

精巣発生・精子形成におけるホルモンの役割

名古屋市立大学大学院医学研究科 小児泌尿器科学分野
水野 健太郎、西尾 英紀、林 祐太郎

はじめに

精巣は、精子形成を行う生殖器官であるとともに、ホルモン産生を行う内分泌器官でもある。精巣で産生される代表的なホルモンには、男性ホルモン（アンドロゲン）、抗ミュラー管ホルモン、インヒビン B 等があり、標的臓器への作用を発揮する。同時に、精巣自体も LH、FSH、アンドロゲン、エストロゲン、レチノイン酸、甲状腺ホルモンなど多くのホルモンの標的臓器であり、その機能が制御されている。このことは各ホルモンが正常な精巣機能に寄与することを示すとともに、各ホルモン作用の障害が精巣機能の低下、男性不妊症などの病態へつながることを示唆している。

私たちは泌尿器科領域の中でも先天性疾患に対する診療を中心に行っており、同時に、精巣発生や幼若期の精子形成に関する基礎的研究を進めている。本稿では、私たちがこれまで取り組んできた研究内容を概説するとともに、とくに精巣発生・精子形成にかかわるホルモンの役割について最近の知見とともに述べたい。

Key Words : 精巣、精子形成、ホルモン

精巣発生におけるホルモンの役割

精巣は胎生期に未分化性腺から Y 染色体上に位置する *SRY* 遺伝子の働きで分化する[1]。ヒトでは胎生 6~8 週で性分化が進行し、46,XY では精巣が発生する。のちに精子形成細胞となる生殖細胞と体細胞である Sertoli 細胞・Leydig 細胞が形成され、Sertoli 細胞からは抗ミュラー管ホルモン（Anti-Mullerian Hormone: AMH）が、Leydig 細胞からはテストステロンが分泌される。AMH の作用によって、女性の内性器である子宮・膣・卵管などミュラー管由来の組織は退縮する。また、テストステロンは胎生 15 週前後に一過性の分泌亢進がおき、この期間に陰茎の増大や男性内性器（前立腺、精嚢、精管）の発育が促進される。

近年の基礎研究により、精巣発生には *SRY* 遺伝子をはじめとする複数の遺伝子発現が関与することが解明されつつある。従来、*SRY* 遺伝子がなければ精巣

発生は進行しないと考えられていたが、性分化疾患に関する遺伝子解析研究が進歩してきたことから、*SRY*遺伝子を持たなくても精巣が存在する症例が報告されるようになってきた。私たちの施設でも、染色体核型が46,XXで*SRY*遺伝子を持たないにも関わらず、性腺が精巣で外性器の男性化を示す症例を経験している。これらの患児には停留精巣や尿道下裂といった性腺・外性器の先天異常を伴うことが多い。私たちは停留精巣の手術時に生検した精巣組織を用い、46,XX^{SRY-}精巣組織と46,XY^{SRY+}精巣組織で発現する遺伝子群をPCR subtraction法を用いて比較した。その結果、*ROCK1*遺伝子が46,XX^{SRY-}精巣で有意に発現亢進していることを初めて報告した[2]。

この*ROCK1*遺伝子は、Rhoシグナル伝達系で複数遺伝子のリン酸化を通じてアクチン細胞骨格の再構成に働き、Sertoli細胞内で*SOX9*遺伝子を直接リン酸化することが報告されている。*SOX9*遺伝子は*SRY*遺伝子によって発現制御され、精巣発生にかかわることが既に明らかにされていることから、*SRY*遺伝子を持たない個体でも*ROCK1*遺伝子が*SOX9*遺伝子を活性化することで精巣発生が進行することが示唆された。さらに、同様の症例（染色体核型が46,XXで*SRY*遺伝子が陰性）4症例に共通する染色体構造異常についてCGHアレイ解析を用いて解析したところ、X染色体上の領域（Xp27.1）に共通したコピー数増加を認めた。この領域は*SOX3*遺伝子のエンハンサー領域と考えられており、*SOX3*遺伝子発現の亢進が精巣発生につながることを示唆された[3]（図1）。

