンタゴニスト、アゴニストの投与による精巣曲精細管の形態変化には明瞭な差異があることを初めて明らかにしたものである。また、本研究の結果は、妊孕能温存が必要な症例に対しては精子形成に与える影響も十分考慮した薬剤の選択の必要性を示唆するものであり、臨床的にも十分に価値のある研究であると考えられる。

また、諮問審査においても適切かつ論理的な回答が得られ、申請者は十分な学問的知識を有するものと考えられた。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が学位論文としてふさわしい内容であると判断する。