

ライディッヒ細胞刺激を中心とした非閉塞性無精子症に対する内分泌療法の現状と展望

白石 晃司, 岡 真太郎

山口大学大学院 医学系研究科 泌尿器科学講座

非閉塞性無精子症診療の現状

造精機能障害に対する薬物療法の有効性は、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 (male hypogonadotropic hypogonadism; MHH) に対するゴナドトロピン療法を除くと、非常に限られている。乏精子症に対するクエン酸クロミフェンが唯一保険適用として使用可能であるが、著効を呈する症例は限られる。一方で、非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia; NOA) に対する治療法は顕微鏡下精巣内精子採取術 (microdissection testicular sperm extraction; micro-TESE) による手術療法のみであり、精子形成を促すといった観点からは、高ゴナドトロピンを呈する NOA においては内分泌療法についての研究自体がなされていなかった。しかし、NOA 症例において micro-TESE による精子採取率は 30-40% 程度と満足できるものではなく、大部分の NOA 症例は micro-TESE による不妊治療の限界が告げられる。

われわれは高ゴナドトロピンを呈する NOA に対しても、高容量のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を投与することにより、ライディッヒ細胞は十分にテストステロン産生能を有することを見出し、リコンビナントヒト濾胞刺激ホルモン (rhFSH) 製剤の併用 (サルベージ内分泌療法) により、micro-TESE にて精子採取不可能であった症例に対して 2 回目の micro-TESE にて精子採取可能であったことを世界に先駆けて報告した¹⁾ (図 1)。以後、さまざまな施設からわれわれのプロトコールの追試も含め、NOA に対する内分泌療法の有効性が報告されている。しかし、高いエビデンスを有する報告は存在しない²⁾。一方で、アメリカ泌尿器科学会 (AUA) ガイドラインにおいては、micro-TESE 施行前に、クエン酸クロミフェンを中心とした選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM)、アロマトラーゼ阻害薬 (AI)、およびゴナ

ドトロピンの有効性を支持するデータは限られていることを説明すべきである (Conditional Recommendation; Evidence Level; Grade C)³⁾とされており、欧州泌尿器科学会 (EAU) ガイドラインでは micro-TESE にて精子採取不可能であった患者に対しては、内分泌療法は一般的な治療法であるとされている⁴⁾。エビデンスが十分ではない治療法を推奨とまではいえないが、選択肢として提案は行うべきであるという一見矛盾した原則が示されている。その理由として、他の治療法がない中で、1%でも可能性があるのであれば治療の可能性を示すべきであるという不妊治療に特有の状況であるからである。実際に高ゴナドトロピンを呈する NOA 症例に対し、micro-TESE 前も含め、内分泌療法を施行しているエキスパートは 23.6%、2 回目の micro-TESE 前においては 24.6% に上る⁵⁾。

非閉塞性無精子症に対するゴナドトロピンを中心とした内分泌療法

夜間のゴナドトロピン分泌の連続測定により、NOA においてはその基礎値は高いものの、パルス状分泌が低下～消失していることが観察された¹⁾。リガンドである LH による持続的な刺激は、ライディッヒ細胞の LH 受容体はダウンレギュレーションまたは internalization により細胞膜表面への有効なリクルートが十分になされておらず、LH への反応性が低下している⁶⁾。ちょうど黄体期の莢膜細胞や顆粒膜細胞の状況にも似ている。高容量の hCG を用いることで、リガンドの濃度差が生じ LH 受容体の膜表面へのリクルートが促進され、テストステロン合成経路の活性化が生じると考えられる。

hCG 投与により血清総テストステロン濃度が 8-10 ng/mL 程度で、すべての症例ではないが、ネガティブフィードバックによる内因性のゴナドトロピン分泌低下が生じる¹⁾。LH 受容体は hCG により刺激されているため、その補充の必要は不要であるが、FSH が低下した症例には rhFSH の投与 (150 単位 × 3 回/週) を行うこ

