

「鉄欠乏を誘導した雌雄マウスにおける生殖機能に関する基礎的研究」

県立広島大学大学院  
総合学術研究科  
生命システム科学専攻

博士論文

令和4年3月  
(2022年)

藤内 慎悟

## 目次

第一章	緒論	3
第二章	鉄欠乏の雌性生殖機能への影響	
	序論	5
	材料および方法	7
	結果	14
	考察	17
	図および表	19
第三章	鉄欠乏の雄性生殖機能への影響	
	序論	28
	材料および方法	30
	結果	35
	考察	39
	図および表	41
第四章	総合考察	52
第五章	総括	54
	謝辞	56
	参考文献	57

## 第一章

### 緒論

国際生殖補助医療監視委員会 (ICMART) は、2006 年から 2016 年の 10 年間で世界の不妊治療件数が約 2 倍も増加したことを報告している。不妊治療件数が世界で 2 番目に多いアメリカにおいて、生殖医療分野は、今後 8 年間で 50 億米ドルもの成長が見込まれる巨大市場である。しかし、採卵 1 回あたりの世界平均の出産率は、20.1%と低く (Adamson *et al.*, 2016), 生殖医療分野の発展を阻む要因の一つと懸念されている。そのため、出産率の改善が求められている。出産率が低い原因には、インフラの未整備や文化の違いなどの国による問題、技術や治療方針による差異が大きいなどの医療提供側の問題、年齢や疾病、知識不足などの個人的な問題などの様々な要因が混在している。その中で、生殖科学に従事する研究機関に求められている課題は、医療提供側や個人の問題への解決策を提示し得る治療の技術革新や不妊の原因究明である。

不妊の原因は、女性側の要因と男性側の要因が存在し、女性側の要因は、発生能力を持たない未熟な卵が排卵される、あるいは排卵卵子がそもそも存在しないことにある。男性側の要因は、精子の運動性が微弱である精子無力症や精子の数が減少する造精機能障害、精子の通り道である精路が塞がれ精子が射精されない精路通過障害などが顕在化している。不妊症となる男性側および女性側の割合は不妊症全体の半数であることから (Winters and Walsh, 2014), 不妊の改善には、双方からのアプローチが必要である。

これらの要因に対して生殖医療の現場では、身体の状態を整えるなど自然な妊娠を誘導する一般不妊治療と卵子や精子を体外に取り出して受精、発生させる高度生殖医療を行っている。一般不妊治療は、自然周期に合わせて自然な妊娠を誘導するタイミング法、精子を排卵日の子宮内に注入する人工授精、ホルモン刺激により卵胞発育、排卵を誘導するホルモン療法が存在するが、近年の晩婚化により、タイミング法、人工授精法、ホルモン療法ともに産子率が低い。このことから、女性および男性側の双方の要因において多くの場合は、高度生殖医療に移行する。高度生殖補助医療では、成熟卵子を得て精子と体外受精 (In vitro fertilization; IVF) または顕微授精 (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI) により受精させ、発生した胚を母体へと戻し、妊娠させる方法がとられている。男性側の高度生殖補助医療は、精巣内で精子が形成されているが精路通過障害による不妊症である場合と、精巣内に少数の精子が存在する、あるいは全くない場合でアプローチが異なる。前者の場合は、精路再建術などの外科的手術、あるいは精巣上体精子回収法 (Microsurgical epididymal sperm aspiration; MESA) により精子を得ることが可能である。後者の場合、少数の精子が精巣内で採取できる場合は精巣内精子採取法 (Testicular sperm extraction; TESE) が取られるが、精子自体が認められない場合は円形精子細胞卵子内注入法 (Round spermatid injection; ROSI) が取られる。しかし、減数分裂前の精母細胞を用いた ROSI は、実験動物レベルでは産子を得ることができているが (Ogura *et al.*, 1998), ヒトにおいては成功例が報告されていない。また女性側の

高度生殖医療には、卵胞発育や排卵のどの段階まで卵巣機能が保存されているのかによってアプローチが異なる。排卵不全による不妊症であれば、卵胞発育をホルモンにより誘導した成熟卵子を採卵し、IVFへと治療が進むが、卵胞発育不全の場合は未熟な卵胞から採卵し、体外成熟培養（In vitro maturation; IVM）により成熟卵を得て、IVFに進む。しかし、この成功率は10%程度と低い。以上のことから、男性側、女性側ともに精巣や卵巣で精子や卵子がどのようにして形成されているかのメカニズム解明とそれに基づいた予防法や治療法の確立が必要である。

近年、身体の環境を整えることを目的に、妊娠維持に重要な葉酸や精子形成を促進する亜鉛などといった栄養素の摂取が注目されている。しかし、不妊治療を行っている男性においてこれらを補給しても効果がないことが報告され（Schisterman *et al.*, 2020）、葉酸や亜鉛以外にも不妊を予防または治療する重要な栄養素が存在すると考えられている。近年、女性において、鉄欠乏の月経過多や多嚢胞性卵巣症候群との関連が報告され（Abuaisha *et al.*, 2020）、女性の生殖機能と鉄欠乏との関連が指摘され始めている。鉄欠乏の男性においても、精子数の減少および精子の運動性の低下が認められ、これにより妊孕性が低下することが報告されている（Soliman *et al.*, 2014）。しかし、女性側、男性側の双方で鉄分と生殖機能に関しての科学的根拠に基づく報告が乏しいことから、この詳細なメカニズム解明が必要である。

そこで本研究では、鉄の雌雄生殖機能への役割を検討する目的で、鉄含有量が通常飼料の0.001%以下の低鉄飼料を雌雄マウスに給餌し、鉄欠乏モデル（Low Fe Diet; LFD）マウスを作出し、鉄が十分に含まれる通常飼料を給餌した（Normal Diet; ND）マウスとの比較解析を行った。また、鉄欠乏により認められる雌雄の生殖機能不全が、鉄の給餌により回復可能か調べるために、鉄欠乏モデルマウスに3週間通常飼料を給餌した（LFD Rescue; LFDR）マウスを作出し、鉄分の回復試験が雌雄の生殖機能に及ぼす影響を調べた。

## 第二章

### 序論

哺乳類の卵巣には、胎児期に数百万個もの卵が形成されるが、性成熟を迎えるころには 40 万個程度まで減少する。その間に卵は一層の扁平な卵胞上皮細胞に覆われ、原始卵胞を形成し、哺乳動物が性成熟を迎えるまで第一減数分裂前期の網状期で停止している。性成熟を迎えた哺乳動物は、通常マウスでは 4-5 日、ウシやブタでは約 21 日、ヒトでは約 28 日と一定の周期で卵成熟、排卵、黄体形成、黄体退行という性周期を卵の着床が成立するまで繰り返す。この性周期の卵成熟の過程で、卵成熟と同調して卵胞発育が行われる。個体が性成熟を迎え発育を開始した原始卵胞は、その周りを包む卵胞上皮細胞が立方体状の顆粒膜細胞へと変化し、一次卵胞となる。その後、一次卵胞は、顆粒膜細胞が増殖することで顆粒膜細胞が多層化した二次卵胞になる。二次卵胞では、卵の容積が増大し、核が大型化して卵核胞 (Germinal Vesicle) が形成される。さらに、顆粒膜細胞の最外層に基底膜が構成されることで外界と隔離される。二次卵胞以降の発育は、この基底膜周囲に血管が形成されることにより Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) の放出を介した卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone; FSH)、黄体形成ホルモン (Lutenizing Hormone; LH) が血管を介して制御することが重要となる。FSH は、顆粒膜細胞でエストロゲン (E2) 産生酵素である P450 aromatase をコードする *Cyp19a1* の遺伝子発現を増加させ、E2 を産生させる (Silva and Price, 2000; Silva and Price, 2002)。産生された E2 は、細胞周期調節因子である CyclinD2 をコードする *Ccnd2* mRNA の転写を促進することで発現を上昇させ、細胞増殖を誘導し後期胞状卵胞まで卵胞サイズを拡大させる (Sicinski *et al.*, 1996)。その後、E2 は LH の受容体 (LH/choriogonadotropin receptor; LHCGR) の mRNA 発現の亢進および脳下垂体からの LH の一過的な LH の放出である LH サージを誘導する (Wesson *et al.*, 1980)。LH サージは、卵丘細胞の膨潤、卵の減数分裂再開を誘起し、卵は卵核胞崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown; GVBD) を起こし、第一減数分裂前期から第二減数分裂中期まで進行することで、卵は成熟し、受精可能な状態になり、卵管へと放出される (Su *et al.*, 2002)。これら卵胞発育および排卵は連続した事象であり、正常に卵成熟、排卵を誘導するための卵胞環境を整える卵胞発育において異常が生じると付随して排卵にも異常が生じることは、*Fshb* と *Fshr* のノックアウトマウスにおいて排卵不全により不妊になることから明らかである (Abel *et al.*, 2003)。このため、卵胞発育は排卵までの過程の根幹とも言え極めて重要な過程である。

二次卵胞から後期胞状卵胞までの卵胞発育には、卵胞表面に形成される血管網を介して卵胞内に下垂体から作用する FSH および LH が血管を介して卵胞に作用することが重要となる。これまでの研究において、FSH 様作用の eCG を投与した雌マウスでは、卵巣の VEGF が高発現し血管新生が顕著に認められることが報告されている (Sato *et al.*, 1982)。また、直接 VEGF 遺伝子断片を注入したラット卵巣において血管新生が亢進および排卵直前卵胞数が有意に増加することも報告されている (Shimizu *et al.*, 2003)。これに加え、これまでの研

究により、卵胞発育期の卵胞液には、FSH や LH 刺激により卵胞内の局所で合成される EGF-like factor や TGF- $\beta$ , E2 などの因子群に加え、グルコース、酪酸などの糖類、アルブミン、脂肪酸、HDL など多くの血液由来因子が存在することが報告されている (Basuino and Silveira, 2016)。さらに初期胞状卵胞から回収した卵丘細胞卵複合体 (COC) の体外培養時にこれらの因子を含む FCS を添加することで卵成熟率が向上するなど報告されており、卵胞液には卵胞発育や卵成熟を誘導する FSH や LH 以外の未知因子の存在が示唆されている。我々は、卵胞発育期である 4-7 mm のブタ卵胞の卵胞液中に鉄の担体タンパク質であるトランスフェリンが血中の 4 倍以上もの量で蓄積すること、体外培養時の卵成熟を向上させることを見出し (未発表データ)、トランスフェリンを介して取り込まれた鉄が卵胞発育を誘導する一因であると考えた。しかし、卵胞発育期の卵巣において鉄がどのような役割を担っているのかの個体レベルでの解析は全く行われていない。

そこで本章では、卵胞発育期の卵巣に蓄積する鉄の卵巣機能と雌性生殖機能への影響を検討する目的で、鉄含有率が 0.001%未満の低鉄飼料で飼育した鉄欠乏モデル (Low Fe diet; LFD) マウスを作製し、通常飼料で飼育した (Normal diet; ND) マウスと比較解析を行った。また、鉄欠乏により認められる生殖機能不全が、鉄の給餌により回復可能か調べるために、LFD マウスに 3 週間通常飼料を給餌し、鉄欠乏回復 (LFD Rescue; LFDR) マウスを作出し、ND および LFD マウスとの比較解析を行った。はじめに低鉄飼料給餌により鉄欠乏を誘導する飼料中の鉄含有量と給餌期間を検討した。鉄含有量と給餌期間を決定したマウスを用いて、次に鉄欠乏状態が性周期、発育卵胞数、卵胞発育マーカー、排卵数、受精率、発生率に与える影響を調べた。鉄欠乏による影響が鉄の給餌により回復可能であるか LFDR マウスを用いて血清中鉄量、性周期、妊孕率を調べた。

## 第二章 材料および方法

### 試薬の調整

- ・ PBS (Phosphate Buffered Saline; リン酸緩衝生理食塩水)

PBS (+) ×10 は, 超純水に 0.1% (w/v) CaCl<sub>2</sub> (Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd, Osaka, Japan), 0.1% (w/v) MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Katayama Chemical Industries Co, Ltd, Japan), 1% (w/v) Glucose (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を溶解し作製した。PBS (-) は, 超純水に 0.8% (w/v) NaCl (Fujifilm wako, Tokyo, Japan), 0.02% (w/v) KCl (Nacalai tesque), 0.281% (w/v) NaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Nacalai tesque), 0.02% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Nacalai tesque) を溶解し作製した。作製した PBS (-) に PBS (+) ×10, 1% (w/v) PVP (Sigma Aldrich, MO, USA), 0.2% ペニシリンー 스트レプトマイシン (Nacalai tesque) を添加し PBS を作製した。

- ・ eCG (妊馬血清性性腺刺激ホルモン) および hCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン)

eCG は, 20 IU の eCG (注射用血清性性腺刺激ホルモン 動物用セロトロピン, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan) を生理食塩水で希釈して 5 IU を, hCG は 60 IU の hCG (注射用胎盤性性腺刺激ホルモン 動物用ゴナドトロピン 3000, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd) を生理食塩水で希釈して 6 IU をマウスに腹腔内投与をした。

### マウスの維持

日本クレア株式会社から購入した C57BL/6 マウスを当研究室で繁殖維持した。通常飼料には飼育繁殖用固形飼料 (CE-2, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用い, 低鉄飼料には, 鉄配合量が 0.001 %未満である特殊配合飼料 (CLEA Japan, Inc.) を用いた。通常飼料と低鉄飼料 100 g あたりの成分表および鉄分量は Table 2 に示した。飼料および給水は, 不断給餌および自由給水とした。飼育環境は, 環境温度を 22±1°C, 相対湿度を 55±10%, 明暗時間を 12 時間照明 (午前 6 時点灯, 午後 6 時消灯) とした。生後 3 週間で離乳させたマウスを実験に用い, 解剖は, イソフルランによる吸入麻酔後, 頸椎脱臼により安楽死させたのちに行った。なお, 実験動物の取り扱いには県立広島大学動物実験委員会に従った。

### 低鉄飼料給餌 (Low Fe diet) マウスの作製

上記で述べた飼育環境のもと, 通常飼料で飼育した C57BL/6 マウスから生まれた雌マウスを 3 週齢で離乳後, 通常飼料を 6 週齢または 9 週齢まで不断給与で飼育したマウスを通常飼料給餌 (Normal diet; ND) マウスとした。また 3 週齢で離乳後に, 低鉄飼料を 6 週齢, または 9 週齢まで不断給与で飼育したマウスを低鉄飼料給餌 (Low Fe diet; LFD) マウスとし, 6 週齢の LFD マウスに通常飼料を 9 週齢まで不断給与で飼育したマウスを LFD 回復 (Low Fe Rescue; LFDR) マウスとして以下の実験に供試した。また離乳後から 3 週間経時的に ND および LFD マウスの体重を計測した。

### 膣スメアによる性周期の特定

雌マウスの膣から膣垢を採取し、スライドガラスに塗抹した。固定のため、スライドガラスにメタノール (Sigma Aldrich) を滴下し、30 秒程度静置した。ギムザ染色液 (Fujifilm wako) をスライドガラスに滴下し、15 分間静置した後に流水で洗い流し、正立顕微鏡 (Carl Zeiss, Thüringen, Germany) 下で性周期を確認した。

### 卵巣、肝臓および血清の回収

膣スメアの観察により発情休止期と認めた 6 週齢の雌マウスに 25 G 注射針 (Terumo, Tokyo, Japan) を付けたシリンジ (Terumo) で 5 IU 分の eCG 100  $\mu$ l を腹腔内注射により投与し 48 時間後、eCG と同様に 6 IU 分の hCG 100  $\mu$ l を投与し、各処理時間後にイソフルランによる吸入麻酔下で頸椎脱臼後、解剖により卵巣および肝臓を回収した。取り出した卵巣は、重量を測定後に回収し、鉄量、HE 染色、胞状卵胞数、卵胞発育マーカー遺伝子発現、E2 量に、肝臓は鉄量の解析に供試した。また、解剖時に心臓から放血させ全血を回収後、冷却遠心機で 2,500 rpm で 5 分間遠心した後、血清部分である上清を回収し、鉄量および FSH 量の測定に用いた。

### Total RNA 抽出

雌マウスから回収した生体サンプルの Total RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen sciences, NY, USA) を用いて行った。サンプルの入ったマイクロチューブに Buffer RLT 1 ml に対して 10  $\mu$ l の  $\beta$ -Mercaptoethanol を混和した溶液を 350  $\mu$ l 添加し 25 G 注射針を付けた 1 ml のシリンジで 5 回出し入れした。その後、DEPC 処理水 (Nacalai tesque) で希釈した 70% (v/v) エタノールを 350  $\mu$ l 添加し、コレクションチューブをセットしたスピнкаラムへ入れ、4°C に設定した冷却遠心機 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) で 15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブに溜まった液体を廃棄し、Buffer RW1 を 700  $\mu$ l 添加し、15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブに溜まった液体を廃棄し、新たな下請けをセットした。Buffer RPE を 500  $\mu$ l 添加し、15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブに溜まった液体を廃棄し、再び Buffer RPE を 500  $\mu$ l 添加し、15,000 rpm で 2 分間遠心した。スピнкаラムをマイクロチューブへセットし、RNase free water を 30  $\mu$ l 添加し冷却遠心機内で 1 分間静置し、15,000 rpm で 1 分間遠心した。マイクロチューブの抽出された Total RNA を含む RNase free water を -80°C で冷凍保存した。

### Quantitative RT-PCR

前項で抽出した Total RNA の濃度を吸光度計 (Nanodrop one, Thermo fisher, CA, USA) を用いて測定し、DEPC 処理水で濃度を 5 ng/ $\mu$ l に希釈した。7.2  $\mu$ l サンプルに対して 4  $\mu$ l RT Buffer (Promega, WI, USA), 0.8  $\mu$ l dNTP (Promega), 0.5  $\mu$ l OligoDT (Promega), 0.25  $\mu$ l TuqRT



(Promega), 7.2 µl DEPC 処理水を RT-PCR 用マイクロチューブ (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) に入れた。サーマルサイクラー (Quick bath, ThermoGen Inc., Nagano, Japan) を用いて 42°C で 1 時間 15 分間, 94°C で 5 分間温めて cDNA を生成した。

RT-PCR を行い生成された cDNA サンプル 1.2 µl に対して, 7.5 µl KAPA SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, MA, USA), 各 0.6 µl 標的遺伝子プライマーセット (Primer F, R) (FASMAC, Kanagawa, Japan), 5.1 µl 滅菌超純水の計 15 µl を Real-Time PCR 用チューブに入れた。AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, CA., USA) を用いて 95°C で 3 分間, その後 95°C で 10 秒間, ターゲット遺伝子の最適アニーリング温度で 30 秒間を 40 サイクル行い, cDNA を増幅した。各サンプルにおいて, 内部標準を *Rpl19* mRNA とした。アニーリング温度および *Rpl19*, *Fshr*, *Cyp19a1*, *Ccnd2* に対する PCR プライマーは表 1 に記した。Real-Time PCR データ解析は, AriaMx Real-Time PCR Software 1.7 (Agilent Technologies) を用いた。

#### 鉄濃度測定

血清, 肝臓および卵巣の鉄濃度測定は, Iron Assay Kit (Bioassay systems, CA, USA) を用いて行った。血清はそのままサンプルとして供試した。肝臓および卵巣は, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 100 ml に対して 200 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Triton X-100 を溶解し作製した Cell lysis buffer で溶解後, 超音波破碎機でホモジナイズした。十分にホモジナイズしたサンプルを 6 M の HCl で pH2~3 に調整後 30 分間静置した。その後, 冷却遠心機で 10,000 rpm で 10 分間遠心し, 上清を新しいエッペンドルフチューブに移し, これをサンプルとした。

Iron Assay Kit による鉄量の測定は, 以下の手順で行った。

Micro Well Plate に Standard, Blank およびサンプルを 40 µl 添加した。

すべてのウェルへ R-A Buffer を 200 µl 添加し, 5 分間静置した。

Blank を対照とし, Microplate Reader で吸光度 (波長: 570 nm) を測定し, OD1 とした。

5 分間の静置後, 発色試料である R-R Chelate color をすべてのウェルへ 8 µl 添加し,

Microplate Reader で吸光度 (波長: 570 nm) を測定し, OD2 とした。

以下の式を用いて鉄濃度の算出を行った。ここでの OD サンプルはサンプルの吸光度, OD 標準は Standard の吸光度を表す。

$$\frac{OD2_{\text{サンプル}} - OD1_{\text{サンプル}}}{OD2_{\text{標準}} - OD1_{\text{標準}}} \times 200 = \text{鉄濃度} \quad (\mu\text{g/dl})$$