図1

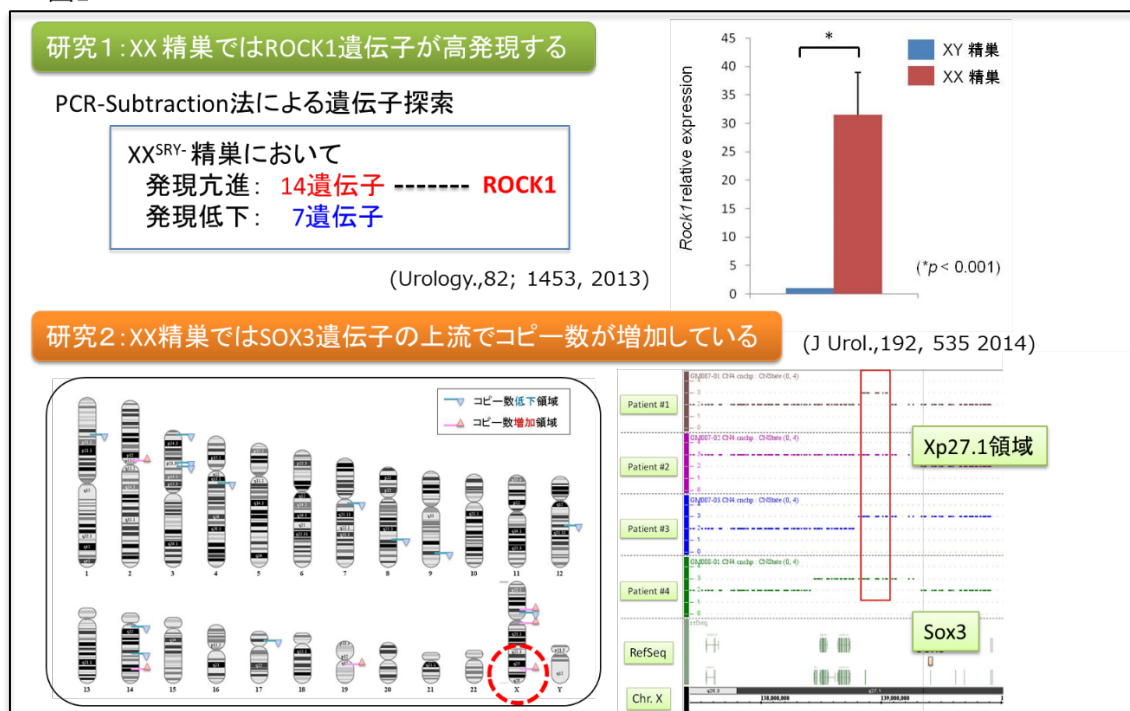


図1. 精巣発生にかかわる遺伝子・染色体解析研究

研究1: XY^{SRY+}精巣との比較により XX^{SRY-}精巣では14遺伝子が発現亢進、7

遺伝子が発現低下していることを明らかにした。さらに定量 PCR 法を用いて、*ROCK1* 遺伝子が XX^{SRY} 精巣で有意に発現亢進することを見いだした。研究 2：CGH アレイにより、XX 精巣を持つ患者に共通する染色体構造変化として、X 染色体上の Xp27.1 領域（点線）のコピー数増加を認めた。この領域は精巣発生にかかわる *SOX3* 遺伝子上流に位置しており、エンハンサー領域と考えられている。

SRY 遺伝子をはじめとする遺伝子制御機構により精巣が分化した後、精巣内の Sertoli 細胞からインヒビン、AMH などのホルモンが分泌される。インヒビンには構成されるサブユニットにより A と B に分けられるが、ヒトではインヒビン B が主要な形態である。後述するように、インヒビン B は TGF- β スーパーファミリーに属す糖タンパク質で、FSH の刺激を受けて分泌が亢進する。また、AMH はミューラー管由来の組織である子宮・卵管・膣の一部を退縮させる糖タンパク質である。AMH のその他の作用として、精巣の下降、Sertoli 細胞内のアロマターゼ活性の阻害、Leydig 細胞の分化促進、ステロイド合成の阻害などに関与することが報告されている[4]。こうした複数のホルモン作用により精巣発生が進行するとともに、男性内性器である前立腺・精嚢・精管が発育する。同時に陰茎・陰嚢など外性器の男性化も進む。