連絡先：白石晃司 山口大学大学院医学系研究科
泌尿器科学講座

〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1
TEL/FAX : 0836-22-2275/0836-22-2276
E-mail : shirak@yamaguchi-u.ac.jp

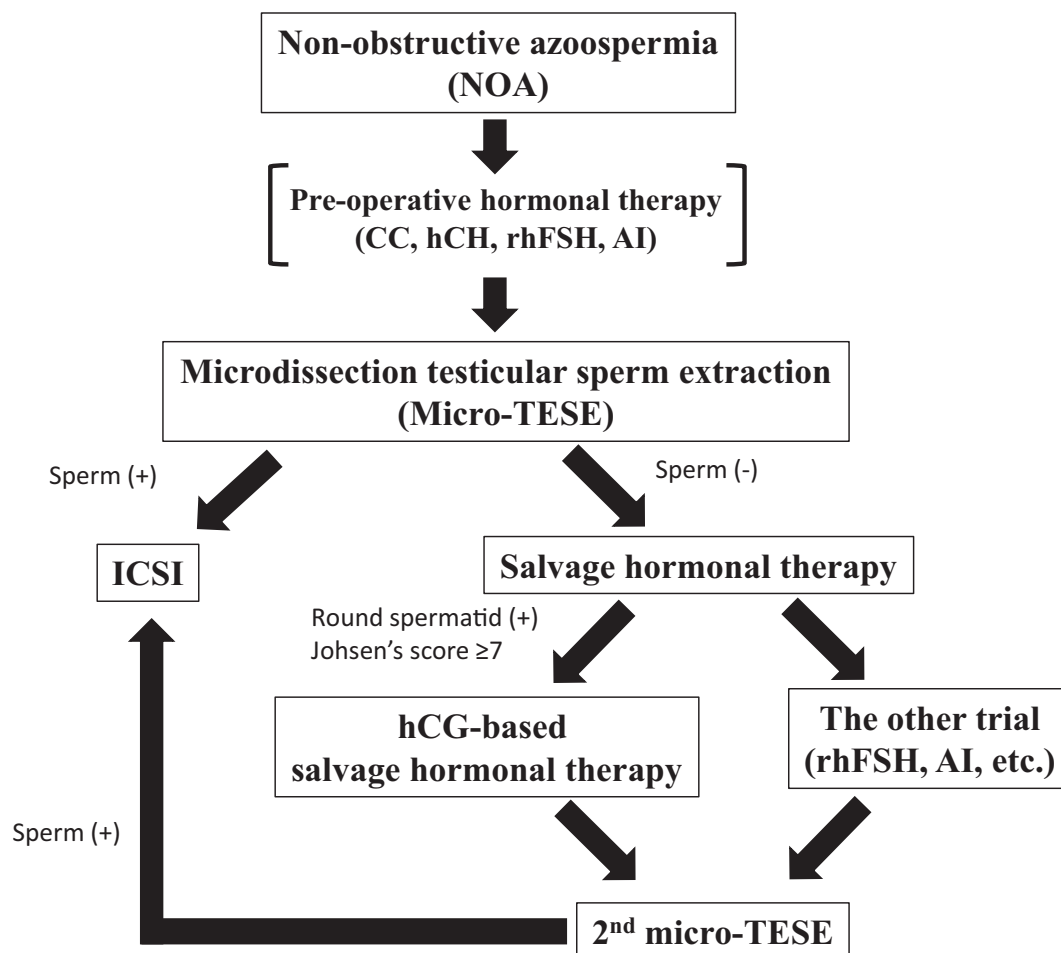


図1 非閉塞性無精子症に対する治療のアルゴリズム

AI: aromatase inhibitor, CC: clomiphene citrate,

hCG: human chorionic gonadotropin, ICSI: intracytoplasmic sperm injection, rhFSH: recombinant human FSH

とにより, セルトリ細胞の刺激を行う. このサルベージ内分泌療法を3-4カ月行い, 2回目のmicro-TESEを行い, 多施設共同研究においても10%の精子採取が可能であった⁷⁾. また同様な方法をmicro-TESE術前に行うことで, 精子採取率は56.6%と良好であり, 術前の内分泌療法を行うことが有用であることを報告されている⁸⁾.