#### 血中 FSH 量の測定

ND および LFD マウス血清中の FSH 量は, FSH ELISA Kit (LSBio, WA, USA) を用いてマイクロプレートリーダー (ARVO X4, PerkinElmer, MA, USA) で測定した。

### ステロイドホルモンの抽出

-80°C で保存した卵巣から抽出を行った。サンプルと超純水で 0.3 N に調整した NaOH (Fujifilm wako) を 5 : 6 で混和し、10 分間静置した。ジクロロメタン (Fujifilm wako) を 1 ml 加え、5 分間激しく混和した。混和後、サンプルを 4°C, 3,000×g の条件下で 15 分間遠心分離した。分離したジクロロメタン分画を回収し、新しいエッペンドルフチューブに移した後、遠心濃縮機 (株式会社トミー精工, Tokyo, Japan) を用いてジクロロメタン層を吸引除去し、固相化した。これを超純水で希釈した 50 % (v/v) のメタノールで再溶解した。

### エストロゲン (E2) の濃度測定

抽出した卵巣中のステロイドホルモン濃度を Estradiol EIA kit (Cayman Chemical, MI, USA) を用いて測定した。EIA kit による測定は以下の手順で行った。

試薬準備としてキット内の EIA Buffer (10X) を超純水で 10 倍希釈して用いた。また、キット内の AChE Tracer および EIA Antiserum はそれぞれ EIA Buffer 6 ml で溶解した。Estradiol EIA Standard は 4,000 pg/ml から 6.6 pg/ml の濃度に EIA Buffer で希釈・調整した。Wash Buffer は、キット内の Wash Buffer Concentrate (X400) を超純水で 400 倍希釈し、Polysorbate 20 を 2000 倍希釈し作成した。キット内の Ellman's Reagent は遮光条件のもと、超純水で溶解した。

EIA Buffer, EIA Standard, AChE Tracer, EIA Antiserum, Sample をそれぞれ以下のようにウェルプレートに添加した。各試薬を添加後、プレートをシールで覆い、遮光し室温で 1 時間振盪した。

	NSB	B <sub>0</sub>	Standard	Sample
EIA Buffer	100 µl	50 µl		
EIA Standard			50 µl	
AChE Tracer	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
EIA Antiserum		50 µl	50 µl	50 µl
Sample				50 µl

振盪後、すべてのウェルを Wash Buffer で 5 回洗浄し、すべてのウェルに Ellman's Reagent を 200 µl を添加し、プレートをシールで覆い、遮光してさらに 1 時間振盪した。振盪後、ウェルの底を拭き取り、シールを剥がして分光光度計を用いて 405 nm の波長で吸光度を測定した。測定した Standard の吸光度を基に検量線を作成し、各サンプルの E2 濃度を算出した。

### 卵巣組織切片の作製

0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) は、12.11 g の Tris を超純水に溶解後、HCl を加え pH 7.2 に調整後、超純水により 1 L (pH 7.2±0.05) にメスアップし作製した。

ND および LFD から回収した卵巣を用いて組織切片を以下の手順で作製した。回収した卵巣は、4%パラホルムアルデヒド (Fujifilm wako) /PBS (-) に浸し 5 時間振盪し組織を

固定した。固定された卵巣を 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) で 1 時間の振盪を 2 回行い、固定液を洗浄した。2 回の洗浄後、さらに 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) で一晩振盪し十分に洗浄した。その後、100%エタノール (Nacalai tesque) を超純水で希釈して 50%、70%、90%、95%エタノールを作製し、洗浄後の卵巣を 50%から 95%まで順に各溶液でそれぞれ 1 時間振盪した。95%エタノールの振盪後、100%エタノールで 15 分間の振盪を 3 回行い卵巣組織の脱水を完了した。脱水後の卵巣をキシレン (Fujifilm wako) で 30 分間の振盪を 2 回行った。さらに、60°C で保温したキシレンに 30 分間浸した。キシレンを拭き取り 60°C で保温したティッシュテックパラフィン (Sakura, Tokyo, Japan) に 30 分間の浸漬を 3 回行った。60°C で保温した新たなティッシュテックパラフィンに浸し、氷上に静置し包埋した。固まったパラフィンブロックを木台へ固定し、滑走式ミクロトームで 5  $\mu$ m の厚さの卵巣組織切片を作製し、37°C の温水に浮かべた。切片を MAS 塗布スライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) に乗せ、乾燥させた。

### HE 染色

前項で作製した卵巣組織切片をキシレンへの 1 分間の浸漬を 2 回行い脱パラフィンした。脱パラフィンを行った組織切片を 100%、90%、80%エタノールの順で 1 分間浸し親水化した。その後 PBS (-) に浸し洗浄した。洗浄した組織切片の水気を十分に取り除き、ヘマトキシリン液 (Sakura) に 4 秒浸した後、5 分間流水で水洗した。再び組織切片の水気を取り除き、エオジン液 (Sakura) に 1 分間浸した後、流水で水洗した。PBS (-) に浸した後、組織切片を 80%、90%、100%エタノールの順で浸し脱水した。さらにキシレンへの 1 分間の浸漬を 2 回行った。浸漬後、封入剤 (Matsunami Glass Ind., Ltd.) を用い、スライドガラス上の組織切片にカバーガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd.) を乗せ封入した。

### 胞状卵胞数のカウント

ND および LFD マウス由来の HE 染色した卵巣組織切片を正立顕微鏡 (Carl Zeiss) で画像を撮影し観察を行った。25  $\mu$ m ごとに卵巣組織切片を作製し、卵巣全体の二次卵胞、前胞状卵胞、初期胞状卵胞、後期胞状卵胞のそれぞれの数をカウントした。

### 排卵数の測定

マウスに eCG 刺激 48 時間後、hCG を投与し 16 時間後の卵管膨大部に排卵された COC を回収し、排卵数を計測した。

### 受精試験

- ・培地の作成

受精培地には Human tubal fluid (HTF) medium を用いて受精試験を行った。HTF medium の組成は以下の通りである。超純水 50 ml に、NaCl (Fujifilm wako) 0.2968 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fujifilm

wako) 0.0174 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Nacalai tesque) 0.0024 g, NaHCO<sub>3</sub> (Nacalai tesque) 0.105 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Nacalai tesque) 0.0149 g, D (+) -Glucose (Nacalai tesque) 0.025 g, ビルビン酸ナトリウム (Nacalai tesque) 0.0018 g, DL-乳酸ナトリウム (Sigma Aldrich) 171 μl, BSA (Sigma Aldrich) 0.2 g, ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai tesque) 500 μl を混合した。十分に溶解した後に、フェノールレッド (Nacalai tesque) 0.0001 g を混和し、溶液を赤色に呈色させた。受精試験前日に作成した HTF medium を用いて、50 mm シャーレに精子前培養用培地として 400 μl, 媒精用培地として 200 μl のドロップを作製し、培地の乾燥を防ぐためミネラルオイル (Sigma Aldrich) 8 ml でドロップを覆い、インキュベーター内でガス平衡化した。発生培地には KSOM medium (ARK Resource, Kumamoto, Japan) を用いて、50 mm シャーレに 50 μl のドロップを作製し、ミネラルオイル 8 ml でドロップを覆い、インキュベーター内でガス平衡化した。

- ・精子の前培養

通常飼料で飼育した 3 ヶ月齢の C57BL/6 雄マウスの精巣上体尾部から精子を採取し、前培養培地内で 60 分間インキュベートした。

- ・排卵卵子の回収

陰スミア像により発情休止期を確認した 6 週齢の ND および LFD 雌マウスに eCG を投与し、48 時間後に hCG を投与し、投与 16 時間後の卵管膨大部から COC を回収した。回収した COC はパストールピペットを用いて媒精用ドロップに移した。

- ・精子カウントおよび受精試験

前培養後、ドロップの途中で浮遊した精子のみを回収し、受精試験に用いた。回収した精子懸濁液を血球計算盤の上ののせ、カバーガラスを空気が入らないようにかぶせて、正立顕微鏡で精子数をカウントした。カウントした精子数から  $2 \times 10^5$  sperm/ml に HTF medium で精子数を調整し、COC が移してある媒精用ドロップに添加し、6 時間共培養した。培養後、卵に付着している精子をパストールピペットで除去し KSOM medium で洗浄後、発生培地のドロップに受精卵を移し、5 日間培養した。また、5 日間の培養の間、発生卵の様子を倒立位相差顕微鏡で観察した。

### 交配試験

6 週齢および 9 週齢の ND および LFD 雌マウスに、通常飼料で飼育した 3 カ月齢の雄マウスを用いて 1 か月間交配させ、妊娠が確認された個体の割合を妊娠率として算出した。使用した雄マウスの個体差が出ないようにするため、また雄マウスに低鉄飼料による影響を与えないため、雄マウスは 1 日おきに交換した。妊娠を確認した個体が出産した際に、仔マウスの数をカウントし算出した。

### 統計処理

実験は、それぞれ3回以上繰り返して行い、その結果は Excel 統計（2012）を用いて統計分析した。算出した結果は平均値 ± 標準誤差で表示した。2 群間の比較には t 検定を用い、3 群以上の比較は、一元配置分散分析後、Fisher の最小有意差法で算出し、5%水準で有意差があると評価した。

## 第二章

### 結果

#### 実験 1 低鉄飼料給餌により鉄欠乏を誘導する鉄分の割合および飼料給餌期間の決定

低鉄飼料給餌が鉄欠乏状態を引き起こす期間および鉄分割合を調べる目的で、3週齢で離乳したマウスに通常飼料と低鉄飼料を0%、50%、90%、100%の割合で混合した飼料で3週間給餌し、血清中の鉄量を測定した (Fig 1A, B)。0%LFD, 50%LFD, 90%LFD の間に有意差は認められず血清鉄量は維持したが、100%のLFDを3週間給餌したときに0%、50%および90%のLFDを給餌したときと比較して有意に低下した (Fig 2A)。ND または 100%LFD で1週間、2週間および3週間飼育したところ、血清中の鉄濃度は、1週間および2週間の低鉄飼料給餌ではNDと比較して差が認められなかったが、3週間100%の低鉄飼料を給餌するとNDと比べて有意に低い値を示した (Fig 2B)。このとき、LFDマウスの血中鉄濃度は、 $34.65 \pm 7.48 \mu\text{g/dL}$ であり、この値は、鉄欠乏モデルマウスとして報告されている基準値の $50 \mu\text{g/dL}$ に比べ低い血清鉄量であった (Kobayashi *et al.*, 2017)。このことから、低鉄飼料割合は100%とし、飼料給餌期間は3週間とした (Fig 1C)。低鉄飼料の給餌を開始して3週間においてNDおよびLFDマウスの体重は差が全く認められなかった (Fig 2C)。LFDマウスの肝臓および卵巣中の鉄量は、NDと比較して有意に低い値を示した (Fig 2D, E)。

#### 実験 2 鉄欠乏条件が自然周期の性周期変動に与える影響

鉄欠乏条件が自然周期の性周期変動に与える影響を調べる目的で、6週齢のNDおよびLFDから膣垢を採取し、ギムザ染色により膣スメア像を観察し性周期を調べた。性周期サイクルは、有核細胞が死滅し白血球が認められる発情休止期から始まり、核のある膣上皮細胞が認められ始める発情前期、E2により膣上皮細胞が角化した細胞が認められる発情期、角化した細胞が減少し有核細胞が変性した細胞が認められる発情後期を経て再び発情休止期に戻るサイクルを平均4日~5日で繰り返す。NDのスミア像からは、発情休止期、発情前期、発情期、発情後期全ての特徴が確認され、性周期サイクルは平均 $6.00 \pm 0.81$ 日の規則的な性周期変動であった。一方、LFDは、発情休止期のみが認められ、発情前期、発情期、発情後期は認められなかった (Fig 3A)。鉄欠乏条件における妊孕性を調べるため、6週齢のNDおよびLFD雌マウスをND雄マウスとの1ヶ月間の交配試験に供試した結果、NDでは、100%の個体が妊娠し産仔が得られたのに対して、LFDはすべての個体が妊娠しなかった (Fig 3B, C)。

#### 実験 3 鉄欠乏状態が卵巣、胞状卵胞数および卵巣重量に与える影響

鉄欠乏状態が卵胞発育に与える影響を調べる目的で、卵巣重量および卵巣切片を作製し胞状卵胞数を測定した。発情休止期における卵巣切片像は、NDマウスにおいて前胞状卵胞が多数認められるのに対して、LFDマウスの卵巣には前胞状卵胞よりも未成熟な卵胞が多

数認められ、多くの卵胞で発育が停止していた (Fig 4A, B)。発情休止期の ND および LFD マウスに eCG 刺激により卵胞発育を誘導したところ、ND マウスにおいて十分に卵胞発育した後期胞状卵胞が多数認められたのに対して、LFD マウスにおいて胞状卵胞がほとんど認められなかった (Fig 4C, D)。また、eCG 刺激を行った LFD マウスの卵巣における二次卵胞数は、ND と比較して有意に増加していたが、前胞状卵胞数および後期胞状卵胞数は ND と比較して有意に減少した (Fig 4E, F)。さらに LFD マウスの卵巣重量は、発情休止期および eCG 刺激 48 時間後において ND と比較して有意に低下した (Fig 4G)。

#### 実験 4 鉄欠乏状態が卵胞発育マーカーの遺伝子発現に与える影響

鉄欠乏が卵胞発育に及ぼす影響を調べる目的で、発情期の卵巣中の卵胞発育マーカー遺伝子 (*Fshr*, *Cyp19a1*, *Ccnd2*) の mRNA 発現および卵胞発育マーカーの血清中 FSH 濃度および卵巣中 E2 濃度を測定した。LFD マウスの *Fshr*, *Cyp19a1* および *Ccnd2* mRNA 発現は、ND に比べ有意に低い値を示した (Fig 5A, B, C)。発情休止期における血清中の FSH 濃度は、ND と LFD で差が認められなかったが (Fig 5D)、eCG 投与 48 時間後の LFD マウス卵巣の E2 濃度は、ND に比べ有意に低い値を示した (Fig 5E)。

#### 実験 5 鉄欠乏条件が排卵数、排卵卵子の受精能、胚の発生能および妊孕性に与える影響

鉄欠乏条件が排卵と卵子の質に与える影響を調べる目的で、eCG 投与 48 時間後に hCG を投与し、16 時間後に卵管から排卵卵子を回収し、その数をカウントするとともに、体外受精後の受精率と胚盤胞率を調べた。排卵数は、ND において 1 匹あたり約 20 個であったのに対して、LFD では約 5 個と有意に低い値であった (Fig 6A)。受精率は、ND において  $56.2 \pm 7.69\%$  であったのに対して、LFD では  $21.6 \pm 7.96\%$  と有意に低い値を示した (Fig 6B)。さらに、胚盤胞率も ND では  $44.8 \pm 12.8\%$  であったのに対し、LFD では  $20.0 \pm 8.7\%$  と有意に低い値を示した (Fig 6B)。

#### 実験 6 LFD マウスへの通常飼料の給餌が血中および卵巣中铁量、性周期変動および妊孕性に与える影響

3 週間の低鉄飼料給餌による鉄欠乏状態の卵巣機能が通常飼料の給餌により回復するかを調べる目的で、6 週間通常飼料と低鉄飼料を給餌したマウスに加え、3 週間低鉄飼料を給餌したマウスにその後 3 週間通常飼料を与えた LFD Rescue (LFDR) を作製し、血清鉄量、性周期変動、妊孕性を検討した (Fig 1D)。給餌期間終了後の発情休止期における血清鉄量は、ND で  $157.2 \pm 31.2 \mu\text{g/dL}$  であり、LFD においては  $92.0 \pm 18.1 \mu\text{g/dL}$  と有意に低い値を示したが、LFDR において LFD と比べ有意に高く ND と同程度の値 ( $174.8 \pm 5.4 \mu\text{g/dL}$ ) を示した (Fig 7A)。性周期変動は、ND において性周期すべての特徴が確認され、平均性周期も  $4.75 \pm 0.20$  日と通常の性周期であった。LFD においては、6 週齢の LFD 同様に発情休止期のみが確認され、他の周期は認められなかったが、LFDR では、ND と同様にすべての性周

期の特徴が確認され、平均性周期も  $5.30 \pm 0.33$  日と ND と同程度まで回復した (Fig 7B)。妊孕性は、ND において全ての個体に妊娠が確認されたのに対して、LFD ではまったく妊娠が認められなかった。一方、鉄給餌により LFDR においてすべての個体が妊娠した (Fig 7C)。



## 第二章

### 考察

当研究室において、卵胞発育期のブタおよびマウス卵巣には、TF が高濃度蓄積することを見出した。このことから、鉄は、卵胞発育期の顆粒膜細胞に取り込まれ、卵胞発育や卵成熟を誘導すると示唆された。そこで本章では、鉄が食餌でのみ体内に吸収される点に着目し、まず、鉄の制限給餌を 3 週間行うことで鉄欠乏モデルマウスを作製可能であるかどうかを検討した。Kobayashi らは、マウスを通常飼料（鉄含有量 約 310 ppm）と低鉄飼料（鉄含有量 約 3.6 ppm）で 7 週間給餌し、鉄欠乏性貧血となる指標を示している。彼らによると、低鉄飼料給餌マウスにおいて血清中铁量が約 50  $\mu\text{g}/\text{dL}$  以下となると、鉄欠乏を誘発することが可能となることを示している（Kobayashi *et al.*, 2016）。本章においても、低鉄飼料給餌の割合と期間を決定する実験から、100%LFD を 3 週間給餌することにより初めて LFD マウスの血清鉄量が以前から報告のある鉄欠乏モデルマウスの 50  $\mu\text{g}/\text{dL}$  を下回ることを示すことができた（ $34.65 \pm 7.48 \mu\text{g}/\text{dL}$ ）。したがって、100%LFD を 3 週間給餌という低鉄飼料割合と給餌期間は、雌マウスにおいて鉄欠乏を誘導するために十分な期間であると考えられた。

この LFD マウスは、鉄欠乏により発情周期が発情休止期から発情期へ進行できず、ほとんどの卵胞発育が前胞状卵胞までで停止していた。さらに、わずかに得られた LFD マウスの排卵卵子も、受精率、発生率が低く、鉄欠乏により卵子の質も低下していた。加えて、通常飼料で飼育した雄マウスとの 1 ヶ月の交配により産仔は得られず、不妊となることが明らかになった。鉄欠乏における不妊の原因は、卵胞発育不全あると考えられたことから、どこの段階に影響するのかを調べた結果、卵胞発育マーカーの遺伝子発現（*Fshr*, *Cyp19a1*, *Ccnd2*）および E2 量が低下することが明らかになった。2003 年に Balla らにより、*Fshr* ノックアウトマウスでは、*CCND2* 発現および E2 量が減少し、胞状卵胞移行への卵胞発育不全となり、不妊となることが既に示されているが、彼らの結果は、本章のそれらと酷似した結果となっている。これに加え、顆粒膜細胞特異的に鉄欠乏を誘導した *Tfr1* cKO マウスを用いた解析においても、*Fshr* 発現の低下を認めている（未発表データ）。これらのことから、卵胞発育期において鉄は、顆粒膜細胞の FSHR 形成を促進する因子であり、この結果、正常な卵胞発育とそれ以降の排卵と卵成熟が担保されると考えられた。

本章において、鉄欠乏モデルマウスの顆粒膜細胞では、*Fshr* の発現低下が不妊の原因であることを示すことができた。この卵胞発育初期の *Fshr* の発現は、アクチビンにより誘導されることが Tano らにより報告されている（1997）。アクチビンは、その受容体を介して SMAD2/3 を活性化し、SMAD4 とヘテロ二量体を形成し、この二量体が遺伝子のプロモーター領域に結合し遺伝子発現を誘導する（Abarca-Buis *et al.*, 2021）。近年、鉄は、2-オキシグルタル酸と共に、プロモーター領域のメチル基を除去する脱メチル化酵素の活性化に必要であることが報告されている（Matuleviciute *et al.*, 2021）。鉄欠乏モデルマウスにおいて認められた FSHR の発現低下の原因は、アクチビンが作用できないからなのか、それとも FSHR

のプロモーター領域にメチル基が存在して転写できないからなのかについては本研究では明らかにすることができなかった。したがって、鉄欠乏誘導性 FSHR 形成不全のメカニズムが上記 2 つの要因にあるのかどうかを明らかにする必要がある。