精巣下降におけるホルモンの役割

発生の進行にともない、分化した精巣組織は陰嚢内へと下降する。これまでの解剖学的・形態学的な研究から精巣下降は段階的に起きると考えられ、オーストラリアの Hutson によって精巣の下降は腎近傍から内鼠径輪までの“transabdominal phase”と、鼠径管を通り陰嚢底までの“inguinoscrotal phase”の二相性であるという説が提唱された[5]。その後、1999 年にドイツの Zimmermann、スイスの Nef らによってノックアウトマウスを用いた研究が行われ、*Ins13* 遺伝子が精巣下降の transabdominal phase に必要であることが報告された[6,7]。その他、現在までに *Hoxa10, 11* 遺伝子や *Rxfp2/Lgr8/Great* 遺伝子、*Desrt* 遺伝子など複数の遺伝子が精巣下降に関わると報告されている[8]。また、精巣下降の inguinoscrotal phase には、テストステロンが関与していると考えられている。

こうした精巣下降メカニズムをもとに、私たちは胎仔へ抗アンドロゲン剤を暴露することで停留精巣を高率に発生させる実験動物モデルを確立した[9]。臨床的には、アンドロゲン受容体の変異による停留精巣は androgen insensitivity syndrome など限られた症例のみで認められ、*INSL3* 遺伝子変異が認められる停留精巣は 2-3%程度と報告されている[10]。停留精巣の原因はホルモンだけで

なく遺伝子など複数の因子によるものと考えられるため、単一の遺伝子変異で説明できない孤発性の停留精巣の原因解明には、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析が有力な手段となりつつある[11][12]。

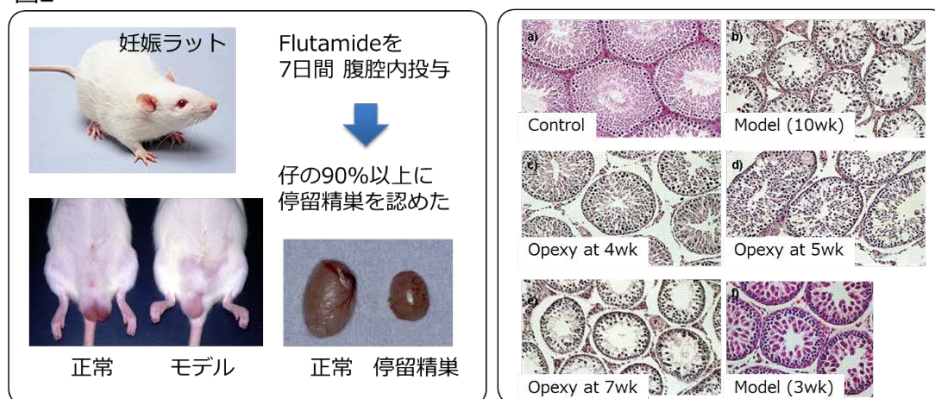
停留精巣における造精機能障害

停留精巣の主な合併症の一つに造精機能障害があり、そのメカニズム解明のため実験動物を用いた研究が行われてきた。生物学的な観点からは精子形成メカニズムの解明を目的として停留精巣を研究ツールの一つとみなし、複数の実験動物モデルが報告されている。さらに毒性学や環境生物学の観点からは、化学物質とくに内分泌攪乱物質が動物個体の生殖器官、ひいては生態系へ与える影響を解析するために、様々なモデル動物を用いた研究が報告されている。

私たちの確立した停留精巣モデル動物は発生率 90%以上で、精巣下降の *inguinoscrotal phase* が阻害されるため、精巣は腹腔の最下端に位置する。停留した精巣を放置すると重量が縮小し、組織学的には精細管の細小化と造精機能障害が認められた[9]。精子形成細胞数は低下し、TUNEL 陽性細胞数が増加していたことから、精子形成細胞のアポトーシス亢進が造精機能障害の一因と考えている[9]。また私たちは、このアポトーシスに転写因子 NF- κ B の活性化が関与することも明らかにした[13]。