ゴナドトロピンを用いたサルベージ内分泌療法は精巣の組織所見がセルトリ細胞オンリーの症例には無効であり, late maturation arrest など減数分裂が終了した症例で有効である^{1,7)}. そのような症例はNOAの10-20%程度であるため, サルベージ内分泌療法の適応症例は限られている. hCG刺激のみで2回目のmicro-TESEで精子採取可能であった症例も存在することから, 精巣内テストステロン濃度 (intratesticular testosterone; ITT) の上昇により (図2A), spermiogenesisが促進されたと考えられ, late maturation arrest 症例には良い適応である. 一方で, サルベージ内分泌療法は精祖細胞における増殖

マーカーであるPCNAやアンドロゲン受容体の発現を亢進させる⁹⁾. しかしながら, ITTと精子採取率との明確な関連は認められていないため¹⁰⁾, その作用機序についてはさらなる症例の蓄積と基礎研究による解明が必要である.

LH/hCGによるライディッヒ細胞のシグナル伝達とストレス応答

Gタンパク共役型受容体であるLH受容体は, LH/hCG刺激に伴い, GsおよびGq経路が活性化され, 前者に関してはセカンドメッセンジャーである, cAMPを介したPKA-ERK経路が活性化され, テストステロン分泌や細胞の増殖および生存に関与する¹¹⁻¹³⁾. またGq経路を介し, チロシンキナーゼ型受容体であるEGF受容体へのtransactivationを生じる¹⁴⁾. その際にjuxtacrine/paracrineにてEGF-like growth factorの分泌を生じる.