鉄欠乏の雌マウスにおいて認められた妊孕性の低下は、eCG による卵胞発育誘導においても若干の回復しか認められなかったが、3 週間の鉄の補給により十全に回復することが明らかとなった。現在、不妊症の治療プログラムには、FSH 製剤を投与する治療が一般的に適応されるが、本研究結果は、鉄欠乏が原因で不妊症となっている場合には、この治療をしても改善の望みが低いことを強く示唆している。したがって、鉄欠乏が原因の不妊であることを確かめる過程の確立と、その治療としての鉄剤の補給を行うことで不妊症が改善可能かを調べる必要がある。

以上のことから、鉄欠乏のマウスでは、FSHR の発現および E2 が低下する結果、卵胞発育、卵成熟、排卵、胚発生が著しく低下し不妊になることを明らかとした。さらに、鉄欠乏が原因の不妊は、鉄を補給することにより回復可能であることが示唆された。これらにより、鉄は FSHR の発現を担保する結果、E2 産生を亢進させ、卵胞発育、排卵、その後の胚発生を誘導する必須因子であることを初めて見出した。

Table 1. 逆転写およびPCRに用いたプライマーの塩基配列、アニーリング温度、プロダクトサイズおよびアクセッションナンバー

mRNA	Oligo	Sequence	Tm (°C)	Product size (bp)	Accession No.
<i>Rpl19</i>	FWD	ctgaaggtcaagggaatgtg	60	196	BC058135.1
	REV	ggacacagcttctgatgatctc	60		
<i>Fshr</i>	FWD	cccaacctggcttagaaaa	60	229	NM_013523.3
	REV	gatcccaggctgagtcata	60		
<i>Cyp19a1</i>	FWD	cttcagcctttggcttg	60	192	NM_007810
	REV	attccacaaggcctgtc	60		
<i>Ccnd2</i>	FWD	ctgagtctggttgctga	60	239	NM_009829.3
	REV	acaccgagaccacagaaac	60		

Table 2. 通常飼料(ND)および低鉄飼料(LFD)の成分表

A NDおよびLFD100 gあたりの成分表

	Normal diet (ND)	Low Fe diet (LFD)
Cornstarch (g)	62.435378	62.625378
Casein of milk (g)	22.0	22.0
Purified soybean oil (g)	4.0	4.0
Microcrystalline cellulose (g)	5.0	5.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mg)	1730	1730
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (mg)	1500	1500
CaCO <sub>3</sub> (mg)	1355.4	1355.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (mg)	800	800
NaCl (mg)	600	600
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·nH <sub>2</sub> O (mg)	190	-
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (mg)	15.4	15.4
2ZnCO <sub>3</sub> ·3Zn(OH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (mg)	6	6
Ca(IO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (mg)	1.54	1.54
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (mg)	1.26	1.26
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (mg)	0.4	0.4
Choline chloride (mg)	300.000	300.000
Vitamin E (50%) (mg)	20.000	20.000
Inositol (mg)	15.000	15.000
PABA (mg)	10.150	10.150
Nicotinic acid (mg)	10.150	10.150
Vitamin B12 (2%) (mg)	0.250	0.250
D-Pantothenic acid calcium (mg)	2.000	2.000
Vitamin A (1 million IU/g) (mg)	1.200	1.200
Vitamin D3 (500,000 IU/g) (mg)	0.480	0.480
Vitamin B2 (mg)	1.872	1.872
Vitamin B1 (mg)	1.500	1.500
Vitamin B6 (mg)	1.020	1.020
Biotin (2%) (mg)	0.500	0.500
Vitamin K3 (mg)	0.300	0.300
Folic acid (mg)	0.200	0.200
Total amount (g)	100	100

B NDおよびLFD100 gあたりの鉄量

Fe contained ingredient	Normal diet (ND)		Low Fe diet (LFD)	
	mg/100g of laboratory chow	Total Fe content rate (%)	mg/100g of laboratory chow	Total Fe content rate (%)
Casein of milk	4.092	0.004092	4.092	0.004092
Cornstarch	1.873	0.001873	1.879	0.001879
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·5H <sub>2</sub> O	31.673	0.031673		0.000000
SUM	37.638	0.037638	5.971	0.005971

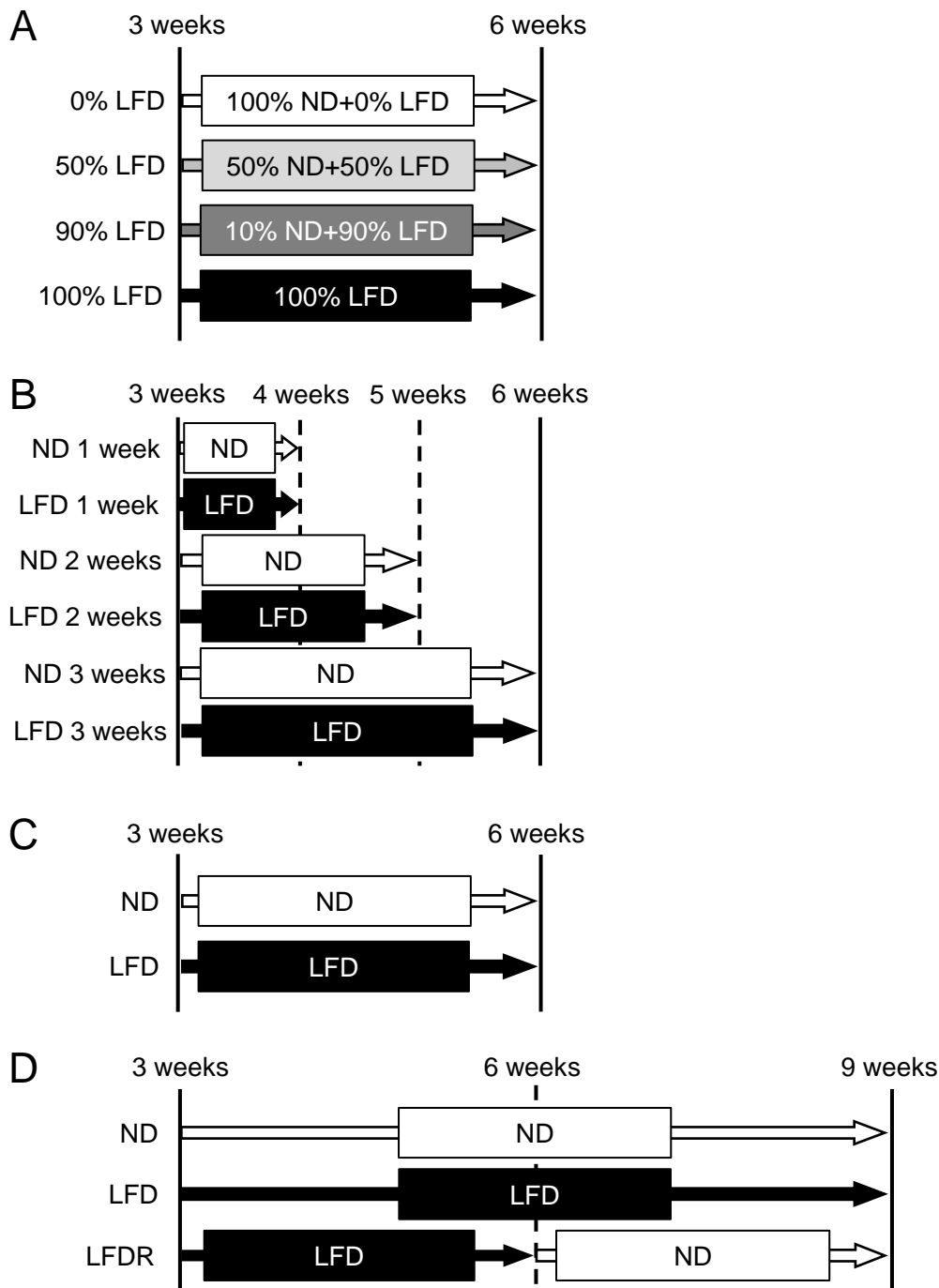


Fig 1. ND, LFD, LFDRマウス作製の飼料給餌の模式図

3週齢のマウスを用いて、以下のA~Dの飼料給餌を行った

A) 0% LFD; 通常飼料(ND)を3週間給餌

50% LFD; NDと低鉄飼料(LFD)を1 : 1の割合で混合した飼料を3週間給餌

90% LFD; NDとLFDを1 : 9の割合で混合した飼料を3週間給餌

100% LFD; LFDを3週間給餌

B) LFD 1 week; LFDを1週間給餌, LFD 2 weeks; LFDを2週間給餌, LFD 3 weeks; LFDを3週間給餌

C) ND; NDを3週間給餌, LFD; LFDを3週間給餌

D) ND; NDを6週間給餌, LFD; LFDを6週間給餌, LFDR; LFDを3週間給餌した後に、さらにNDを3週間給餌

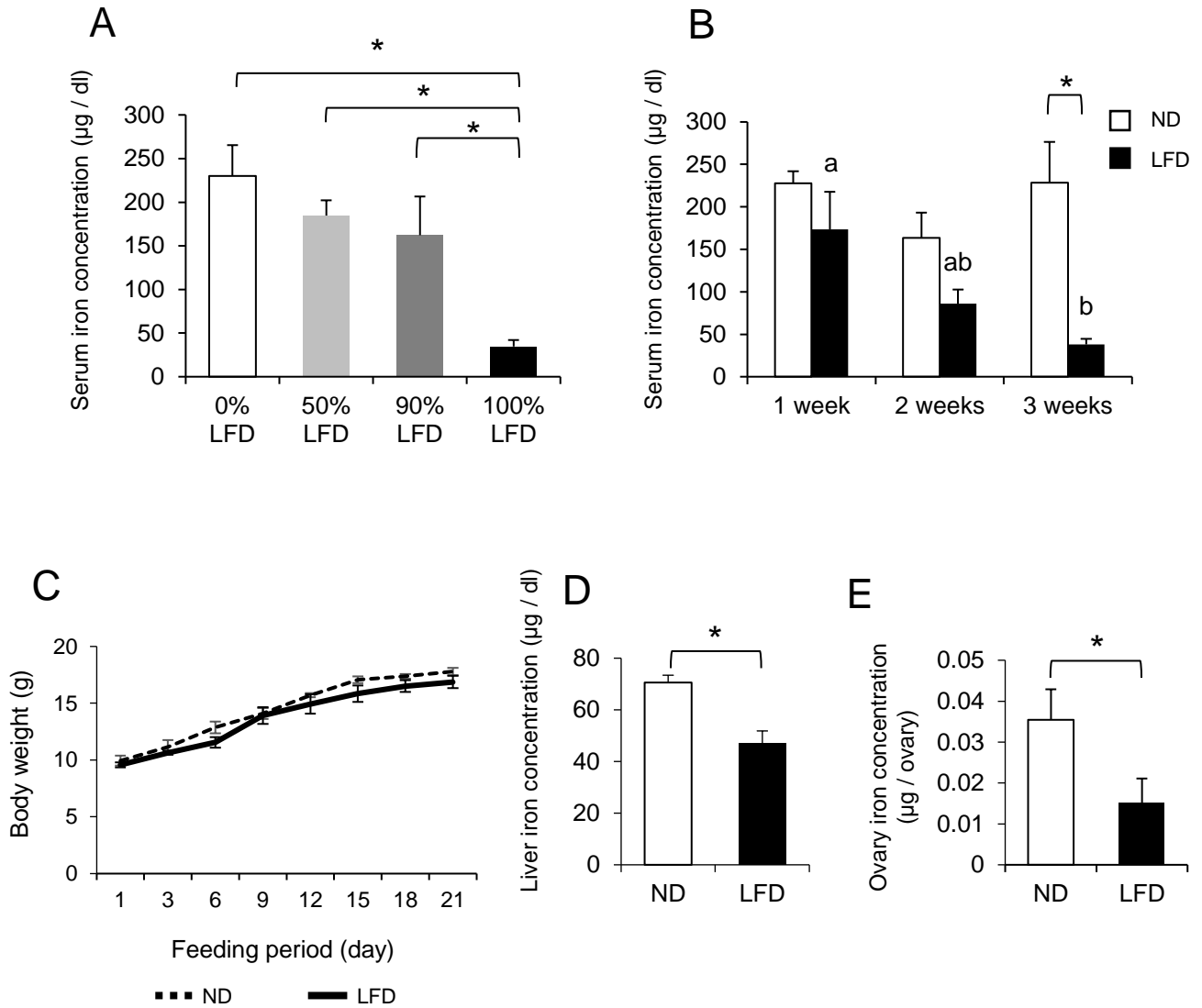


Fig 2. 低鉄飼料(LFD)給餌がマウスの血清，肝臓，卵巣に含まれる鉄量および体重変化に及ぼす影響

3週齢のマウスを用いて以下のAおよびBの飼料給餌を行った

A) 種々のLFD給餌割合でマウスを3週間飼育したときの血清鉄量

0% LFD; 通常飼料(ND)を3週間給餌

50% LFD; NDとLFDを1：1の割合で混合した飼料を3週間給餌

90% LFD; NDとLFDを1：9の割合で混合した飼料を3週間給餌

100% LFD; LFDを3週間給餌

B) 1週間，2週間あるいは3週間NDまたはLFDでマウスを飼育したときの血清鉄量

1 week; NDあるいはLFDを1週間給餌， 2 weeks; NDあるいはLFDを2週間給餌， 3 weeks; NDあるいはLFDを3週間給餌

C) NDあるいはLFDを3週間給餌したときの体重変化

D) NDあるいはLFDを3週間給餌したときの肝臓鉄量

E) NDあるいはLFDを3週間給餌したときの卵巣鉄量

\*: NDとLFD間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

a, b: 異符号間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

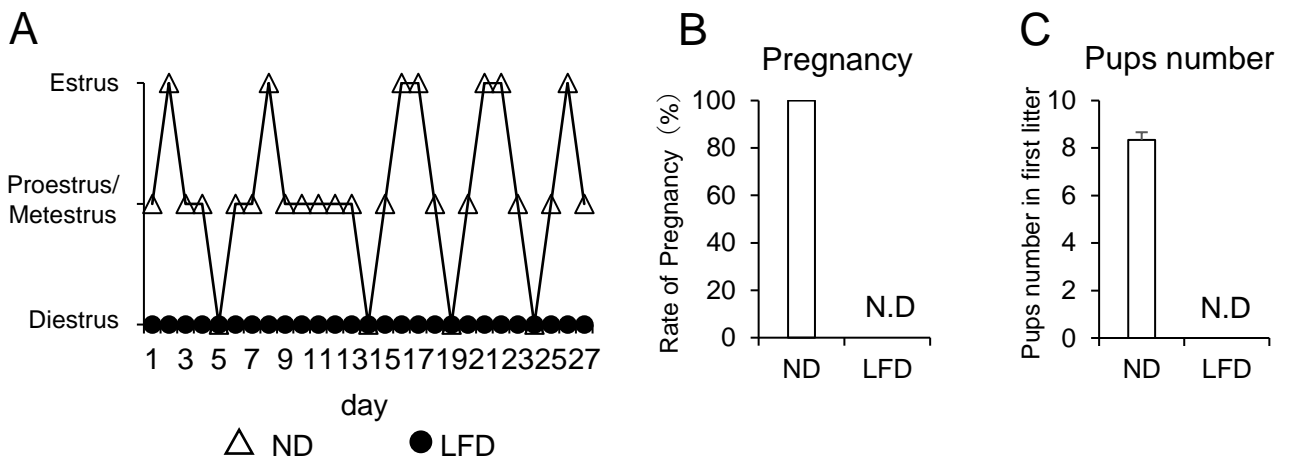


Fig. 3. 鉄欠乏が性周期および妊孕性に与える影響

ND; 3週齢のマウスに通常飼料を3週間給餌

LFD; 3週齢のマウスに低鉄飼料を3週間給餌

A) 飼料給餌後のNDおよびLFDマウスの経時的な性周期変化

B) 通常飼料で飼育した雄マウスとの1ヶ月の交配試験の後に妊娠に至ったNDおよびLFD雌マウスの割合

C) 交配試験により産まれた産仔の数

N.D: Not detected

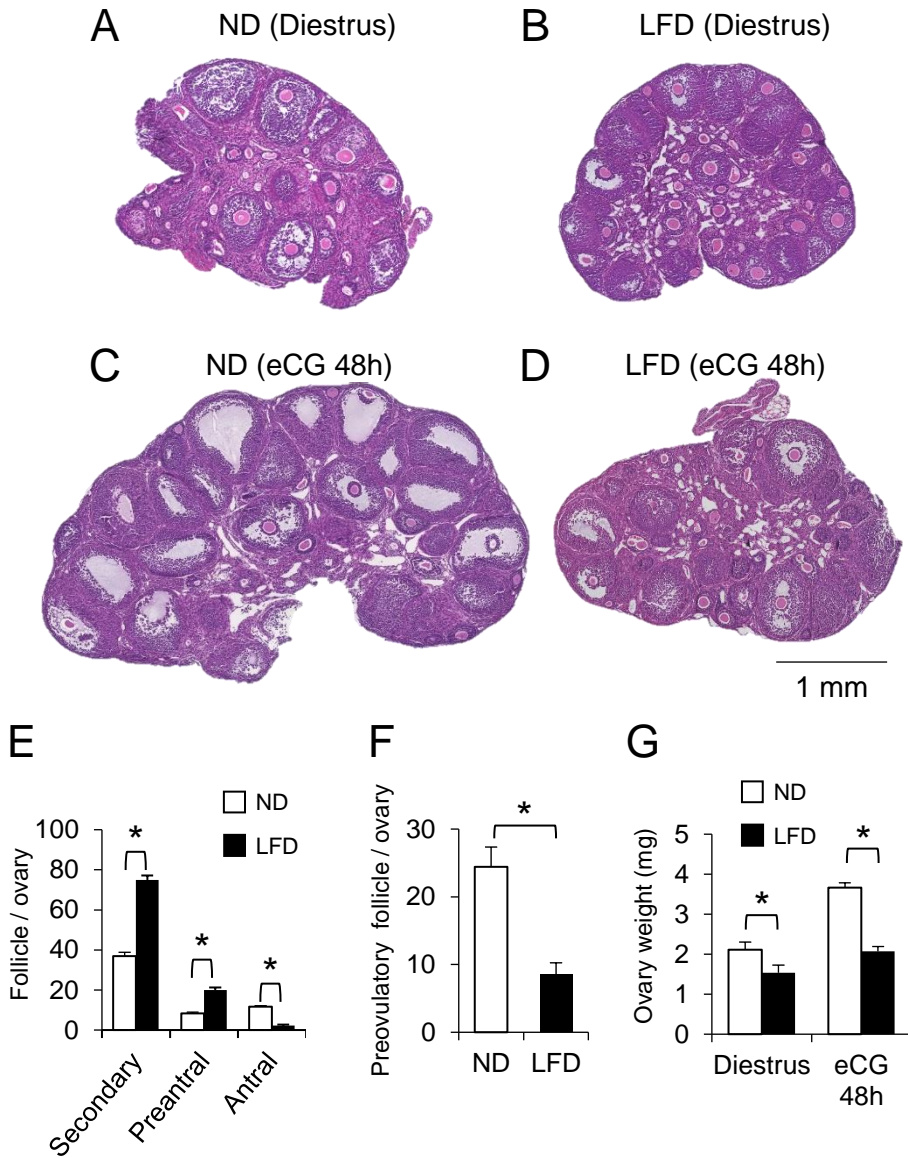


Fig 4. 鉄欠乏が胞状卵胞数および卵巣重量へ与える影響

ND; 3週齢のマウスに通常飼料を3週間給餌

LFD; 3週齢のマウスに低鉄飼料を3週間給餌

A) 発情休止期のNDマウス由来の卵巣切片のHE染色像

B) 発情休止期のLFDマウス由来の卵巣切片のHE染色像

C) eCG刺激48時間後のNDマウス由来の卵巣切片のHE染色像

D) eCG刺激48時間後のLFDマウス由来の卵巣切片のHE染色像

E) 発情休止期のNDおよびLFDマウス卵巣における二次卵胞，前胞状卵胞，初期胞状卵胞数

F) eCG刺激48時間後のNDおよびLFDマウス卵巣における後期胞状卵胞数

G) 発情休止期またはeCG刺激48時間後のNDおよびLFDマウス由来の卵巣の重量

\*: NDとLFD間に有意差あり (p<0.05)