この停留精巣モデル動物に精巣固定術を施したところ、造精機能障害が軽減することが判明し、さらにその効果は生後早期であればあるほど顕著であった[14]。このことは、臨床における早期の精巣固定術が将来の妊孕性維持に寄与することを支持するエビデンスと考えられる。しかしながら、いくら早期に手術をしても精子形成の完全な回復が見られないため、造精機能障害には、精巣がおかれた環境だけでなく内在性の要因も関与すると私たちは考えている (図 2)。

図2



(Mizuno K, Hayashi Y, et al. *Int J Urol*, 2007)

(Mizuno K, Hayashi Y, et al. *J Urol*, 2008)

図 2. 停留精巣動物モデルと精巣組織

妊娠母体へ抗アンドロゲン剤である flutamide 7.5mg/body を投与すると、出

生雄仔の90%以上に停留精巣を認めた。精巣重量は著明に低下し、組織学的には精細管の細小化、精子形成細胞数の減少が認められた。生後4週以降で精巣固定術を施行すると、早期手術が組織障害を抑制することが示された。

停留精巣における精子幹細胞の異常

停留精巣に適切な治療を行っても精子形成が完全に回復しないことから、精巣の構成細胞が何らかの形質変化を内包しているのではないかと考え、ヒト精巣組織を用いて研究を行った。精巣固定術を行う際に精巣生検を行い、下降精巣と遺伝子発現を網羅的に比較するため、PCR-subtraction法を用いた解析を行った。その結果、停留精巣組織で有意に発現亢進を認めた遺伝子として、*EEF1A1* 遺伝子、*TPT1* 遺伝子を同定した。これらの遺伝子はいずれも精子幹細胞で発現しており、精子幹細胞の未分化性を維持する *PLZF* 遺伝子との相互作用が示唆されることから、停留精巣では精子幹細胞に形質変化が起きていることが考えられた[15] (図3)。

図3

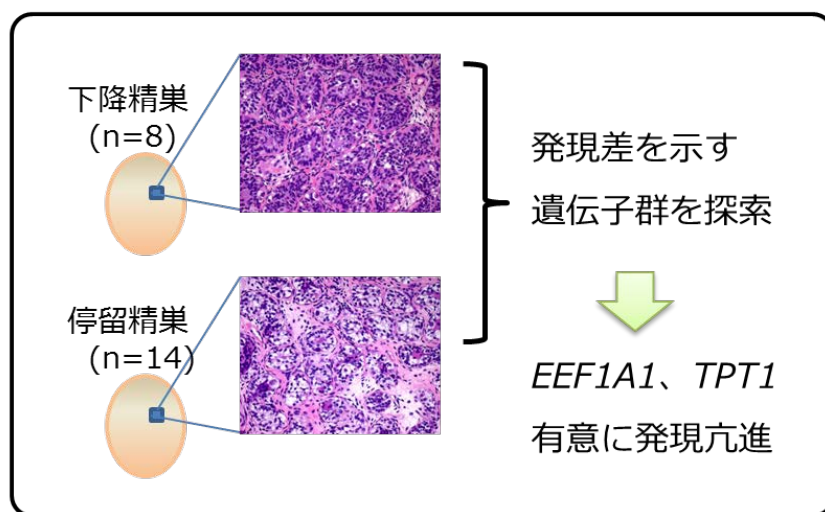


図3. ヒト停留精巣で特異的発現する遺伝子群の探索

ヒト精巣の生検組織を用いて、停留精巣で特異的発現する遺伝子群を網羅的に探索した。その結果、*EEF1A1* 遺伝子、*TPT1* 遺伝子が停留精巣で有意に発現亢進することを見いだした。

また、精子幹細胞の挙動を解明するために、私たちが確立した停留精巣モデルを用いて組織学的検討を行った。精子幹細胞とその前駆細胞 (gonocytes) で特異的に発現する *UTF1* 遺伝子をマーカーとして、精巣組織を経時的に観察したところ、下降精巣とくらべ停留精巣では未熟な精子幹細胞が多く、成熟し