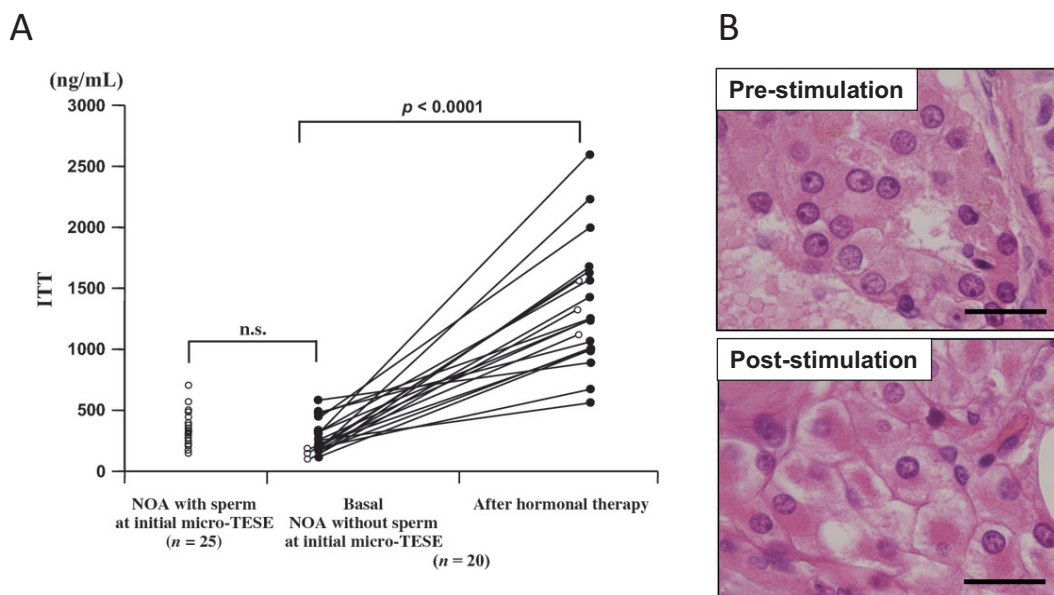


図2 サルベージ内分泌療法による精巣内テストステロン濃度の変化と精子採取の有無
(A)：白丸は2回目のmicro-TESEにて精子採取可能であった症例（Shinjoらの報告（文献10）を改変）。サルベージ内分泌療法によるライディッヒ細胞の形態の変化
(B)：Okaらの報告（文献19）を改変。

つまり、LH/hCG刺激はテストステロン分泌やライディッヒ細胞の生存のみに関与するのみならず、強力な成長因子の分泌を介し、精巣間質のみならず精子形成の維持にも関与している可能性がある。実際にmicro-TESE時に採取されたヒト精巣組織を用いたRT-PCRにて、精子が存在した付近のサンプルでは存在しなかった部位と比較し、heparin binding-EGF, amphiregulinやTGF- α などのEGFリガンドの発現が高値であった¹⁵⁾。このことからサルベージ内分泌療法はITTの上昇のみならず、EGF-like growth factorなどのparacrineを介し、造精機能障害の改善に寄与している可能性がある。

NOAに関する遺伝子異常の報告が蓄積されている¹⁶⁾。一方で、NOAの病態として、熱ストレス、酸化ストレスおよび低酸素ストレスなどが共通の病態として挙げられる。精巣間質に存在するライディッヒ細胞はこれらの外部環境の変化に敏感であり、われわれは熱ストレスに対するライディッヒ細胞の熱ストレス応答機構とテストステロン合成への関与について解析を行った。哺乳類の熱ストレス応答は、熱ショック応答因子1 (HSF1)とその下流分子である熱ショックタンパク質 (heat shock proteins; HSPs) によって主に制御されている。テストステロン合成の律速段階は、steroidogenic acute regulatory protein (StAR) がコレステロールをミトコンドリア内へ輸送であるが、熱ストレス下におけるStARタンパク質は非常に不安定な状態となる。HSF1ノックアウト

マウスを用いた解析で、HSF1が熱ストレス下においてもStARタンパク質を安定化させ、テストステロン合成の維持を補助することが判明した¹⁷⁾。熱ストレス対し、StARのmRNA合成自体は維持されており、ミトコンドリアを介する翻訳後調節が障害を受けることが、StARタンパク質を減少させる原因であった（図3）¹⁷⁾。

Leydig細胞株を用いてHSF1ノックアウト細胞を作成し、ミトコンドリアによる翻訳後調節異常の原因を解析したとこと、HSF1ノックアウト細胞では、熱ストレスに対するミトコンドリア膜電位の低下が顕著であり、断片化したミトコンドリアが増加していたのに対し、野生型細胞ではこれらの変化は軽微だった。ライディッヒ細胞では、熱ストレスによりHSF1依存的にHSP25が強く誘導されており、ミトコンドリアの形態維持やMMPの維持に寄与していた¹⁸⁾。HSP25の誘導を阻害したところ、結果的に熱ストレス応答が働かず、StARの合成障害が起こった。HSF1KO細胞ではHSP25が誘導されず、ミトコンドリア膜電位障害が生じることで、StARタンパク質の合成障害が生じることが判明した¹⁸⁾。ライディッヒ細胞はHSF1を介する熱ストレス応答機構を介することにより、さまざまなストレス下でもテストステロン合成を維持している可能性が示唆された。