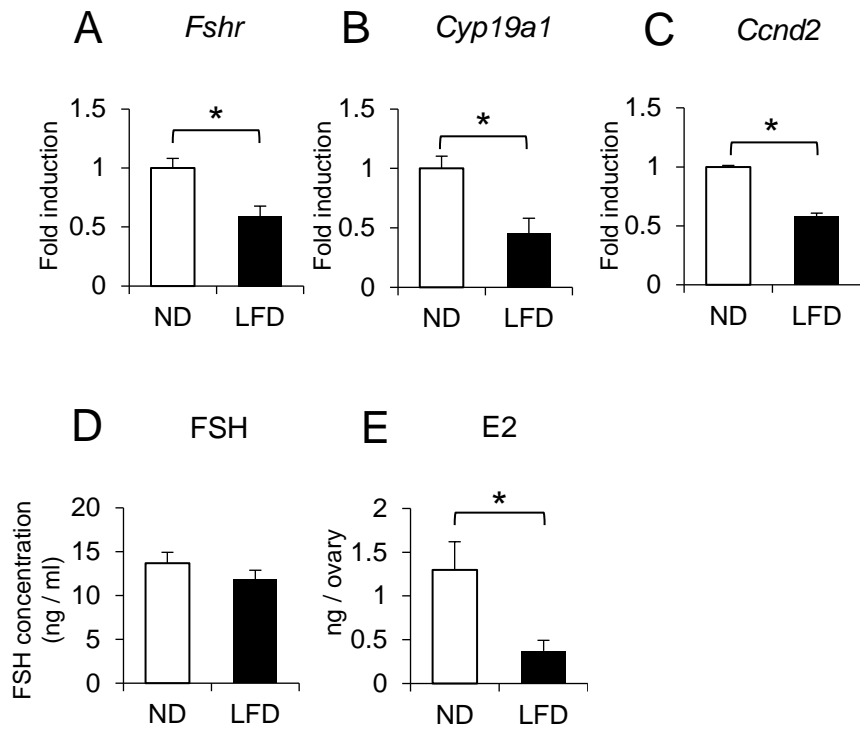


Fig. 5. 鉄欠乏が卵胞発育マーカーへ与える影響

ND; 3週齢のマウスに通常飼料を3週間給餌

LFD; 3週齢のマウスに低鉄飼料を3週間給餌

A, B) 発情休止期のマウス卵巣における*Fshr* (A) および*Cyp19a1* (B) の遺伝子発現

C) eCG刺激48時間後の卵巣における*Ccnd2*の遺伝子発現

D) 発情休止期における血清中のFSH濃度

E) eCG刺激48時間後の卵巣中のE2量

\*: NDとLFD間に有意差あり (p<0.05)

遺伝子発現のデータはNDの相対値で表した

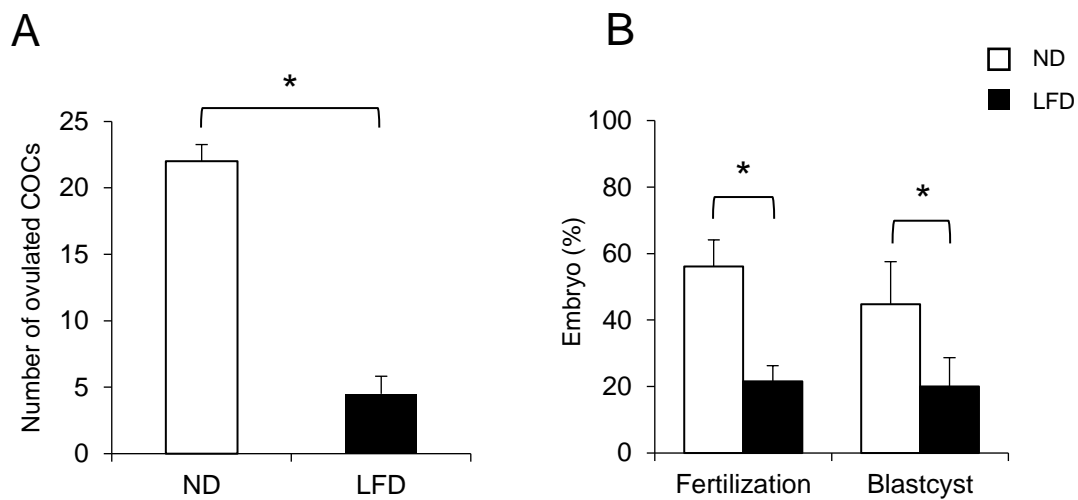


Fig 6. 鉄欠乏が排卵卵子数および排卵卵子の受精率，発生率へ与える影響

ND; 3週齢のマウスに通常飼料を3週間給餌

LFD; 3週齢のマウスに低鉄飼料を3週間給餌

(A) eCG刺激48時間後，hCGを投与し16時間後の卵管膨大部の排卵卵子数

(B) 排卵卵子の受精率および胚盤胞への発生率

\*: NDとLFD間に有意差あり (p<0.05)

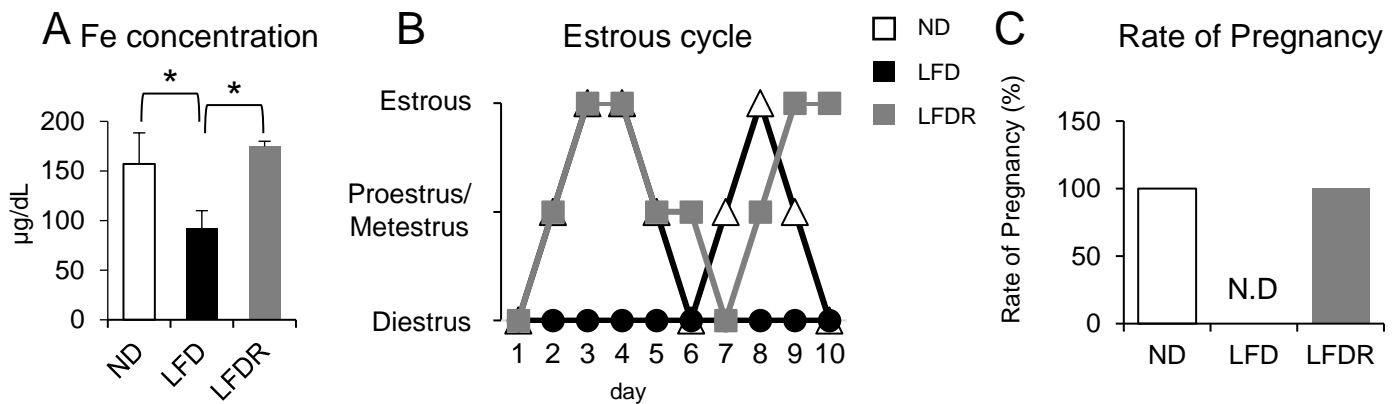


Fig 7. LFDマウスに3週間通常飼料給餌を給餌したときの血清鉄量および性周期変化

ND; 3週齢のマウスに通常飼料を6週間給餌

LFD; 3週齢のマウスに低鉄飼料を6週間給餌

LFDR; 3週齢のマウスに低鉄飼料を3週間給餌後、通常飼料を3週間給餌

A) 発情休止期のND, LFDおよびLFDRマウスの血清鉄量

B) ND, LFDおよびLFDRマウスの経時的な性周期変化

C) 通常飼料で給餌した雄マウスとの1ヶ月の交配試験の後に妊娠に至ったND, LFDおよびLFDR雌マウスの割合

\*: 処理区間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

N.D: Not detected

### 第三章

#### 序論

第二章の結果から、鉄欠乏は *Fshr* mRNA の発現を減少させ、エストロゲン (E2) 産生や卵胞発育へ影響を与え、以降の排卵、受精、発生において負の影響を及ぼしたことから、雌性生殖機能において鉄は卵胞発育、卵成熟やホルモン合成に重要であることが明らかとなった。雌雄の生殖腺は、発生学上同一の生殖腺原基から分化して形成されるため様々な類似性が見られる。その一例としてそれぞれ視床下部-下垂体軸に支配され、生殖細胞が性ホルモンを分泌すること、あるいは生殖細胞において体細胞分裂および減数分裂が促進されることなどが挙げられ、それらの本質的な鉄への応答性は類似すると考えられる。さらに、精巣中には肝臓中の約 6 倍もの鉄が蓄積されていること、鉄欠乏を生じたラットにおける血清中テストステロンの著しい低下が報告されていることから (Akazawa, 2007)、雄においても鉄は精子形成やホルモン合成などを誘導している可能性が高い。しかし、鉄が雄性生殖に及ぼす影響についてほとんど分かっておらず、詳細に解析する必要がある。

雄性生殖において重要である精子形成の段階は、精祖細胞の分化、増殖期、精母細胞から精子細胞へ変化する減数分裂期、精子細胞から精子へと形態が変化する精子完成の 3 段階存在する。この精子形成段階には、精子の元となる生殖細胞、精細管内で精子形成をサポートするセルトリ細胞、精細管の間質に存在するライディッヒ細胞の主に 3 種類の細胞が相互作用することが重要である。精子形成の第一段階である精祖細胞の分化、増殖期において精粗幹細胞は、FSH の刺激を受けたセルトリ細胞により増殖および精祖細胞への分化が誘導される (Tadokoro *et al.*, 2002)。その後、第二段階の減数分裂期において、精祖細胞は精母細胞、精子細胞へ分化する。特に、精母細胞から精子細胞への減数分裂にはライディッヒ細胞が重要となる。ライディッヒ細胞には、テストステロン産生能を持たない未熟な幼若ライディッヒ細胞とテストステロン産生能を獲得した成獣ライディッヒ細胞が存在する。幼若ライディッヒ細胞の出現は、セルトリ細胞により誘導される (Yao *et al.*, 2002)。性成熟前の幼若ライディッヒ細胞は、HSD11B のコルチゾール産生により LH の感受性を増加させる (Ge *et al.*, 1997, Engel and Frowein, 1974)。性成熟を迎えると下垂体から分泌される LH は、成獣ライディッヒ細胞の LH 受容体 (LHCGR) に作用し *Cyp17a1* や *Hsd17b3* などのテストステロン合成酵素の発現を誘導する (Laurich *et al.*, 2002, Baker *et al.*, 1997)。その後、成獣ライディッヒ細胞から産生されるテストステロンは精母細胞のアンドロゲン受容体 (Androgen receptor; AR) に作用し、精母細胞の減数分裂を誘導し精子細胞へと変化させる (Wang *et al.*, 2009)。第三段階の精子完成において精子細胞は、先体、ミトコンドリア鞘、尾部を形成し精子へと変態する。完成した精子は、精細管内から精巣上体へと運ばれ、精巣上体尾部に一度蓄積され受精能および運動能を獲得する。その後、腔内へと射精された精子は、子宮、卵管へと進み、排卵された卵子のいる卵管膨大部へ達する。そこで精子は、超活性化 (ハイパーアクチベーション) という激しい鞭毛運動を行うことで卵子を覆う卵丘細胞

の間を進み卵子へと到達することで受精する。

精子形成において精祖細胞の分化増殖期には生殖細胞とセルトリ細胞，減数分裂期にはセルトリ細胞とライディッチ細胞，ライディッチ細胞と生殖細胞間の相互作用が重要である。実際に，セルトリ細胞に重要な FSHR，ライディッチ細胞に重要な LHCGR，生殖細胞特異的 AR ノックアウトマウスにおいて精子形成が抑制され妊孕性が低下することが報告されていることから (Siegel *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2001, Wnag *et al.*, 2009)，この3種の細胞のいずれかが機能不全になると精子形成に深刻な影響を与えることが示唆される。これまでに，鉄欠乏患者において精子数の減少，妊孕性の低下が報告されているが，この鉄欠乏患者には鉄欠乏以外の疾患を持つ患者も含まれる報告である点や，精子数の現象が精子形成のどの段階で影響を受けているのか，あるいはライディッチ細胞，セルトリ細胞，生殖細胞のどの細胞群に影響を及ぼした結果であるのかなど，その詳細は全く明らかにされていない。

そこで本章では，鉄の雄性生殖機能への影響を検討する目的で，鉄含有率が 0.001%未満の低鉄飼料で飼育した鉄欠乏モデル (Low Fe diet; LFD) マウスを作製し，通常飼料で飼育した (Normal diet; ND) マウスと比較解析を行った。また，鉄欠乏により認められる生殖機能不全が，鉄の給餌により回復可能か調べるために，鉄欠乏モデルマウスに3週間通常飼料を給餌し，鉄欠乏回復 (LFD Rescue; LFDR) マウスを作出し，ND および LFD マウスとの比較解析を行った。はじめに低鉄飼料給餌により鉄欠乏を誘導する飼料中の鉄含有量と給餌期間を検討した。鉄欠乏を誘導する鉄含有量および給餌期間を決定したマウスを用いて，体重，臓器重量，性行動，妊娠率，産仔数を調べ生殖組織への影響を検討した。さらに，ND および LFD から得られた精巣上体精子の数，運動性，ATP 量，奇形率，受精率を調べた。精子形成への影響を詳細に解析するために，各生殖細胞の数および増殖細胞割合を調べた。また，ライディッチ細胞の数，増殖細胞割合，テストステロン産生に重要なマーカーおよび分化マーカーを調べた。最後に，鉄欠乏による影響が鉄の給餌により回復可能であるか LFDR マウスを用いて調べた。

### 第三章 材料および方法

マウスの維持，低鉄飼料給餌（Low Fe diet; LFD）マウスの作製，試薬の調整，血清の回収，鉄濃度測定，Total RNA 抽出，Quantitative RT-PCR および統計処理は，第二章と同様の方法で行った。

#### 組織の回収

6 週齢または 9 週齢の雄マウスにイソフルランによる吸入麻酔下で頸椎脱臼後，解剖により心臓，肝臓，腎臓，脾臓，精巣上体，精囊，精巣を回収した。取り出した各組織は，重量を測定した。重量測定後の精巣は，実験に用いるまでの間， $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

#### 体重測定

通常飼料給餌（Normal diet; ND）マウスおよび LFD マウスを，それぞれ 3 週齢で離乳後の飼料給餌開始日から 33 日までの体重を測定した。

#### ヘマトクリット値測定

ND および LFD マウスから回収した全血は血液凝固剤を加えたスクリーキャップチューブに添加し，氷上で保存した。pocH-100iV（Sysmex Corporation, Japan）を用いてヘマトクリット値の測定を行った。

#### 精巣組織切片の作製

ND および LFD マウスから回収した精巣を用いて組織切片を以下の手順で作製した。回収した精巣は，ブアン溶液（Sigma Aldrich）に浸し 5 時間振盪し組織を固定した。固定された精巣を，100%エタノール（Nacalai tesque）を超純水で希釈した 70%エタノールに浸漬し 1 時間の振盪を行い，固定液を洗浄後，再び 70%エタノールに浸漬し， $4^{\circ}\text{C}$ で一晩十分に洗浄した。一晩の浸漬後，100%エタノール（Nacalai tesque）を超純水で希釈した 80%，90%，95%エタノールを作製し，洗浄後の精巣を 80%から 95%まで順に各溶液でそれぞれ 1 時間振盪した。95%エタノールの振盪後，100%エタノールで 15 分間の振盪を 3 回繰り返し精巣組織の脱水を完了した。脱水後の精巣をキシレン（Fujifilm wako）で 30 分間の振盪を 2 回行った。さらに， $60^{\circ}\text{C}$  で保温したキシレンに 30 分間浸した。キシレンを拭き取り  $60^{\circ}\text{C}$  で保温したティッシュテックパラフィン（Sakura）に 30 分間の浸漬を 3 回繰り返した。 $60^{\circ}\text{C}$  で保温した新たなティッシュバックパラフィンに浸漬し，氷上に静置し包埋した。固まったパラフィンブロックを木台へ固定し，滑走式ミクロトームで  $4\ \mu\text{m}$  の厚さの精巣組織切片を作製し， $37^{\circ}\text{C}$  の温水に浮かべた。切片を MAS 塗布スライドガラス（Matsunami Glass Ind., Ltd.）に乗せ，乾燥させた。

### PAS (Periodic Acid Schiff; 過ヨウ素酸シッフ) 染色

PAS 染色には、PAS staining kit for detection of aldehyde and mucosubstances (Merk, Hessen, Germany) を用いた。前項で作製した精巣組織切片をキシレンへの1分間の浸漬を2回行い脱パラフィンした。脱パラフィンを行った組織切片を100%, 90%, 80%エタノールの順で1分間浸し親水化した。蒸留水による洗浄後、十分に水気を取り除き過ヨウ素酸水溶液に30分間浸した。30分後、蒸留水により洗浄し、十分に水気を取り除きシッフ試薬に1時間浸した。1時間後、100 mlの超純水に6 mlの10%重亜硫酸ナトリウム (Fujifilm wako) と5 mlの1 N HCl (Fujifilm wako) を溶解し作製した亜硫酸水へ5分間の浸漬を2回行った。亜硫酸水への浸漬後、流水に10分間浸し洗浄した。十分に水気を取り除きヘマトキシリン液に4秒間浸した。流水で5分間水洗後、スライドガラスを80%エタノール、90%エタノール、100%エタノールの順で浸漬し脱水した。その後キシレンに浸し1分間静置した後、さらに新しいキシレンに1分間静置した。封入剤を用い、スライドガラス上の精巣組織にカバーガラスを乗せ封入した。正立顕微鏡下で精細管内の精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞、伸長精子細胞数およびセルトリ細胞数をカウントし、生殖細胞数を算出した。この際、精細管あたりのセルトリ細胞を内部標準とした。

### 免疫蛍光染色

前述の通り作製した精巣組織切片を用い、PAS 染色の項で行ったように脱パラフィンおよび親水化を行った。その後 PBS (-) に浸し洗浄した。スライドガラスの余分な水滴を除去した後、精巣組織切片の周りを LIQUID BLOCKER SUPER PAP PEN (Daido sangyo, Saitama, Japan) で囲った。そこへ0.5% Triton X-100/PBS (-) を滴下し、室温で30分間膜透過処理を行った。PBS (-) で3回洗浄後、スライドガラスの余分な水滴を除去し、5% BSA (Sigma Aldrich) /PBS (-) を滴下し、室温で90分間ブロッキングを行った。ブロッキング液を除去した後、一次抗体を滴下し、室温で4時間一次抗体反応を行った。PBS (-) で3回洗浄後、スライドガラスの余分な水滴を除去し、二次抗体 [Anti-Mouse IgG (whole molecule) F (ab')<sub>2</sub> Fragment-Cy3 antibody produced in sheep (Sigma Aldrich) :5% BSA/PBS (-) =1:100] を滴下し、遮光し室温で2時間二次抗体反応を行った。二次抗体反応後、PBS (-) で3回洗浄しスライドガラスの余分な水滴を除去した後、DAPI (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, Inc., CA, USA) で核を染色した。その後、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) で撮影した (Cy3 波長: 570 nm, DAPI 波長: 455 nm)。PCNA, HSD11B, CYP17A1, HSD17B3 の一次抗体の Cat No.および希釈倍率は Table 2 に記した。

DAPI 陽性細胞を基に、既報に従い (Umehara *et al.*, 2016), Cy3 および DAPI の二重陽性細胞を精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞および伸長精子細胞ごとにカウントした。精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞および伸長精子細胞数は、精細管あたりのセルトリ細胞数を内部標準として算出した。また、ライディッヒ細胞の Cy3 陽性細胞割合は、精巣面積当たり

の Cy3 面積として算出した。

#### 精巣におけるテストステロン濃度測定

テストステロン濃度測定は Testosterone EIA kit (Cayman Chemical Co., MI, USA) を用いて測定した。サンプルは ND および LFD の精巣を第二章のステロイドホルモンの抽出方法により固相化したステロイド成分を 50%メタノール (Nacalai tesque) (超純水にメタノールを溶解) を添加し、再溶解して使用した。Testosterone EIA kit によるテストステロン測定は以下の手順で行った。Micro Well Plate (AS ONE, Osaka, Japan) に Standard, Blank, Non-Specific Binding およびサンプルを各 50  $\mu$ l ずつ添加し 1 時間振盪した。ウェル内にある溶液を廃棄した後、Wash Buffer を 300  $\mu$ l 添加し洗浄した後に廃棄した。この手順を 5 回繰り返した。洗浄後、すべてのウェルに Ellman's Reagent を 150  $\mu$ l 添加し、遮光を行い 2 時間振盪した。Blank を対照とし、Microplate Reader (Bio-Rad) で吸光度 (波長: 405 nm) を測定した。Standard より標準曲線を作製し、テストステロン濃度を算出した。