た幹細胞が少ないことが明らかとなった[16]。また、生後早期に精巣固定術を行った症例を20年後に精液検査で検討した研究から、精巣固定術時に精子幹細胞を認めなかった症例では、認めた症例にくらべ有意に精子数が減少していた。このことから、幼少時の精子幹細胞が将来の造精機能へ重大な影響を及ぼすと考えられている[17]。

精子形成細胞は始生殖細胞から性分化過程をへて発生する。生後早期の精巣内には、精原細胞が存在し、形態学的特徴からA型、B型に分類される[18]。B型精原細胞から精母細胞が分化し、思春期以降に、精子細胞、成熟精子へと細胞分化と形態形成が進行する。A型精原細胞の一部は精子幹細胞と考えられており、前駆細胞から分化する(図4)。私たちのモデル動物を用いた検討では、成熟した精子幹細胞数が有意に減少していたことから、本モデル動物では前駆細胞から精子幹細胞へ分化する過程が障害されていることが判明した。つまり、本モデル動物は単に停留精巣モデルであると同時に、造精機能障害モデルでもあると考えられた。

図4

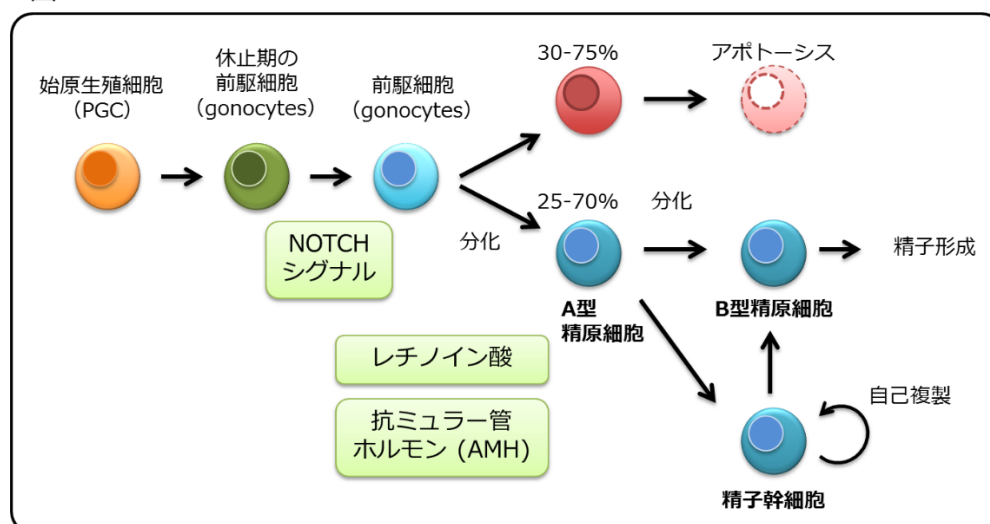


図4. 始生殖細胞から精子幹細胞への分化過程

始生殖細胞は前駆細胞 (gonocytes) をへて一部がA型精原細胞へ分化し、その一部が精子幹細胞となり精子の供給源としてはたらく。精原細胞は精母細胞、精子細胞へと減数分裂・分化して成熟精子となる。精子幹細胞への分化過程には、Notch シグナル伝達系や、レチノイン酸、AMHなどの因子がかかわることが報告されている。

精子幹細胞の分化にかかわる因子・ホルモンとは

精子形成細胞は、形態形成と細胞分化を行い未分化な状態から成熟精子となるが、光学顕微鏡・電子顕微鏡による形態学的観察から組織幹細胞の存在が予

測されていた。精子幹細胞が機能的に証明されたのは Brinster らによって精細管内への細胞移植技術が確立されて以後である。*GFP*や*LacZ*などレポーター遺伝子で標識した精子形成細胞を、造精機能障害を持つ別個体の精巣内に移植すると、ドナー由来の精子形成細胞が増殖し、コロニーを形成、最終的に成熟精子へ分化でき、産仔を得ることができたことから、精子幹細胞の存在が機能的に証明された[19]。実験動物を用いた研究では、精子幹細胞を体外で長期間培養でき、GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) が精子幹細胞の維持に必要であることが報告されている[20]。