HSF1によるStARタンパクを介する コレステロール輸送の維持機構

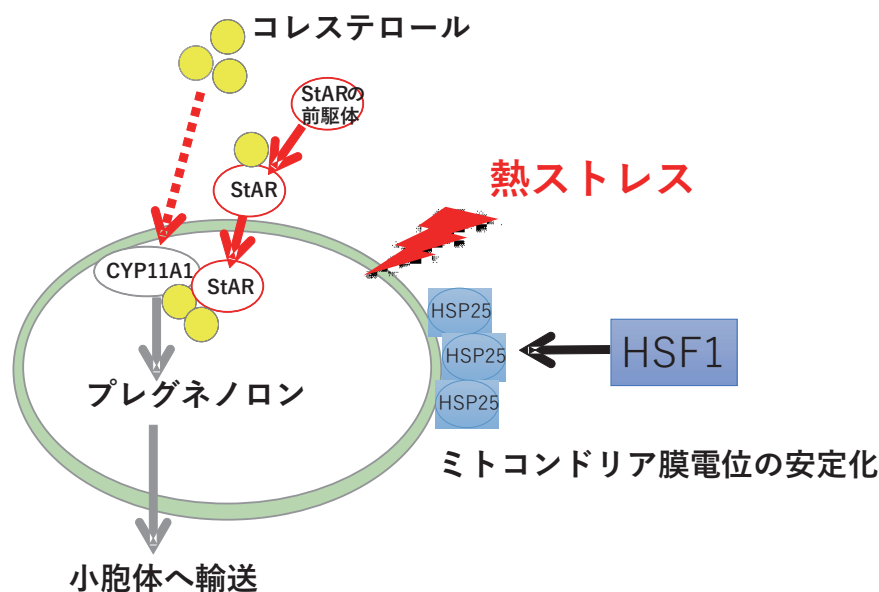


図3 HSF1によるStARタンパクを介するコレステロール輸送の維持機構

サルベージ内分泌療法によるヒト精巣内の 組織学的変化

NOA に対するサルベージ内分泌療法の、ライディッヒ細胞を含む精巣間質組織への影響を検討した。NOA 症例と正常な造精機能を有する閉塞性無精子症 (obstructive azoospermia; OA) 症例の精巣組織において、H.E. 染色、線維芽細胞マーカーである TE-7 抗体、コラーゲン繊維を染色するピクロシウスレッド染色を用いて解析を行ったところ、NOA 群では間質領域が OA 群の 1.2% に対し 12.5% と有意に増加しており、主に間質組織の線維化が確認された (図 2B)¹⁹⁾。hCG 投与後では間質領域は約 30% 減少し、線維化の改善が示唆された。hCG 投与後には、精巣内テストステロンが有意に増加しており、テストステロンの抗線維化作用を示唆する所見である。hCG に刺激されたライディッヒ細胞は一律にではなく、focal に集塊をなして腫大しており、MA-10 細胞やラットライディッヒ細胞初代培養などの *in vitro* で観察された現象は、*in vivo* においては限られたクラスターのライディッヒ細胞において生じている可能性が示唆された。

NOA における精巣内の内分泌環境

ITT は血清と比較し、高値であると考えられていたが、Jarow らは実際に精巣を穿刺することで精巣内 fluid を採取し、精巣内内分泌環境の検討を報告した²⁰⁾。われわれの同様な方法での精巣内 fluid の採取を試みたが、解析に十分な量が採取されないことと、患者の苦痛が非常に強かったことから、本法は精巣内内分泌環境の評価法としては適していないと判断した。Lee らの報告以来、同様な方法での追試の報告はない²¹⁾。われわれは精巣内精子採取術を行う際に、精巣表面から精巣内 fluid を回収し (10–40 μ L)、LC-MS/MS によるテストステロンおよびエストラジオール濃度の測定を行った^{10, 22)}。

造精機能が正常である OA 症例をコントロールとし、NOA 症例との ITT およびエストラジオール (E_2) 値の測定を行った。OA 症例においては、ITT は血清の 112 倍、 E_2 濃度は 81 倍であり、血清値との相関は認められなかった。NOA 症例においては組織学的所見が悪化するほど、ライディッヒ細胞におけるアロマターゼの発現が亢進し、精巣内 E_2 濃度の上昇を認めた²²⁾。精巣内においては主にライディッヒ細胞にアロマターゼの発現を認め、hypospermatogenesis から Sertoli cell only に至る組織学的な悪化に伴いその発現は亢進した。このアロマターゼ