#### 精子濃度測定

3 匹の ND および 3 匹の LFD から解剖により精巣上体を摘出し PBS を 2 ml 入れた 50 mm プラスチックシャーレ (AS ONE) に入れた。実体顕微鏡 (OLYMPUS, SZ-ST) 下で 25 G 注射針をつけた注射筒を用いて、精巣上体精子をはじき出した。はじき出した精子は、マイクロチューブ (Eppendorf, 3810X, DEU) へ微量分注器 (Gilson Scientific, Luton, UK) を用いて 1.5 ml 移し、500 g で 5 分間遠心分離した。上清を取り除き新たな PBS を 500  $\mu$ l 入れ再懸濁し、血球計算盤を用い精子数を計測した。使用しなかった精子は -80°C で凍結保存した。

#### 精子における ATP 濃度測定

ATP 濃度測定は、『細胞の』ATP 測定キット™ (TOYO INK Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。サンプルは前項で凍結保存した精子を破碎し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、ATP の溶出した上清のみを用いた。

『細胞の』ATP 測定キット™ による ATP 測定は以下の手順で行った。

ウェルプレートに Standard, Blank およびサンプルを 100  $\mu$ l 添加した。

すべてのウェルに発光試薬を 100  $\mu$ l 添加した。

Blank を対照とし、ルミノメーターで発光強度を測定した。

Standard より標準曲線を作製し、ATP 濃度を算出した。

前項で得た精子濃度を基に 1 精子あたりの ATP 濃度を算出した。

#### 精子運動解析システム (Computer Assisted Sperm Analysis ; CASA) による精子運動性の解析

精子の運動性評価は、Human tubal fluid (HTF) 培地に使用した。HTF の組成は、超純水 50 ml に、NaCl (Fujifilm wako) 0.2968 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fujifilm wako) 0.0174 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O



(Nacalai tesque) 0.0024 g, NaHCO<sub>3</sub> (Nacalai tesque) 0.105 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Nacalai tesque) 0.0149 g, D (+) -Glucose (Nacalai tesque) 0.025 g, ビルビン酸ナトリウム (Nacalai tesque) 0.0018 g, DL-乳酸ナトリウム (Sigma Aldrich) 171 μl, BSA (Sigma Aldrich) 0.2 g, ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai tesque) 500 μl を混合した。十分に溶解した後に、フェノールレッド (Nacalai tesque) 0.0001 g を混和し、溶液を赤色に呈色させた。

ND および LFD マウスから解剖により精巣上体を摘出し HTF を 2 ml 入れた 50 mm プラスチックシャーレに入れた。実体顕微鏡下で 25 G 注射針をつけた注射筒を用いて、精巣上体精子をはじき出した。はじき出した精子は、マイクロチューブへ微量分注器を用いて 1.5 ml 移し、予め 37°C で保温しておいたマクラチャンバーへ 10 μl 滴下し、CASA (HTCASA-Ceros II ; Hamilton Thorne, MA, USA) により解析を行った。解析項目は、前進運動精子率 (Motility), 良好な運動精子率 (Progress), 不動精子率 (Static) を解析した。

#### 精子奇形率測定

ND および LFD マウスから解剖により精巣上体を摘出し PBS を 2 ml 入れた 50 mm プラスチックシャーレに入れた。実体顕微鏡下で 25 G 注射針をつけた注射筒を用いて、精巣上体精子をはじき出した。はじき出した精子は、マイクロチューブへ微量分注器を用いて 1.5 ml 移し、2,500 g で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、新しい PBS を 1 ml 添加しピペッティングにより十分混和した。MAS 塗布スライドガラスに精子を塗抹し、風乾させた。十分に乾燥させ、100%エタノールで 1 分間固定した後、90%エタノール、80%エタノールの順で浸し親水化を行った。超純水で洗浄し、ヘマトキシリン液に 12 秒浸した後、5 分間流水で水洗した。エオジン液に 45 秒浸した後、5 分間流水で水洗した。PBS に浸した後、スライドガラスを 80%エタノール、90%エタノール、100%エタノールの順で浸した。キシレンに浸し 1 分間静置した後、さらに新しいキシレンに 1 分間静置し脱水を完了させた。封入剤を用い、スライドガラス上の塗抹精子にカバーガラスを乗せ封入した。正立顕微鏡下で視野内の全精子あたりの尾部が脱落しているあるいはヘアピンのような形態を呈した奇形精子を測定した。

#### ハイパーアクチベーション率の測定

精子のハイパーアクチベーション測定には、以下の用量で作成した Procaine TALP-HEPES 培地を使用した。500 ml の超純水に対し、2.89 g NaCl, 0.12 g KCl, 1.05 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.031 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.11 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.15 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.19 g HEPES, 1.79 ml Lactate, 1% (v/v) ペニシリン-ストレプトマイシン, 0.006% (w/v) BSA, 0.0028% (w/v) Procaine を溶解し、Procaine TALP-HEPES 培地とした。

試験前日に 50 mm シャーレに 400 μl の Procaine 無添加 TALP-HEPES 培地 (精子前培養培地) のドロップを作製し、培地の乾燥を防ぐためミネラルオイル (Sigma Aldrich) 8 ml でドロップを覆い、インキュベーター内でガス平衡化した。ND および LFD マウスの精巣上体

尾部から精子を採取し、精子前培養培地内で 60 分間インキュベートした。インキュベート後、ドロップから 10  $\mu$ l 回収し、2 倍の濃度 Procaine を添加した 10  $\mu$ l TALP-HEPES 培地に添加し懸濁した。そこからスライドガラスへ 10  $\mu$ l 滴下しカバーガラスを乗せ正立顕微鏡下で観察した。

### 受精試験

受精培地には HTF 培地を用いた。受精試験前日に HTF 培地を用いて、50 mm シャーレに精子前培養用培地として 400  $\mu$ l、媒精用培地として 200  $\mu$ l のドロップを作製し、培地の乾燥を防ぐためミネラルオイル 8 ml でドロップを覆い、インキュベーター内でガス平衡化した。発生培地には KSOM 培地 (ARK Resource) を用いて、50 mm シャーレに 50  $\mu$ l のドロップを作製し、ミネラルオイル 8 ml でドロップを覆い、インキュベーター内でガス平衡化した。

#### ・精子の前培養

ND および LFD マウスの精巣上部尾部から精子を採取し、精子前培養培地内で 60 分間インキュベートした。

#### ・排卵卵子の回収

3 週齢の未成熟雌マウスに eCG を投与し、48 時間後に hCG を投与した。hCG 投与 16 時間後の卵管膨大部から COC を回収した。回収した COC はパスツールピペットを用いて媒精用ドロップに移した。

#### ・精子カウントおよび受精試験

精子前培養後、ドロップの中程に浮遊した精子のみを回収し、受精試験に用いた。回収した精子懸濁液を血球計算盤の上ののせ、カバーガラスを空気が入らないようにかぶせて、正立顕微鏡で精子数をカウントした。カウントした精子濃度を HTF 培地で  $2 \times 10^5$  sperm/ml に調整し、COC が移してある媒精用ドロップに添加し、6 時間共培養した。培養後、卵に付着している精子をパスツールピペットで除去し KSOM 培地で洗浄後、発生培地のドロップに受精卵を移し、5 日間培養した。また、5 日間の培養の間、発生卵の様子を倒立位相差顕微鏡で観察した。

### 交配試験

ND, LFD および LFDR 雄マウスを用いて通常飼料で飼育した 3 ヶ月齢の雌マウスに対し 1 ヶ月間の交配試験を行い、雌マウスを妊娠させた個体の割合を妊娠率として算出した。

### 性行動解析

ND, LFD および LFDR 雄マウスを用いて通常飼料で飼育した 3 ヶ月齢の雌マウスに対し性行動解析を行った。朝 5 時に ND, LFD および LFDR 雄マウスをそれぞれ雌マウスのケージに入れ、暗視カメラ HDR-UX7 (SONY, Tokyo, Japan) で 1 時間撮影し、乗駕を試みた回数を計測した。

### 第三章

#### 結果

##### 実験 1 低鉄飼料給餌が鉄欠乏を誘導する鉄分割合および期間の決定

低鉄飼料給餌が鉄欠乏状態を引き起こす鉄分割合を調べる目的で、3週齢で離乳したマウスに通常飼料と低鉄飼料を混合した0%、50%、90%、100%LFDを3週間給餌した。この結果、0%、50%、90%のLFD給餌により血清鉄量に差は認められなかったが、これらと比較し、100%のLFD給餌において血清鉄量は有意に低下した (Fig 1A)。離乳後のマウスに通常飼料または低鉄飼料を1、2、3週間給餌し、血清鉄量を比較し、鉄欠乏条件となる期間を検討した。この結果、1週間、2週間100%のLFDを給餌し飼育すると血清鉄量はNDと比較し有意に低下したが、これらの鉄濃度は、鉄欠乏モデルを定義した Kobayashi らの論文の基準値の 50  $\mu\text{g}/\text{dL}$  に比べ高い値であった (1 week:  $80.50 \pm 2.51 \mu\text{g}/\text{dL}$ , 2 week:  $80.50 \pm 22.25 \mu\text{g}/\text{dL}$ ) (Kobayashi et al., 2017)。一方、給餌期間を3週間とすると血清中鉄量は  $38.80 \pm 5.66 \mu\text{g}/\text{dL}$  となり、50  $\mu\text{g}/\text{dL}$  よりも低い値を示した (Fig 1B)。このことから、鉄欠乏状態を誘導する鉄分割合は100%LFDとし、飼料給餌期間は3週間とした。このとき、100%LFDを3週間給餌したマウスにおいてヘマトクリット値もNDマウスと比較して有意に低下し、鉄欠乏性貧血の判断基準である20%以下の  $19.7 \pm 1.32\%$  であった (Fig 1C)。

100%のLFDを33日間給餌したときの体重は、NDマウスとLFDマウスの間に差が認められなかった (Fig 1D)。加えて、心臓、肝臓、腎臓、脾臓などの組織重量はNDマウスとLFDマウスの間に差は認められなかった (Fig 1E)。このとき、肝臓および精巣の鉄量はNDマウスと比較しLFDマウスで有意に低い値を示した (Fig 1F, G)。

##### 実験 2 鉄欠乏条件が雄の生殖器および妊孕性へ及ぼす影響

鉄欠乏が雄の生殖器に及ぼす影響を調べた結果、LFDマウスの精巣、精巣上体、精嚢腺は、NDマウスのそれらと比較し萎縮し (Fig 2A)、これらの重量はLFDマウスで有意に低い値を示した (Fig 2B)。オスの性行動の指標である雌への乗駕回数を測定した結果、NDマウスのそれと比較し ( $32 \pm 9.63$  回)、LFDマウスの乗駕回数 ( $4.5 \pm 2.60$  回) は有意に低い値を示した (Fig 3A)。雄の鉄欠乏が妊孕性に及ぼす影響を調べる目的で、雄のNDマウスあるいはLFDマウスと雌のNDマウスの間で1ヶ月間の交配試験を行った。その結果、雄のNDマウスは全ての雌個体を妊娠させ、産仔を得られたが、雄のLFDマウスでは妊娠に至った雌が認められず、産仔を得られなかった (Fig 3B, C)。

##### 実験 3 鉄欠乏条件が精巣上体精子数、精子のATP濃度および精子の運動性に及ぼす影響

NDマウスおよびLFDマウスの精巣上体精子数を調べた結果、NDマウスの精子濃度は  $3.34 \times 10^7 \pm 0.73 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$  であったが、LFDでは  $1.45 \times 10^7 \pm 0.26 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$  と有意に低い値を示した (Fig 4A)。またATP濃度を調べた結果、NDマウスでは  $247 \pm 96.3 \text{ zM}/\text{sperm}$  で

あったが、LFD では  $9.5 \pm 5.3$  zM/sperm と有意に低い値を示した (Fig 4B)。ND マウスおよび LFD マウスの精巣上体精子の運動性を CASA により解析した結果、ND マウスでは運動精子の軌跡は青色で表示される活発な運動をしている精子が多数確認されたが、LFD マウスでは、黄色や赤で示されるほとんど動いていない精子が多数認められた (Fig 4C)。LFD マウスの前進運動精子 (Motility) および良好な運動精子 (Progress) を示す割合は、ND マウスに比べ有意に低い値を示した (Motility: ND;  $57.5 \pm 3.1\%$  vs LFD;  $21.7 \pm 8.6\%$ ) (Progress: ND;  $45.6 \pm 3.2\%$  vs LFD;  $8.3 \pm 0.0\%$ ) (Fig 4D, E)。これに対して、LFD マウスの不動精子 (Static) を示す割合は、ND マウスに比べ有意に高い値を示した (ND;  $42.5 \pm 3.1\%$  vs LFD;  $78.3 \pm 8.6\%$ ) (Fig 4F)。

ND マウスおよび LFD マウスから精子を回収し、スライドに塗抹して精子形態を調べた結果、LFD マウスでは尾部が欠損した異常な精子が多数認められ、その割合が ND マウスと比較し、有意に高い値を示した (ND;  $20.77 \pm 2.34\%$  vs LFD;  $53.19 \pm 0.95\%$ ) (Fig 4G, H)。

ND マウスおよび LFD マウスの精巣上体から精子を回収し、ハイパーアクチベーション率および受精率を計測した結果、LFD マウスのそれらの値は、ND マウスに比べ有意に低い値を示した (ハイパーアクチベーション: ND;  $84.70 \pm 7.13\%$  vs LFD;  $37.66 \pm 6.09\%$ , 受精率: ND;  $69.77 \pm 4.69\%$  vs LFD;  $28.84 \pm 10.83\%$ ) (Fig 4I, J)。

#### 実験 4 鉄欠乏条件が精子形成へ及ぼす影響

鉄欠乏が精子形成に及ぼす影響を調べるため、ND マウスおよび LFD マウスの精細管内を観察した。その結果、ND マウスでは精細管内に多数の生殖細胞が満たされていたのに対し、LFD マウスの精細管では精細管の委縮が認められた (Fig 5A)。そこで、セルトリ細胞数を内部標準として各生殖細胞数を計測したところ、LFD マウスの精祖細胞数は、ND マウスと有意差は認められないものの (ND;  $1.80 \pm 0.24$  spermatogonia/Sertoli cells vs LFD;  $1.60 \pm 0.25$  spermatogonia/Sertoli cells), LFD マウスの精母細胞、円形精子細胞および伸長精子細胞数は、ND マウスと比べて有意に低い値を示した (Spermatocyte/Sertoli cells: ND;  $2.55 \pm 0.30$  vs LFD;  $1.66 \pm 0.16$ , Spermatid/Sertoli cells: ND;  $5.98 \pm 0.59$  vs LFD;  $3.68 \pm 0.46$ , Spermatozoon/Sertoli cells: ND;  $2.74 \pm 0.36$  vs LFD;  $1.70 \pm 0.13$ ) (Fig 5B)。さらに、精細管内における生殖細胞の増殖活性を、抗 PCNA 抗体を用いて検出し、精祖細胞と精母細胞の数を調べた。その結果、LFD マウスの精細管の精祖細胞の DAPI-PCNA の重複陽性細胞 (Double Positive Cells; DPC) 数と ND マウスのそれらは同程度であった (Spermatogonia/Sertoli cells; ND;  $1.60 \pm 0.30$ , LFD;  $1.63 \pm 0.41$ ) (Fig 5C, D, E)。DPC を示す精母細胞数は ND マウスと比べて LFD において有意に低い値を示した (Spermatocyte/Sertoli cells; ND;  $2.51 \pm 0.13$ , LFD;  $1.13 \pm 0.39$ ) (Fig 5E, F)。

#### 実験 5 鉄欠乏条件がライディッヒ細胞機能へ及ぼす影響

鉄欠乏がライディッヒ細胞数に及ぼす影響を調べた結果、LFD マウスのライディッヒ細

胞数は ND マウスのそれらに比べ有意に減少した (ND;  $245 \pm 19$  cells/mm<sup>2</sup> vs LFD;  $146 \pm 11$  cells/mm<sup>2</sup>) (Fig 6A, B)。PCNA 染色により LFD マウスのライディッチ細胞の増殖活性を調べた結果, ND マウスと比較して LFD マウスの増殖活性が有意に低下していた (Fig 6C, D)。さらに, LFD マウスにおけるライディッチ細胞の *Lhcgr* および *Cyp17a1* mRNA 発現は, ND マウスに比べ有意に低下した (Fig 6E, F)。LFD マウスの精巣のテストステロン濃度も ND マウスと比べ有意に低い値を示した (ND;  $12.86 \pm 1.83$  ng/ml vs LFD;  $5.58 \pm 0.53$  ng/ml) (Fig 6H)。

#### 実験 6 鉄欠乏条件がライディッチ細胞の成熟に及ぼす影響

雄のライディッチ細胞は幼若期には HSD11B に陽性を示すテストステロン合成能のない幼若ライディッチ細胞が存在し, 成熟期にはこの一部が CYP17A1 および HSD17B3 に陽性を示す成獣ライディッチ細胞へと分化することが明らかになっている (Shima *et al.*, 2015)。鉄欠乏条件では, 血清中 LH 濃度は変わらないにも関わらず, *Lhcgr* および *Cyp17a1* 発現が低下しテストステロン合成が低下していたことから, 鉄欠乏条件におけるテストステロン合成能の低下はライディッチ細胞の分化が生じないことに起因すると考えられた。そこで, ND マウスおよび LFD マウスの精巣切片を幼若マーカーの HSD11B と成獣マーカーの CYP17A1 および HSD17B3 で蛍光免疫染色し, これらの割合を測定した。この結果, LFD マウスの HSD11B 陽性細胞割合は, ND マウスと比較して約 2 倍増加した (ND;  $0.015 \pm 0.003$ , LFD ;  $0.029 \pm 0.001$ ) (Fig 7A, B)。これに対して, LFD マウスの CYP17A1 陽性細胞割合および HSD17B3 陽性細胞割合は, ND マウスと比較して有意に低い値を示した (CYP17A1: ND;  $0.017 \pm 0.004$  vs LFD;  $9.4 \times 10^{-5} \pm 6.0 \times 10^{-5}$ , HSD17B3: ND;  $0.017 \pm 0.004$  vs LFD;  $0.004 \pm 0.002$ ) (Fig 7C, D, E, F)。

#### 実験 7 鉄欠乏マウスへ通常飼料給餌による鉄の補給が血清鉄量および雄性生殖機能に及ぼす影響

低鉄飼料給餌により生じた鉄欠乏および雄性生殖機能不全が通常飼料へ切り替え鉄を補給したときに回復するか調べる目的で, 低鉄飼料で 3 週間飼育した後, 通常飼料に切り替えさらに 3 週間飼育した LFD Rescue (LFDR) マウスを作出した。それに伴い, ND マウスおよび LFD マウスの給餌期間も, それぞれさらに 3 週間延長した。ND, LFD および LFDR マウスの血清中の鉄量を測定したところ, LFD マウスにおいて認められた血清鉄量の減少は, LFDR マウスにおいて有意に増加し, ND マウスと同程度まで回復した (Fig 8A)。また, 精巣上体精子濃度および Motility においても LFD マウスで認められた低い値が, LFDR マウスにおいて ND マウスと同程度まで回復した (精子濃度: ND;  $1.81 \times 10^7 \pm 0.14 \times 10^7$  vs LFD;  $1.17 \times 10^7 \pm 0.20 \times 10^7$  vs LFDR;  $1.85 \times 10^7 \pm 0.25 \times 10^7$ ) (Motility: ND;  $83.3 \pm 3.3\%$  vs LFD;  $16.3 \pm 5.2\%$  vs LFDR;  $76.0 \pm 2.9\%$ ) (Fig 8B, C)。奇形精子率は, LFD マウスで認められた高い割合が, LFDR マウスにおいて ND マウスと同程度まで減少した (Fig 8D, E)。さらに, ND,

LFD, LFDR 雄マウスと通常飼料給餌により飼育し十分に成熟した ND 雌マウスを用いて性行動および交配試験を行ったところ, LFD マウスにおいて認められた少ない性行動回数は LFDR マウスにおいて有意に増加し, ND マウスと同程度まで回復した (Fig 8F)。交配試験においても LFD マウスはまったく妊娠個体が認められなかったが, LFDR マウスにおいて ND マウスと同様にすべての雌個体を妊娠させた (Fig 8G)。