精子幹細胞がどのように分化するか、その全容はいまだに明らかにされていない。これは精子幹細胞が精巣組織のわずか0.02-0.03%を占めるのみと非常に少数で[21]、その挙動を明らかにすることが技術的に困難であることが一因である。それでも詳細な形態学的観察から、精子幹細胞とその前駆細胞の成り立ちが解明されつつある。ラットやマウスなどのげっ歯類では、出生直前から生後1週の間には始生殖細胞から前駆細胞への分化が起こる。それぞれの細胞には特異的な細胞表面マーカー (*Oct4*, *c-Kit*, *Plzf*, *Utf1* など) が知られており[22]。これら細胞表面マーカーの発現変化によって細胞分化の状態を知ることができる。形態学的には前駆細胞 (gonocytes) は、精細管の中央付近に位置しているが、分化にともない辺縁付近に移動し精子幹細胞へ形質を変化させることが知られている。精細管の辺縁で、Sertoli 細胞や基底膜を構成する筋様細胞などに囲まれた微小環境はニッチ (Niche) と呼ばれ、幹細胞としての形質を維持するために必要と考えられている (図5)。

図5

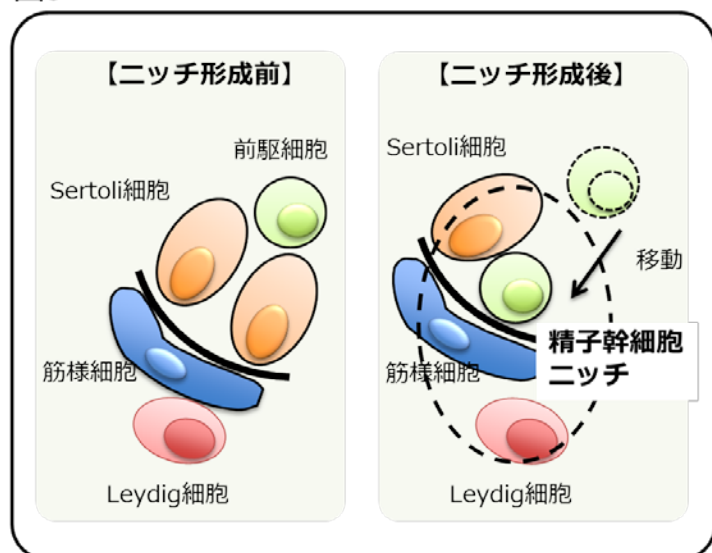


図5. 精子幹細胞のニッチ形成

ニッチ形成前には、精細管内には Sertoli 細胞、中央に前駆細胞が位置し、間質には Leydig 細胞が、精細管周囲には筋様細胞が位置している。精巣の発生

とともに前駆細胞は精細管の辺縁へと移動し、周囲の細胞から構成される微小環境（ニッチ）で幹細胞としての形質を獲得する。

前駆細胞から精子幹細胞への分化にかかわる因子としては、これまでにレチノイン酸（retinoic acid）[23]、AMH[24]の報告があり、最近では、*NOTCH*シグナル伝達系がかかわっているとの報告もある[25]。図4に示すように、前駆細胞から精子幹細胞の分化も多段階であることが解明されつつあるが、いまだその全容は解明されていない。

各ホルモンが精子形成へおよぼす作用

アンドロゲン

テストステロンは精巣内の主要なアンドロゲンであり、LHの刺激を受けたLeydig細胞内において、アンドロステジオンやジヒドロエピアンドロステロン（DHEA）などから合成されるステロイドホルモンである。5 α -reductaseの作用によりジヒドロテストステロン（DHT）に活性化される。アンドロゲンレセプター（androgen receptor : AR）と結合して標的細胞に作用するが、精巣内ではSertoli細胞、Leydig細胞、筋様細胞（peritubular myoid cells）にARが発現する[26]。また、Sertoli細胞におけるAR発現は、その時期によって異なり、新生児期には発現が低く成熟に従って発現が増強する。さらに、精細管ステージとAR発現は相関し、ラット・マウスではステージVII～VIII、ヒトではステージII～IIIで最も高い。