の発現亢進の機序について、R2C ライディッヒ細胞を用いた検討を行ったところ、熱ストレスにより DAX-1 の発現低下を認め、DAX-1-SF-1 経路がテストステロン/ E_2 比の低下に関与する可能性が示唆された²³⁾。NOA におけるライディッヒ細胞におけるアロマターゼ発現亢進は、何らかのストレス応答の結果と考えられる。われわれの経験も含め、NOA に対するアロマターゼ阻害剤の有用性は報告されており、造精機能障害に対するアロマターゼ阻害剤の有用性を検討するために、今後臨床データの蓄積と同時に基礎研究も必要である。

TESE 時の精巣内 fluid 採取は患者負担はなく、十分な量とはいえないが puncture よりは確実に採取が可能であり、同様な方法での精巣内テストステロン代謝に関する報告がなされている²⁴⁾。この方法は研究目的のみであり、日常診療には不適である。一方で、精巣内テストステロンのサロゲートマーカーとしての血清 17-hydroxy-progesterone (17-OHP) の有用性が報告されており²⁵⁾、男性不妊診療の評価法としての報告も存在する。しかし、17-OHP 測定については一部の施設からの報告のみであり、今後その有用性については検証される必要がある。

展 望

最新の多施設横断研究の結果によると、NOA の約 30% がクロミフェンクエン酸塩 (CC) および／またはヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) によるホルモン治療の適応であり、37% はアロマターゼ阻害薬の候補者、17% は両方の治療の適応であることが報告されている²⁶⁾。臨床および基礎研究を通じて、これまで無効といわれていた NOA に対する内分泌療法についての光が見え始めている。

引用文献

- Shiraishi K, Ohmi C, Shimabukuro T, Matsuyama H (2012) Human chorionic gonadotropin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod*, 27, 331-339.
- Tharakan T, Corona G, Foran D, Salonia A, Sofikitis N, Giwercman A, Krausz C, Yap T, Jayasena CN, Minhas S (2022) Does hormonal therapy improve sperm retrieval rates in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 28, 609-628.
- Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A (2021) Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline PART II. *J Urol*, 205, 44-51.
- Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Can Cilesiz N, Cocci A, Corona G, Dimitropoulos K, Gül M, Hatzichristodoulou G, Hugh Jones T, Kadioglu A, Martínez Salamanca JI, Milenkovic U, Modgil V, Ivan Russo G, Can Serefoglu E, Tharakan T, Verze P, Salonia A; EAU Working Group on Male Sexual and Reproductive Health (2021) European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol*, 80, 603-620.
- Rambhatla A, Shah R, Ziouziou I, et al. (2025) Global practice patterns and variations in the medical and surgical management of non-obstructive azoospermia: Results of a world-wide survey, guidelines and expert recommendations. *World J Mens health*, 43, 92-122.
- Bhaskaran RS, Ascoli M (2005) The post-endocytotic fate of the gonadotroin receptors is an important determinant of the desensitization of gonadotropin responses. *J Mol Endocrinol*, 34, 447-457.
- Shiraishi K, Ishikawa T, Watanabe N, Iwamoto T, Matsuyama H (2016) Salvage hormonal therapy after failed microdissection testicular sperm extraction: A multi-institutional prospective study. *Int J Urol*, 23, 496-500.
- Esteves SC, Achermann APP, Miyaoka R, Verza Jr S, Fregonesi A, Ricetto CLZ (2024) Clinical factors impacting microdissection testicular sperm extraction success in hypogonadal men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*, 122, 636-647.
- Kato Y, Shiraishi K, Matsuyama H (2014) Expression of testicular androgen receptor in non-obstructive azoospermia and its change after hormonal therapy. *Andrology*, 2, 734-740.
- Shinjo E, Shiraishi K, Matsuyama H (2013) Effect of hormonal therapy on spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia. *Andrology*, 1, 929-935.
- Shiraishi K, Ascoli M (2006) Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) in MA-10 cells leads the stimulation of classical tyrosine kinase cascades that participate in the activation of Ras and the phosphorylation of the extracellular signal regulated kinases (ERK1/2). *Endocrinology*, 147, 3419-3427.
- Shiraishi K, Ascoli M (2007) Lutropin/choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary cultures of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the ERK1/2 cascades. *Endocrinology*, 148, 3214-3225.
- Tai P, Shiraishi K, Ascoli M (2009) Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits apoptosis of immature Leydig cells in primary culture. *Endocrinology*, 150, 3766-3773.
- Shiraishi K, Ascoli M (2008) A co-culture system reveals the involvement of intercellular pathways as mediators of the lutropin receptor (LHR)-stimulated ERK1/2 phosphorylation in Leydig cells. *Exp Cell Res*, 314, 25-37.
- Shiraishi K, Matsuyama H (2012) Local expression of epidermal growth factor-like growth factors in human testis and its role in spermatogenesis. *J Androl*, 33, 66-73.