### 第三章

#### 考察

本研究では、まず低鉄飼料をマウスに給餌し、低鉄飼料の給餌割合と給餌期間の検討を行った。鉄欠乏モデルマウスとして報告した Kobayashi らは (2016)、血清鉄量が  $50 \mu\text{g/dL}$  以下となると鉄欠乏条件となっていることを報告している。また、腸管において鉄吸収を担う *Regnase-1* を腸管特異的にノックアウトしたマウス (*Reg1<sup>-/-</sup>*) では、ヘマトクリット値が 20% を下回り、鉄欠乏を生じることが報告されている (Garg *et al.*, 2015)。本研究においても、100% の LFD を 3 週間給餌すること  $50 \mu\text{g/dL}$  以下となり ( $38.8 \pm 7.3 \mu\text{g/dL}$ )、離乳後 3 週間の鉄の給餌制限によりヘマトクリット値が  $19.7 \pm 1.3\%$  まで低下した。これらの結果から、100% の LFD を 3 週間給餌という低鉄飼料割合と給餌期間は、雄マウスにおいても鉄欠乏を誘導するために必要十分な期間であると考えられた。

作成した LFD マウスは、精母細胞以降の精子形成の減退、精嚢腺などの副生殖腺の萎縮が生じ、完全な雄性不妊を示すことが本研究により初めて明らかになった。さらにこの LFD マウスは、成獣ライディッチ細胞への分化増殖が低下することにより LH に対する感受性が低下し、テストステロンの合成能が著しく低下していた。2001 年、Zhang らは、雄の *Lhcgr* ノックアウト (LuRKO) マウスでは、*Cyp17a1* 発現の著しい低下と血中および精巣中のテストステロンレベルの低下が生じ、未熟な副生殖腺となること、精子形成不全になる結果を得ている。LFD マウスでは *Lhcgr* mRNA 発現が著しく低下していたこと、およびその表現系が LuRKO と同様であることから、鉄欠乏による雄性不妊は、*Lhcgr* 発現の低下が主要因であると考えられた。本研究により、鉄不足は *Lhcgr* の遺伝子発現を低下させることが明らかになったが、同様の結果をライディッチ細胞特異的に鉄欠乏を誘導した *Tfr1cKO* マウスでも認めている。これらの結果は、鉄欠乏モデルマウスでも全身性の鉄不足が精子形成に影響したというよりも、精巣のライディッチ細胞特異的な鉄不足が *Lhcgr* mRNA 発現の低下に直接悪影響を与えていることを示唆している。では、鉄が不足すると、なぜライディッチ細胞の *Lhcgr* mRNA 発現が低下するのであろうか。近年、LHCGR の発現は、雌の顆粒膜細胞においてメチル化脱メチル化による制御を受けることが報告されている (Kawai *et al.*, 2018)。このことは、雄のライディッチ細胞の *Lhcgr* mRNA 発現にも潜在的に脱メチル化されることで遺伝子発現が増加する可能性を示唆している。これに加え、我々は、ライディッチ細胞特異的 *Tfr1KO* マウスでは、ライディッチ細胞において脱メチル化酵素である TET2 の発現が低下していることを認めている (未発表データ)。上記結果から考察すると、ライディッチ細胞において鉄は、脱メチル化を上方制御により *Lhcgr* の遺伝子発現を誘導し、テストステロン合成能を有した成獣ライディッチ細胞の出現に重要な働きをしているものと考えられる。

本章の結果から、鉄欠乏の雄マウスでは *Lhcgr* mRNA 発現の低下によりライディッチ細胞の分化増殖が抑制され、テストステロン産生量が低下する結果、精母細胞以降の精子形成

が障害されることを明らかとした。さらに、鉄欠乏により生じた雄性不妊は、鉄の補給により回復可能であることを明らかとした。これらのことから、鉄は、*Lhcgr* mRNA 発現を誘導する結果、ライディッヒ細胞を分化、増殖させ、テストステロン産生を亢進し、精子形成を誘導する因子であることを初めて明らかにした。



Table 1 Primer sequence and annealing temperatures using quantitative RT-PCR.

mRNA	Oligo	Sequence	Tm (°C)	Product size (bp)	Accession No.
<i>Rpl19</i>	FWD	ctgaaggtaaagggaatgtg	60	196	BC058135.1
	REV	ggacacagtcttgatgatctc			
<i>Fshr</i>	FWD	ccaaccatggcttagaaaa	60	229	NM_013523.3
	REV	gatcccaggctgagtcata			
<i>Ar</i>	FWD	gatctgaggcattgggaaaa	60	152	NM_013476
	REV	cccagtagcaagagcacctc			
<i>Lhcgr</i>	FWD	tctctccaccaaattgcag	60	152	NM_013582.3
	REV	gcagtggttaggttaggtca			
<i>Cyp17a1</i>	FWD	tttggccaagtcaaagac	60	224	NM_007809
	REV	cccttctcacgagcacttc			

Table 2 免疫蛍光染色(IF)に用いた一次抗体情報

Antibodies	Cat No.	Manufacture	Dilution ratio(IF)
PCNA	2568S	Cell signaling TECHNOLOGY	1:100
HSD11B		諸橋教授より提供	1:10000
CYP17A1	LS-C352100	Lifespan Biosciences(LSBio)	1:100
HSD17B3	13415-1-AP	Proteintech Group, Inc.(PGI)	1:100

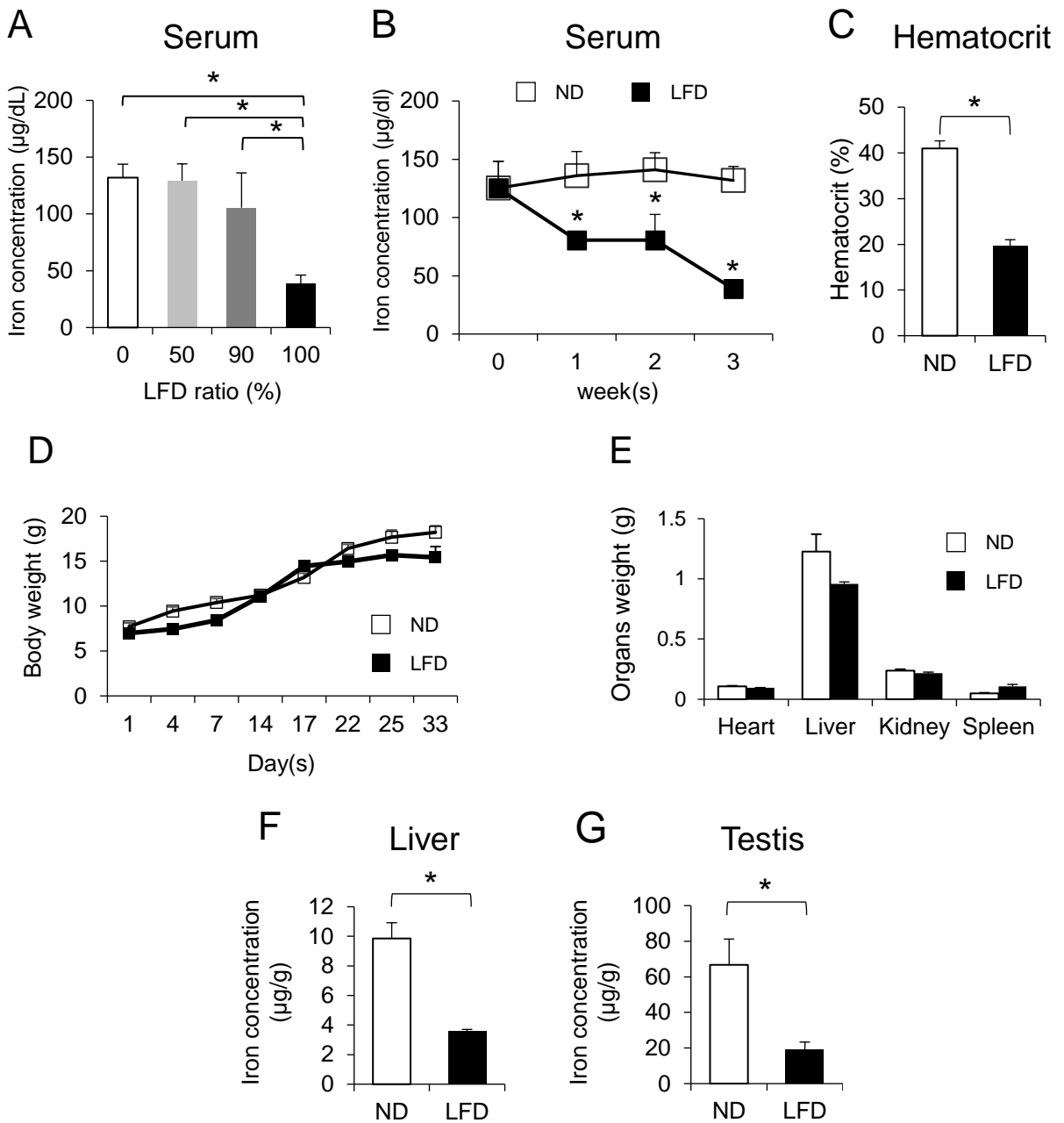


Fig 1 LFD給餌による血清，肝臓，精巣中鉄量，ヘマトクリット値，体重，臓器重量への影響

以下の実験には，3週齢のマウスを用いて飼料給餌を開始した

A) 低鉄飼料給餌割合による血清鉄量の変化

0% LFD; 3週間通常飼料(ND)を給餌

50% LFD; 3週間NDと低鉄飼料(LFD)を1:1で混ぜ合わせた飼料を給餌

90% LFD; 3週間NDとLFDを1:9で混ぜ合わせた飼料を給餌

100% LFD; 3週間LFDを給餌

B) 飼料給餌期間による血清鉄量の変化

0 week; 離乳直後の3週齢, 1 week; 1週間NDまたはLFDを給餌, 2 weeks; 2週間NDまたはLFDを給餌, 3 weeks; 3週間NDまたはLFDを給餌

C) NDまたはLFDの3週間給餌後のヘマトクリット値

D) NDまたはLFDの給餌中の体重変化

E) NDまたはLFDの3週間給餌後の組織重量

F) NDまたはLFDを3週間給餌後の肝臓中鉄量

G) NDまたはLFDを3週間給餌後の精巣中鉄量

\*: NDとLFD間に有意差あり(p<0.05)

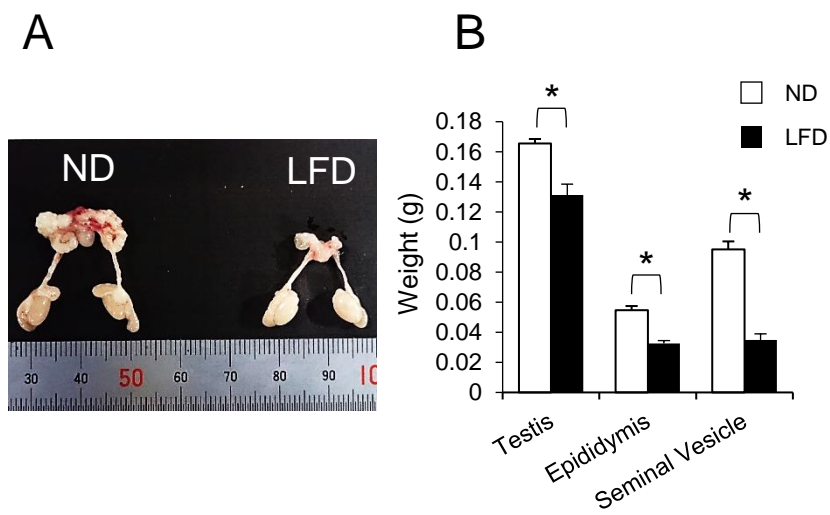


Fig 2 鉄欠乏が雄の生殖器へ与える影響

ND; 3週齢のマウスに3週間通常飼料を給餌

LFD; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌

A) NDおよびLFDの精巣, 精巣上部, 精嚢の写真

B) NDおよびLFDの精巣, 精巣上部, 精嚢の重量

\*: NDとLFD間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

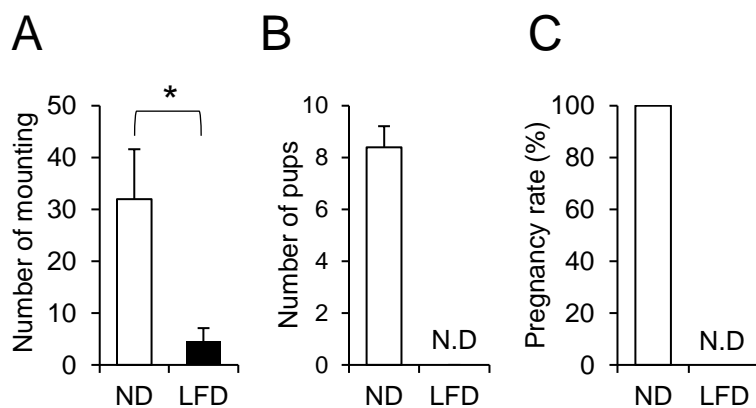


Fig 3 鉄欠乏が雄の妊孕性へ与える影響

ND; 3週齢のマウスに3週間通常飼料を給餌

LFD; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌

A) NDまたはLFD雄マウスにおけるND雌マウスとの1時間中の性行動回数

B) ND雌マウスとNDまたはLFD雄マウスとの交配試験による出産された産仔数

C) ND雌マウスとNDまたはLFD雄マウスとの1ヶ月間の交配試験による妊娠させた雄マウスの割合

\*: NDとLFD間に有意差あり ( $p < 0.05$ ) N.D: Not detected.

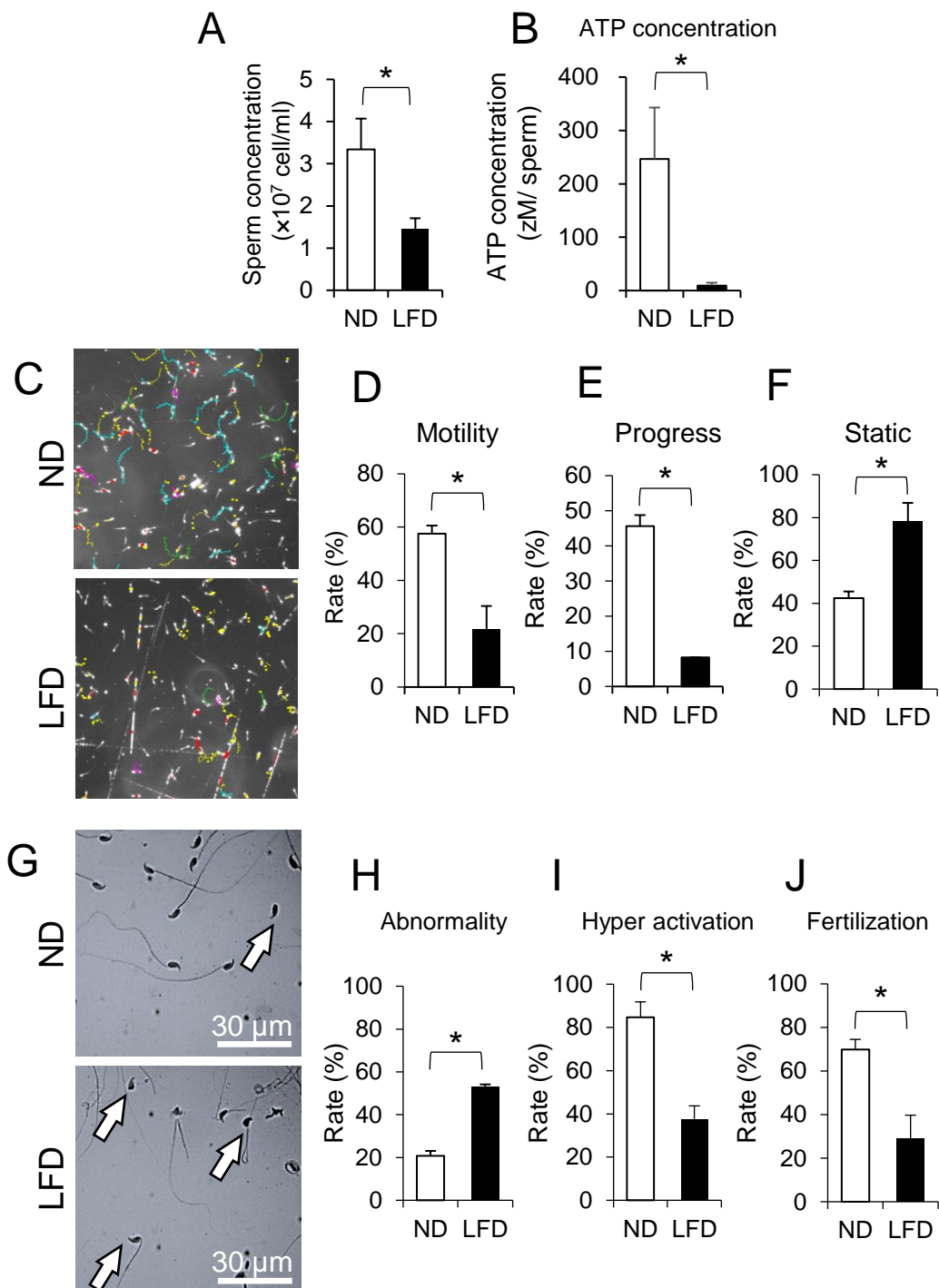


Fig 4 鉄欠乏が精子精巣上部精子数，精子のATP含量および精子の運動性へ与える影響

ND; 3週齢のマウスに3週間通常飼料を給餌  
 LFD; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌

A) NDおよびLFDの精巣上部精子数

B) NDおよびLFDの1精子あたりのATP濃度

C) CASAにより撮影したNDおよびLFDの精子運動軌跡像

D, E, F) NDおよびLFD精子の前進運動精子率(C), 良好な運動精子率(D), (E) 不動精子率

G, H) NDおよびLFDの精巣上部精子像(G) 奇形精子率(H)

↔: 奇形精子を示す

I, J) NDおよびLFD精子のハイパーアクチベーション率(I) 受精率(J)

\*: NDとLFD間に有意差あり ( $p < 0.05$ ).

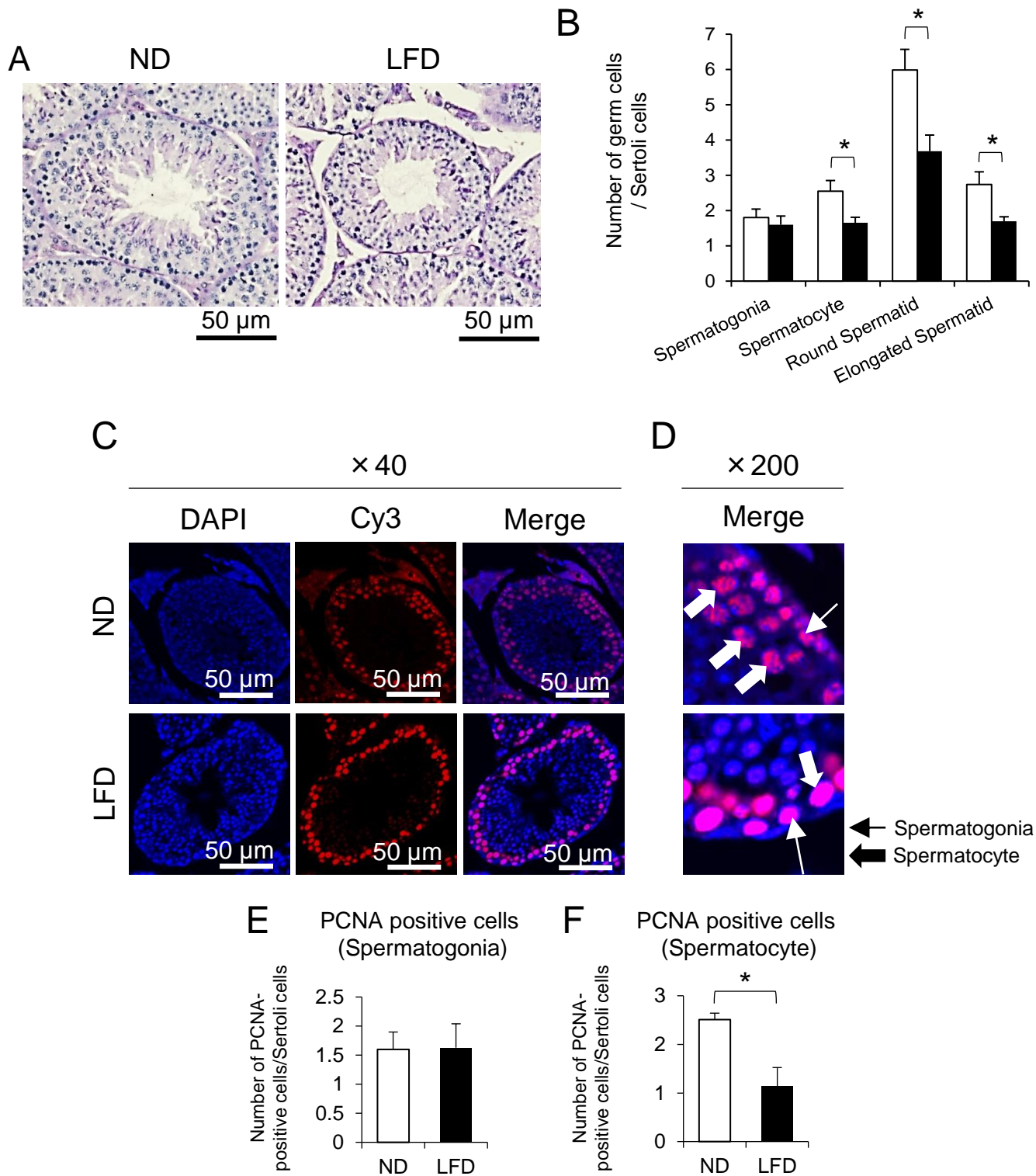


Fig 5 鉄欠乏が精子形成の各生殖細胞に与える影響

ND; 3週齢のマウスに3週間通常飼料を給餌

LFD; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌

A) NDおよびLFD精巣切片のPAS染色像

B) NDおよびLFDのセルトリ細胞数あたりの精祖細胞, 精母細胞, 円形精子細胞, 伸長精子細胞数

C, D, E, F) NDおよびLFD精巣切片のPCNA免疫蛍光染色像 (C: ×40, D: ×200) とセルトリ細胞数あたりのPCNA陽性生殖細胞 (E: Spermatogonia) (F: Spermatocyte)

\*: NDおよびLFD間に有意差あり (p<0.05)

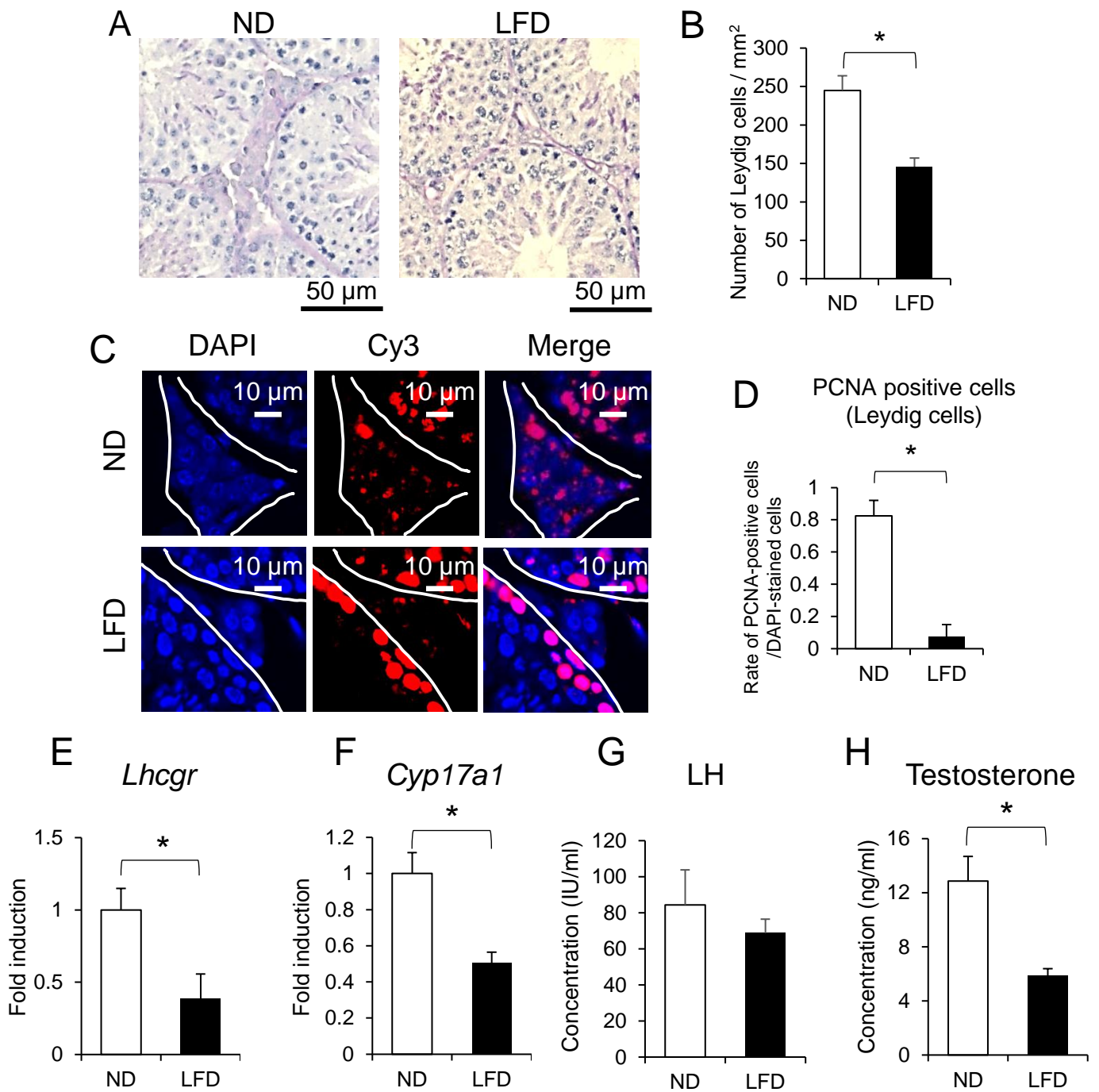


Fig 6 鉄欠乏がライディッヒ細胞へ与える影響

ND; 3週齢のマウスに3週間通常飼料を給餌

LFD; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌

A) NDおよびLFD精巣切片のPAS染色像

B) NDおよびLFDの精巣1 mm<sup>2</sup>あたりのライディッヒ細胞数

C, D) NDおよびLFD精巣切片のPCNA免疫蛍光染色像 (C) とDAPI陽性ライディッヒ細胞あたりのPCNA陽性ライディッヒ細胞割合 (D)

E, F) NDおよびLFD精巣の*Lhcgr* (E) および*Cyp17a1* (F) の遺伝子発現

G) NDおよびLFD血清中のLH濃度

H) NDおよびLFD精巣のテストステロン濃度

\*: NDとLFD間に有意差あり(p<0.05)

遺伝子発現のデータはNDの相対値で表す



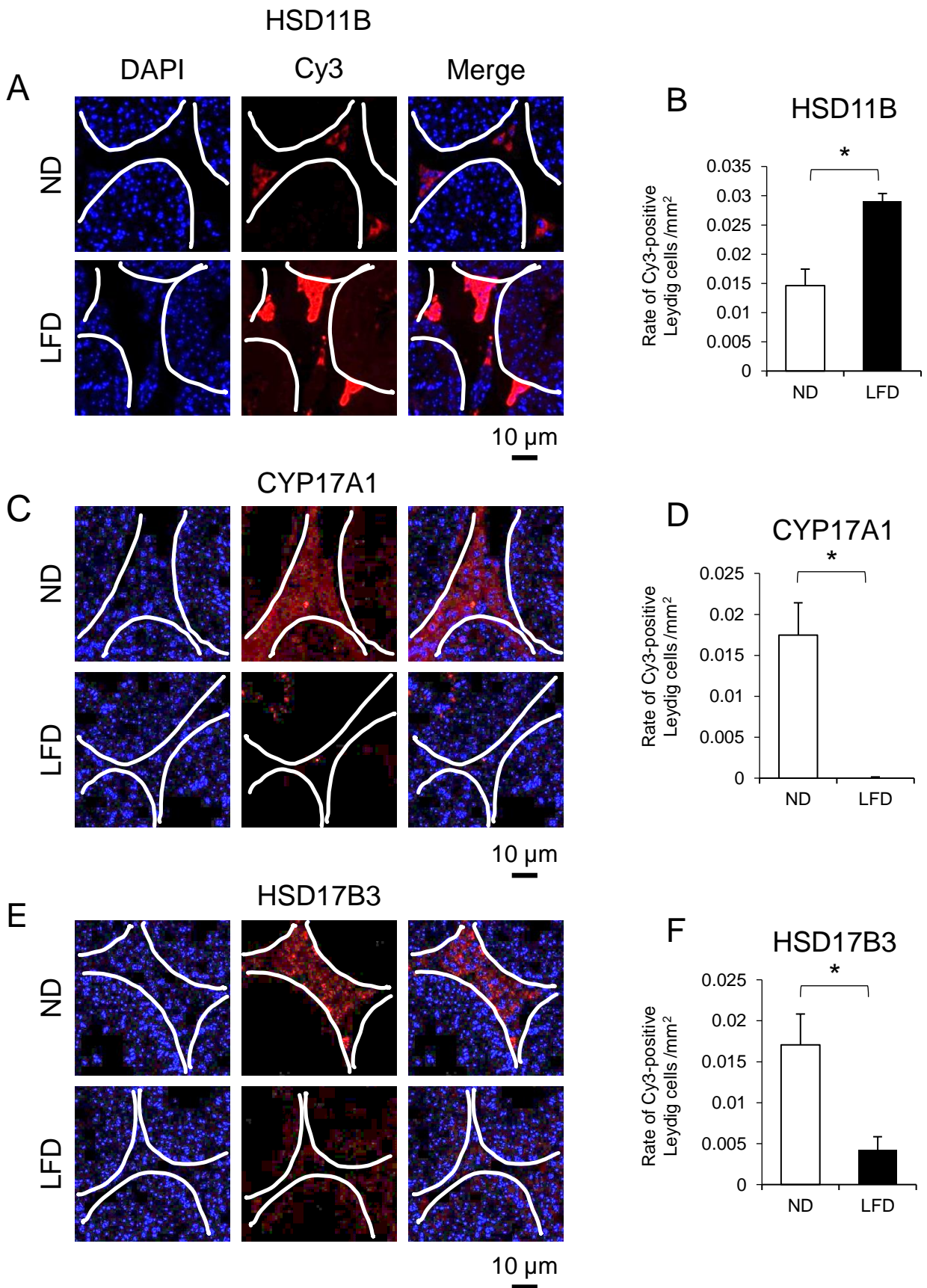


Fig. 7. 鉄欠乏がライディッヒ細胞の幼若マーカーおよび成獣マーカーに与える影響

ND; 3週齢のマウスに3週間通常飼料を給餌, LFD; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌

A) NDおよびLFDの精巣切片における幼若ライディッヒ細胞マーカー(HSD11B)陽性細胞の割合

B, C) NDおよびLFDの成獣ライディッヒ細胞マーカー(B: CYP17A1, C: HSD17B3)陽性細胞の割合

\*: NDとLFD間に有意差あり(p<0.05)

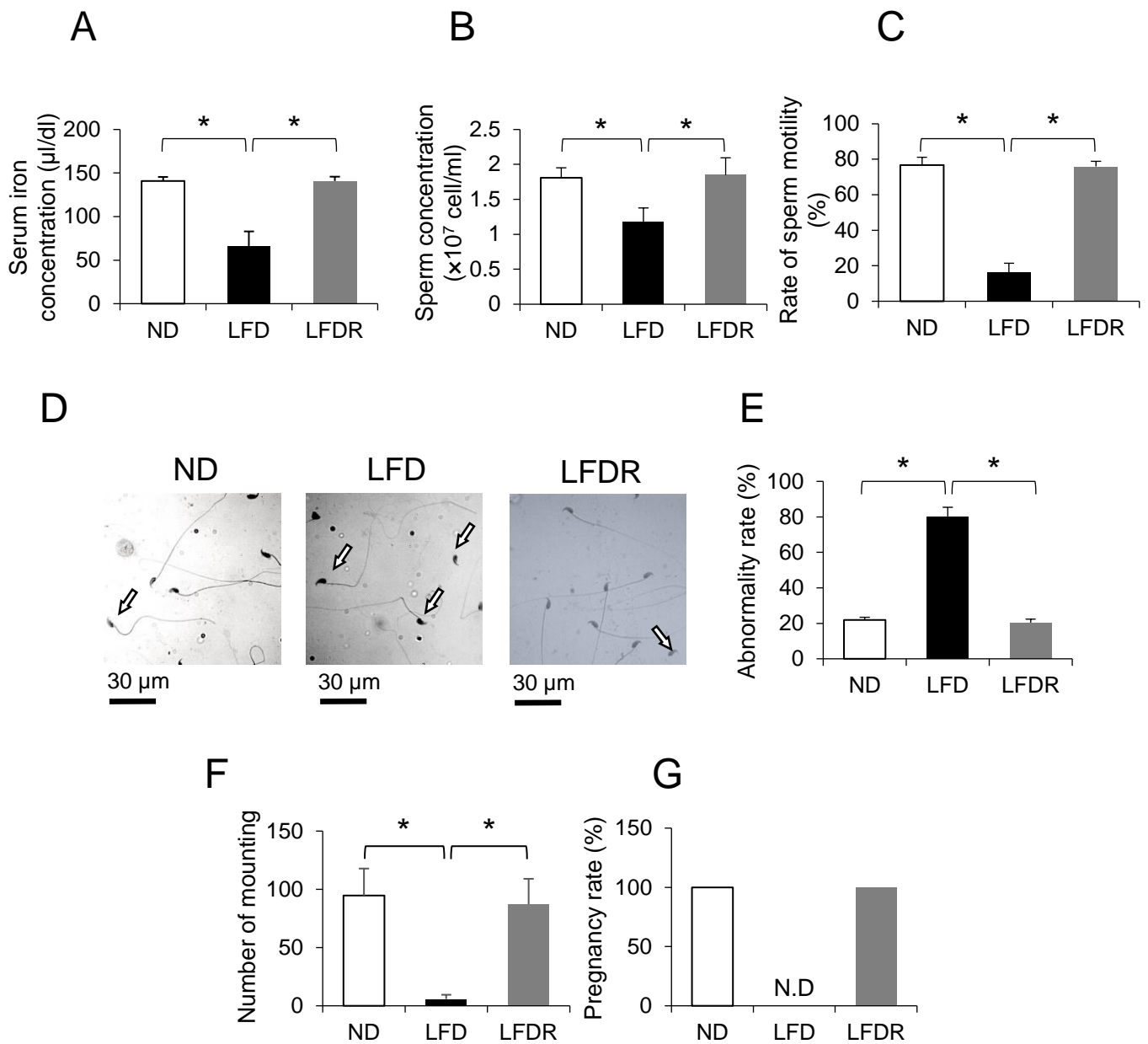


Fig 8 LFDマウスへの3週間通常飼料給餌後の血清中の鉄量，精巣上体精子数，運動精子率および性周期変化

ND; 3週齢のマウスに6週間通常飼料を給餌

LFD; 3週齢のマウスに6週間低鉄飼料を給餌

LFDR; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌後，3週間通常飼料を給餌

A) ND, LFDおよびLFDRの血清中鉄量

B) ND, LFDおよびLFDRの精巣上体精子数

C) ND, LFDおよびLFDRの運動精子率

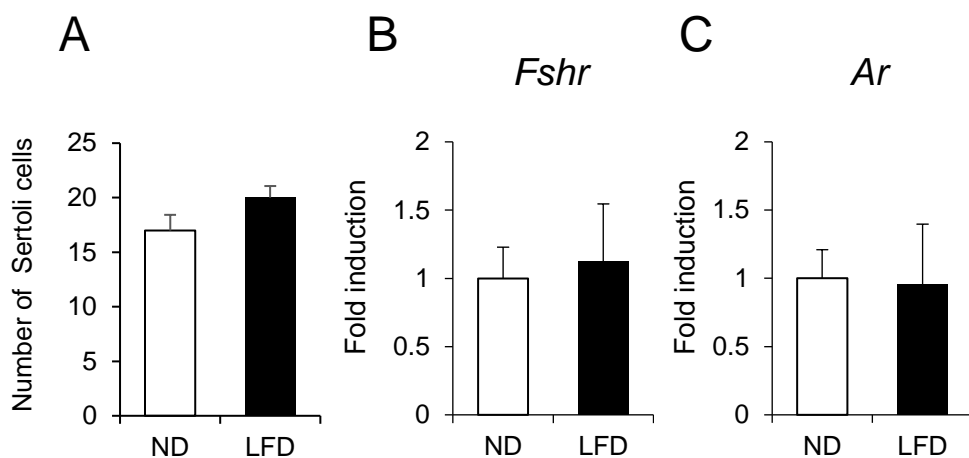
D, E) ND, LFDおよびLFDRの精巣上体精子像(D) 奇形精子率(E)

↔: 奇形精子

F) ND雌マウスとのND, LFDおよびLFDR雄マウスの性行動回数

G) ND雌マウスとND, LFDおよびLFDR雄マウスの1ヶ月間の交配試験による妊娠率

\*: 処理区間に有意差あり ( $p < 0.05$ ).



Supplemental Fig. 1. 鉄欠乏がセルトリ細胞マーカーへ与える影響

ND; 3週齢のマウスに3週間通常飼料を給餌

LFD; 3週齢のマウスに3週間低鉄飼料を給餌

A) NDおよびLFDの精細管内のセルトリ細胞数

B, C) NDおよびLFD精巢の*Fshr* (B), *Ar* (C) の遺伝子発現

\*: NDとLFD間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

遺伝子発現のデータはNDの相対値で表す

## 第四章 総合考察

鉄はヒトの体内に約 3~5 g 存在し、この内 3 分の 1 が赤血球以外の組織において様々な反応を担う。その多くは、貯蔵鉄として肝臓に蓄積されるが、末梢組織で鉄が不足すると肝臓の貯蔵鉄が末梢組織に必要な鉄をトランスフェリンと結合させ血中に放出し、トランスフェリン受容体を介して末梢組織に供給される。鉄の喪失量は 1 日に約 1 mg であるが、この喪失は食事から吸収し、体内の鉄の恒常性が保たれている。しかし、偏食や過度なダイエットによる鉄の摂取不足は鉄欠乏を生じさせ、体内における鉄の恒常性を負に変化させる。特に鉄は、多くの末梢組織においてステロイドホルモン産生を担うチトクローム系酵素の補因子として働くほか、鉄硫黄クラスタータンパク質に取り込まれ電子伝達系の酸化還元反応に働きミトコンドリアのエネルギー生産にも重要であることが知られている。卵巣や精巣はステロイドホルモン産生を担い、かつ多くの反応に ATP を多量に必要としていることが知られていることから、本研究では、鉄欠乏が雌雄の生殖に及ぼす影響を個体レベルで解析を行った。

本研究において LFD マウスは、雌では顆粒膜細胞の *Fshr* 発現の低下により不妊になること、雄ではライディッチ細胞の *Lhcgr* 発現の低下により不妊になることを明らかにした。では、なぜ顆粒膜細胞における *Fshr* 発現およびライディッチ細胞の *Lhcgr* 発現が鉄欠乏の影響を強く受けたのだろうか。発生学上、雌性生殖巣の細胞群と雄性生殖巣の細胞群は、同性質の細胞である。顆粒膜細胞は、卵胞発育時に約 1 万倍も細胞を増加させ (Erickson, 2008)、血中の E2 量を増加させるほどのホルモン産生を行う。ライディッチ細胞も、成体になるまでに約 50 倍も細胞数を増やし (Baker *et al.*, 2001)、多量のテストステロンを産生することから、顆粒膜細胞とライディッチ細胞は、盛んな細胞増殖を行う内分泌細胞という点が類似している。さらに、鉄の取り込みを担う TFR1 の発現は、卵巣と精巣内において肝臓よりも高く、特に顆粒膜細胞およびライディッチ細胞に強く発現している (未発表データ)。この理由は、盛んな細胞増殖と多量のホルモン産生を維持するために、両細胞共に鉄の要求量が高いためであると考えられる。実際に当研究室では、顆粒膜細胞およびライディッチ細胞特異的 *Tfrr1* cKO マウスにおいて同様に顆粒膜細胞の *Fshr* 発現およびライディッチ細胞の *Lhcgr* 発現が低下し、雌雄共に不妊を生じる結果を得ている。ガン細胞は、TFR1 の発現量が高く、鉄の要求量が特に高い細胞として知られているが、鉄のキレート剤を投与するとガン細胞特異的に細胞増殖および分化能が抑制される結果が得られている (Ninomiya *et al.*, 2017)。ガン細胞の研究結果と本研究から考察すると、細胞増殖活性の高い顆粒膜細胞およびライディッチ細胞は TFR1 の発現が高いため、生殖巣の中で鉄欠乏の影響を強く受けたと考えられる。