16. Tüttelmann F, Ruckert C, Röpke A (2018) Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. *Med Genet*, 30, 12–20.
17. Oka S, Shiraishi K, Fujimoto M, Katiyar A, Takii R, Nakai A, Matsuyama H (2017) Role of heat shock factor 1 in conserving cholesterol transport in Leydig cell steroidogenesis via steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology*, 158, 2648–2658.
18. Oka S, Takii R, Fujimoto M, Nakai A, Shiraishi K (2025) HSF1/HSP25 system protects mitochondria function from heat stress and assists steroidogenesis in MA-10 Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 595, 112391.
19. Oka S, Shiraishi K, Matsuyama H (2017) Effects of human chorionic gonadotropin on testicular interstitial tissues in men with non-obstructive azoospermia. *Andrology*, 5, 232–239.
20. Jarow JP, Chen H, Rosner TW, Trentacoste S, Zirkin BR (2001) Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *J Androl*, 22, 640–645.
21. Lee AP, Roth MY, Nya-Ngatchou JJ, Lin K, Walsh TJ, Page ST, Matsumoto AM, Bremner WJ, Amory JK, Anawalt BD (2016) Testicular fine-needle aspiration for the assessment of intratesticular hormone concentrations. *Asian J Androl*, 18, 21–24.
22. Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H (2021) Testicular testosterone and estradiol concentrations and aromatase expression in men with nonobstructive azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab*, 106, 1803–1815.
23. Oka S, Matsukuma H, Horiguchi N, Kobayashi T, Shiraishi K (2022) Heat stress upregulates aromatases expression through nuclear DAX-1 deficiency in R2C Leydig tumor cells. *Mol Cell Endocrinol*, 558, 111766.
24. Huang IS, Li LH, Chen WJ, Juan CC, Huang WJ (2025) Intratesticular Testosterone and Its Precursors among Azoospermic Men: A Pilot Study. *World J Mens health*, 43, 142–153.
25. Amory JK, Coviello AD, Page ST, Anawalt BD, Matsumoto AM, Bremner WJ (2008) Serum 17-hydroxyprogesterone strongly correlates with intratesticular testosterone in gonadotropin-suppressed normal men receiving various dosages of human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*, 89, 380–386.
26. Pozzi E, Venigalla G, Raymo A, Ila V, Achermann APP, Esteves SC, Salonia A, Ramasamy R (2025) Eligibility for the medical therapy among men with non-obstructive azoospermia-Findings from a multi-centric cross-sectional study. *Andrology*, 13, 234–242.