本研究において、雌マウスにおいて認められた鉄欠乏による妊孕性の低下は、eCG による卵胞発育誘導を行っても若干の回復しか認められなかった。一方この妊孕性の低下は、3

週間の鉄を含む通常飼料の給餌により完全に回復した。現在、女性の不妊症の治療プログラムには、FSH 製剤や E2 製剤を投与する治療が一般的に適応される。しかし、本研究結果は、鉄欠乏が原因で不妊症となっている場合には、これらの治療をしても改善の望みが低く、鉄剤の補充による治療が必要であることを示している。同様に、雄においても LFD マウスは *Lhcgr* 発現およびテストステロン産生が低下し、雄性不妊になることを明らかにしている。LFD マウスである LuRKO マウスを用いた研究を行った Lei らは (2004)、LuRKO マウスにテストステロンを投与すると減少していた精母細胞以降の精子形成が野生型マウスと同程度まで回復するが、ライディッチ細胞は幼若のまま、ライディッチ細胞の数が回復しないことを示しており、精子形成の維持にはテストステロンを投与し続ける必要があると考えられる。実際に、不妊治療クリニックにおいて、テストステロン不足による不妊症の治療には、hCG/hMG 療法やテストステロン補充療法が行われている。しかし、本研究結果は、鉄欠乏が原因の雄性不妊に関しては、hCG/hMG 療法やテストステロン補充療法では精子の運動性を担保するのが困難である可能性が高いことを示唆している。実際、本実験において、LFD マウスの精子 ATP 量は著しく低下し、精子の運動性も低下する結果を得ている。精巣における TFR1 の局在は、ライディッチ細胞に局在していたことから曲精細管内の精子へ鉄を供給し、精子における ATP 産生を担っている可能性が高い。このことから、hCG/hMG 療法やテストステロン補充療法では、精子形成は生じるものの作成された精子の運動性は低い可能性が高い。鉄欠乏による精子形成不全は、通常飼料を給餌する回復試験を行うと完全に回復したことから、鉄分不足による精子形成不全への鉄剤補充療法は、精巣内の精子形成の活性化を誘導し、運動性の高い精子を得ることができる不妊治療法の開発につながる可能性が高い。

本研究は、鉄欠乏が生殖組織に強い影響を与え、生殖組織の中でも鉄の要求量が高い顆粒膜細胞およびライディッチ細胞のホルモン応答性の低下に伴う雌雄生殖機能障害により不妊となることを明らかとした。さらに、鉄欠乏が原因の不妊は、鉄欠乏の改善により生殖機能を十分に回復し、雌雄両方において妊娠可能となることも明らかとした。この結果は、生殖医療分野の発展に大きく寄与すると考えられる。

## 第五章

### 総括

#### 第一章：緒論

鉄欠乏は世界人口の約 8 割（約 50 億人）が患っていると WHO により推定される、世界で最も多い栄養障害である。生殖医療分野において、近年、不妊治療に訪れる女性の約 9 割が鉄欠乏であること、鉄欠乏男性患者の精子の質の低下が報告されている。しかし、鉄欠乏の雌雄生殖機能への影響を詳細に示した報告はない。そこで、鉄が食餌のみから摂取可能なことに着目し、鉄がほとんど含まれない低鉄飼料を給餌した鉄欠乏（Low Fe diet; LFD）マウスを作出し、通常飼料を給餌した（Normal diet; ND）マウスと比較解析を行い、鉄欠乏の雌雄生殖機能への影響を調べた。

#### 第二章：鉄欠乏が雌性生殖機能へ与える影響

初めに鉄欠乏が誘導される低鉄飼料割合と給餌期間を検討し、鉄欠乏が誘導された 100% LFD を 3 週間給餌したマウスを以降の実験に用いた。次に鉄欠乏の雌性生殖への影響を検討するため、性周期変動、妊娠率、産仔数を調べた。性周期変動は ND マウスでは発情休止期から発情前期、発情期、発情後期を経て発情休止期に戻り正常に繰り返されていたが、LFD マウスでは発情休止期から進行しなかった。さらに、LFD 雌マウスはすべての個体が妊娠しなかったことから、鉄欠乏が雌性生殖の卵胞発育、排卵、受精、発生のどこに影響するか検討した。発情休止期の LFD マウスの卵巣内の胞状卵胞数は減少し、胞状卵胞への卵胞発育不全を呈した。また、FSH と同様の作用を持つ eCG による卵胞発育刺激を行っても LFD マウスの胞状卵胞数は少なかった。このことから、LFD マウスの卵巣において FSH の応答性が低下していると考えられたため、血中の FSH 量と卵巣の FSH 受容体（*Fshr*）の mRNA 発現を調べた。この結果、血中 FSH 量は鉄欠乏による影響は認められないが、LFD マウスの卵巣の FSH 受容体（*Fshr*）発現は有意に低下し、それに伴い下流の *Cyp19a1*, *Ccnd2* mRNA 発現および E2 量の低下が認められた。さらに、低鉄飼料給餌により卵胞発育不全を呈した卵巣において排卵数は著しく低下し、この LFD マウスの排卵卵子の発生能を体外受精により検討した結果、受精能、胚盤胞への発生能ともに著しく低値を示した。さらに、鉄欠乏による妊孕性の低下が鉄を含む通常飼料の補給で改善可能か調べた結果、LFD マウスに 3 週間の通常飼料給餌を給餌した LFD Rescue（LFDR）マウスは、鉄欠乏が改善され、性周期が正常に進行し、交配試験を行ったすべての LFDR 雌マウスが妊娠した。以上の結果から、鉄欠乏は卵巣の FSH 応答性を低下させ卵胞発育不全を誘導し、以降に続く排卵、受精、発生、妊娠にも影響し不妊になることを明らかにした。また、鉄欠乏が原因の雌性不妊は、鉄を含む通常飼料の補給により回復可能であることを明らかにした。

### 第三章：鉄欠乏が雄性生殖機能へ与える影響

第二章と同様にまず鉄欠乏が誘導される低鉄飼料割合と給餌期間を検討した。この結果、雄においても 100%LFD を 3 週間給餌すると鉄欠乏が誘導された。鉄欠乏の雄性生殖への影響を検討するため、組織重量、性行動回数、妊娠率、産仔数を調べた。LFD マウスの組織重量は、鉄の利用能が高い組織に影響はなく、生殖組織において著しく減少した。さらに、LFD マウスの性行動回数は減少し、LFD 雄マウスと交配した雌マウスはすべての個体が妊娠に至らず、鉄欠乏による雄性不妊を呈した。LFD マウスの精巣上体精子は、ND マウスと比べ奇形率が著しく高く、精子の運動性が有意に低下した。この精子を用いて ND 雌マウス由来の卵子と受精試験を行ったところ、受精率は著しく低い値であった。鉄欠乏が精巣を構成する各種生殖細胞に与える影響を解析した結果、精母細胞、円形精子細胞、伸長精子細胞数が低下し、この低下は精母細胞の増殖細胞割合低下にあることが明らかになった。精母細胞以降の精子形成にはライディッヒ細胞から分泌されるテストステロンが重要であることから、鉄欠乏がライディッヒ細胞に及ぼす影響を検討した結果、ライディッヒ細胞数とその増殖細胞割合は ND マウスに比べ LFD マウスで有意に減少した。さらに、血中の LH 量は鉄欠乏の影響は認められなかったが、LH 受容体 (*Lhcgr*) の mRNA 発現が低下し、それに伴い下流因子の *Cyp17a1* mRNA 発現、精巣テストステロン量が減少していた。加えて、LFD マウスのライディッヒ細胞には、ND マウスに比べてテストステロン産生能を持たない幼若ライディッヒ細胞 (HSD11B 陽性細胞) が多く存在し、テストステロン産生能を持つ成獣ライディッヒ細胞 (CYP17A1, HSD17B3 陽性細胞) は有意に低い値を示した。また、LFD マウスへ通常飼料を給餌した LFD Rescue (LFDR) マウスを作出し鉄の補給試験を行った結果、LFDR マウスの鉄欠乏は改善し、LFD マウスにおいて低下した精子の質および妊孕性が LFDR マウスでは ND マウスと同程度まで劇的に回復した。このことから、雄の鉄欠乏は、成獣ライディッヒ細胞の数を低下させ、この結果、テストステロン合成を低下させ、精母細胞以降の精子形成不全による雄性不妊を誘導することが明らかになった。さらに、鉄を含む通常飼料の給餌は鉄欠乏により生じる雄性不妊を劇的に回復させることに成功した。

#### 総合考察：

本研究において、低鉄飼料給餌により雌雄マウスに鉄欠乏が誘導可能であること、雌雄マウスの鉄欠乏は、下垂体由来のホルモン分泌に影響を与えないが、生殖組織のホルモン応答性を低下させる結果、生殖機能不全を示すことを明らかにした。さらに、この生殖機能不全は、鉄の補給により鉄欠乏状態を改善することで正常な生殖機能を回復することも明らかとした。この結果は、鉄剤の補給による不妊改善の可能性が期待され、生殖医療分野に大きく貢献しうると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するに際し、実験計画、実験手技や論文、申請書の執筆などの技術だけでなく、研究者としての心構えに至るまで、終始厳しくも熱意のこもったご指導ご鞭撻を賜った県立広島大学大学院総合学術研究科 動物生殖生理学研究室 准教授 山下泰尚 博士に深謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、ご助言を頂きました広島大学大学院統合生命科学研究科 教授 島田昌之 博士，助教 梅原崇 博士，助教 川合智子 博士，県立広島大学大学院 名誉教授 堀内俊孝 博士，教授 齋藤靖和 博士，教授 稲垣匡子 博士，准教授 阿部靖之 博士に感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に際し、抗体を提供して頂きました九州大学大学院医学研究院 教授 諸橋憲一郎 博士に感謝の意を表します。

広島大学大学院統合生命科学研究科 特任助教 岡本麻子 博士には、本研究の遂行に際し、有益なご助言や日々研究に取り組む姿勢など多くを学ばせて頂きました。同研究室 OG, OB の河端茜 女氏，久田尚人 氏は研究を共にし、実験手技の習得，懇切丁寧なご指導を頂きました。同研究室の同期である木山千帆 女史，佐川美優 女史，真子清香 女史，三輪智弘 氏，後輩である中西寛弥 氏，城間萌 女史，小森真理絵 女史，望月美佳 女史，大廣純之介 氏，平本遥菜 女史，山岡愛実 女史，福田奈央 女史，松下蒼樹 氏，河野友香 女史，安藤光里 女史は，共に夜遅くまで研究し，論文作成を共にして多くの刺激を頂きました。また，同研究室の OB, OG, 後輩の方々には，マウス繁殖の維持，サンプル回収等研究を手伝って頂きました。上記の方々に厚く御礼申し上げます。

最後に，大学院生活を資金面で支えてくれた両親に感謝いたします。



## 引用文献

*Abel MH, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Kumar TR, Charlton HM.*

**Age-related uterine and ovarian hypertrophy in FSH receptor knockout and FSHbeta subunit knockout mice.**

Reproduction. 2003 Feb;125(2):165-73.

*Abuaisha M, Itani H, El Masri R, Antoun J.*

**Prevalence of Iron Deficiency (ID) without anemia in the general population presenting to primary care clinics: a cross-sectional study.**

Postgrad Med. 2020 Apr;132(3):282-287. doi: 10.1080/00325481.2020.1715701. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31933400.

*Adamson GD, de Mouzon J, Chambers G, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Banker M, Dyer S, Kupka M.*

International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2016

*Akazawa N.*

**The effects of iron deficiency on secretion of the hormone: the effects of iron deficiency on the serum testosterone levels in the young male rats.**

The annual report of the Faculty of Education, Iwate University. 2006 Nov; 66:27-33.

*Baker PJ, Sha JH, O'Shaughnessy PJ.*

**Localisation and regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis.**

Mol Cell Endocrinol. 1997 Oct 20;133(2):127-33. doi: 10.1016/s0303-7207(97)00159-7. PMID: 9406858.

*Baker PJ, O'Shaughnessy PJ.*

**Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice.**

Reproduction. 2001 Aug;122(2):227-34. doi: 10.1530/rep.0.1220227. PMID: 11467973.

*Basuino L, Silveira CF Jr.*

**Human follicular fluid and effects on reproduction.**

JBRA Assist Reprod. 2016 Mar 1;20(1):38-40. doi: 10.5935/1518-0557.20160009. PMID: 27203305.

*Cusick SE, Georgieff MK, Rao R.*

**Approaches for Reducing the Risk of Early-Life Iron Deficiency-Induced Brain Dysfunction in Children.**

Nutrients. 2018 Feb 17;10(2):227. doi: 10.3390/nu10020227. PMID: 29462970; PMCID: PMC5852803.

*Engel W, Frowein J.*

**Glucocorticoids and hCG sensitivity of rat testicular Leydig cell.**

Nature. 1974 Sep 13;251(5471):146-8. doi: 10.1038/251146a0. PMID: 4371349.

*Erickson, G.*

**Follicle Growth and Development. Glob.**

libr. women's med. 2008; DOI 10.3843/GLOWM.10289Update due

*Garg AV, Amatya N, Chen K, Cruz JA, Grover P, Whibley N, Conti HR, Hernandez Mir G, Sirakova T, Childs EC, Smithgall TE, Biswas PS, Kolls JK, McGeachy MJ, Kolattukudy PE, Gaffen SL.*

**MCPIP1 Endoribonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation.**

Immunity. 2015 Sep 15;43(3):475-87. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.021. Epub 2015 Aug 25. PMID: 26320658; PMCID: PMC4575280.

*Ge RS, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP.*

**Developmental changes in glucocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat Leydig cells.**

Endocrinology. 1997 Dec;138(12):5089-95. doi: 10.1210/endo.138.12.5614. PMID: 9389487.

*Georgieff MK.*

**Iron assessment to protect the developing brain.**

Am J Clin Nutr. 2017 Dec;106(Suppl 6):1588S-1593S. doi: 10.3945/ajcn.117.155846. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29070550; PMCID: PMC5701704.

*Kawai T, Richards JS, Shimada M.*

**The Cell Type-Specific Expression of Lhcgr in Mouse Ovarian Cells: Evidence for a DNA-Demethylation-Dependent Mechanism.**

Endocrinology. 2018 May 1;159(5):2062-2074. doi: 10.1210/en.2018-00117. PMID: 29579175; PMCID: PMC5905396.

*Kobayashi M, Kato H, Hada H, Itoh-Nakadai A, Fujiwara T, Muto A, et al.*

**Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency.**

Haematologica. 2017 Mar;102(3):454-465. doi: 10.3324/haematol.2016.151043. Epub 2016 Dec 7.

*Laurich VM, Trbovich AM, O'Neill FH, Houk CP, Sluss PM, Payne AH, Donahoe PK, Teixeira J.*

**Müllerian inhibiting substance blocks the protein kinase A-induced expression of cytochrome p450 17alpha-hydroxylase/C(17-20) lyase mRNA in a mouse Leydig cell line independent of cAMP responsive element binding protein phosphorylation.**

Endocrinology. 2002 Sep;143(9):3351-60. doi: 10.1210/en.2001-211352. PMID: 12193547.

*Lei ZM, Mishra S, Ponnuru P, Li X, Yang ZW, Rao ChV.*

**Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy.**

Biol Reprod. 2004 Nov;71(5):1605-13. doi: 10.1095/biolreprod.104.031161. Epub 2004 Jul 14. PMID: 15253923.

*Matuleviciute R, Cunha PP, Johnson RS, Foskolou IP.*

**Oxygen regulation of TET enzymes.**

FEBS J. 2021 Dec;288(24):7143-7161. doi: 10.1111/febs.15695. Epub 2021 Jan 29. PMID: 33410283.

*Ninomiya T, Ohara T, Noma K, Katsura Y, Katsube R, Kashima H, Kato T, Tomono Y, Tazawa H, Kagawa S, Shirakawa Y, Kimura F, Chen L, Kasai T, Seno M, Matsukawa A, Fujiwara T.*

**Iron depletion is a novel therapeutic strategy to target cancer stem cells.**

Oncotarget. 2017 Oct 12;8(58):98405-98416. doi: 10.18632/oncotarget.21846. PMID: 29228699; PMCID: PMC5716739.

*Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y, Matsuda J.*

**Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 May 12;95(10):5611-5. doi: 10.1073/pnas.95.10.5611. PMID: 9576931; PMCID: PMC20426.

*Sato E, Ishibashi T, Koide SS.*

**Inducement of blood vessel formation by ovarian extracts from mice injected with**

**gonadotropins.**

Experientia, 38 : 1248-1249. 1982.

*Schisterman EF, Sjaarda LA, Clemons T, Carrell DT, Perkins NJ, Johnstone E, Lamb D, Chaney K, Van Voorhis BJ, Ryan G, Summers K, Hotaling J, Robins J, Mills JL, Mendola P, Chen Z, DeVilbiss EA, Peterson CM, Mumford SL.*

**Effect of Folic Acid and Zinc Supplementation in Men on Semen Quality and Live Birth Among Couples Undergoing Infertility Treatment: A Randomized Clinical Trial.**

JAMA. 2020 Jan 7;323(1):35-48. doi: 10.1001/jama.2019.18714. Erratum in: JAMA. 2020 Mar 24;323(12):1194. PMID: 31910279; PMCID: PMC6990807.

*Shima Y, Matsuzaki S, Miyabayashi K, Otake H, Baba T, Kato S, Huhtaniemi I, Morohashi K.*

**Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis.**

Mol Endocrinol. 2015 Nov;29(11):1581-93. doi: 10.1210/me.2015-1200. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26402718; PMCID: PMC5414671.

*Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E.*

**Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts.**

Biol Reprod. 2003 Oct;69(4):1388-93.

*Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA.*

**Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis.**

Nature. 1996 Dec 5;384(6608):470-4.

*Siegel ET, Kim HG, Nishimoto HK, Layman LC.*

**The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models.**

Reprod Sci. 2013 Mar;20(3):211-33. doi: 10.1177/1933719112461184. Epub 2012 Nov 26. PMID: 23184658; PMCID: PMC3823505.

*Silva JM, Price CA.*

**Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro.**

Biol Reprod. 2000 Jan;62(1):186-91.

*Silva JM, Price CA.*

**Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro.**

J Endocrinol. 2002 Sep;174(3):499-507.

*Soliman Ashraf, Yassin Mohamed, Sanctis De Vincenzo.*

**Intravenous iron replacement therapy in eugonadal males with iron-deficiency anemia: Effects on pituitary gonadal axis and sperm parameters; A pilot study.**

Indian J Endocrinol Metab. 2014 May;18(3):310-6. doi: 10.4103/2230-8210.131158.

*Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ.*

**Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse.**

Endocrinology. 2002 Jun;143(6):2221-32.

*Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y.*

**Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway.**

Mech Dev. 2002 Apr;113(1):29-39. doi: 10.1016/s0925-4773(02)00004-7. PMID: 11900972.

*Umehara T, Kawashima I, Kawai T, Hoshino Y, Morohashi KI, Shima Y, Zeng W, Richards JS, Shimada M.*

**Neuregulin 1 Regulates Proliferation of Leydig Cells to Support Spermatogenesis and Sexual Behavior in Adult Mice.**

Endocrinology. 2016 Dec;157(12):4899-4913. Epub 2016 Oct 12.

*Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C.*

**Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice.**

Endocr Rev. 2009 Apr;30(2):119-32. doi: 10.1210/er.2008-0025. Epub 2009 Jan 27. PMID: 19176467; PMCID: PMC2662628.

*Wesson JA, Miller KF, Ginther OJ.*

**Response of plasma LH and FSH to gonadotropin-releasing hormone in pony foals and**

**ovariectomized pony mares.**

Theriogenology. 1980 Aug;14(2):113-21.

*Winters BR, Walsh TJ.*

**The epidemiology of male infertility.**

Urol Clin North Am. 2014 Feb;41(1):195-204. doi: 10.1016/j.ucl.2013.08.006. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24286777.

*Yao HH, Whoriskey W, Capel B.*

**Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis.**

Genes Dev. 2002 Jun 1;16(11):1433-40. doi: 10.1101/gad.981202. PMID: 12050120; PMCID: PMC186321.

*Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I.*

**Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice.**

Mol Endocrinol. 2001 Jan;15(1):172-83. doi: 10.1210/mend.15.1.0582. PMID: 11145748.