精子形成におけるアンドロゲンの作用は、ARを発現する各細胞を介して発揮される。Sertoli細胞特異的なAR欠損マウス（SCARKO）の研究から、精母細胞の維持や減数分裂の開始にかかわることや[27]、半数体細胞の維持・修復に必要であることが明らかにされている[28]。また、アンドロゲンはSertoli細胞と精子細胞との細胞接着や、精子の放出（spermiation）にもかかわることが報告されている[29]。

精原細胞の発生にはアンドロゲンは必須でないと考えられているが、AR発現が低下した精巣内では精原細胞数が減少する[30]ことから、Sertoli細胞や筋様細胞が細胞分化にかかわる可能性が示唆されている。実際、筋様細胞におけるAR欠損マウスでは精原細胞数が減少することが報告されている[31]。

エストロゲン

エストロゲンはアロマターゼの作用によりアンドロゲンから産生される。精巣と精巣上体の間に位置する精巣網（rete testis）ではエストロゲン濃度が高

いことが知られており、精巣上体における精子の成熟に何らかの役割を持つことが示唆されている[32]。また、エストロゲンは精原細胞やその前駆細胞（gonocytes）の増殖や分化へ影響することも報告されている[33]。その他、Fas ligand 経路を介した精子形成細胞のアポトーシスを誘導すること[34]の他、私たちは停留精巣モデル動物を用いた検討から、エストロゲン受容体（ER）のうち Leydig 細胞における ER α の発現増加が精巣組織内におけるホルモン不均衡を惹起し、このことが造精機能障害につながる可能性を報告している[35]。

レチノイン酸

レチノイン酸（retinoic acid; RA）はビタミン A の代謝産物である。ビタミン A 欠乏食を与えた動物が不妊となることから、RA が精子形成に重要であることが 1925 年にはじめて報告された[36]。精巣組織では精原細胞の分化・減数分裂の開始・血液精巣関門の形成・精子形成・精子成熟、などの過程にかかわることが報告されている[37]。RA は Sertoli 細胞や精子形成細胞にある酵素 Aldh1a1, Aldh1a2, Aldh1a3 などによって産生される。これら RA 合成酵素を欠損したマウスでは精原細胞の分化が停止し、RA 投与によって回復することも報告されている[36]。

RA は 2 種類の核内受容体（RA receptor (RARs) と retinoid X receptors (RXRs)) を介して細胞内へシグナル伝達する。RAR と RXR は、Leydig 細胞内にそれぞれ α , β , γ の計 6 種類が存在し、ヘテロ二量体を形成し核内移行して遺伝子発現制御を行う。Leydig 細胞における RA のはたらきは不明な点が多かったが、近年の研究から、RA が STAR・CYP17A1 などステロイド合成にかかわるタンパク質の産生を増やしテストステロン合成を調節することや、ビタミン A 欠損動物では HSD3B1 活性が低下すること、RAR α 欠損マウスではテストステロン合成が障害され精子形成細胞のアポトーシスが亢進することなどが報告されている[37]。

ビタミン A 欠損動物の精巣組織では、未分化な精原細胞が増加することから、RA は精原細胞の分化にかかわることが示唆されている。未分化な精原細胞や Sertoli 細胞には RA 受容体が発現しており、RA シグナルによって *Stra8*, *Sall4*, *Kit* などの遺伝子発現が制御され細胞分化にかかわると報告されている[36]。

インヒビン

インヒビンは主に Sertoli 細胞から産生される糖タンパク質であり、思春期後では精子形成細胞からも産生されることが報告されている[38]。インヒビン

は、インヒビン α と β のヘテロ二量体で構成されており、Type II activin receptor (AcrRII, ActRIIB) と betaglycan (TGFB3) の複合体で構成される受容体と結合し、作用を発揮する。インヒビン α と βA で構成されるインヒビン A と、 α と βB で構成されるインヒビン B の 2 種類があるが、精巣組織では、インヒビン B が働く。精巣発生や精子形成における生理的役割は解明されていないが、精原細胞数と関連することや、FSH 刺激によって分泌が亢進することが報告されている[39]。臨床的には精巣機能を反映する指標として用いる試みが以前からされており、停留精巣ではインヒビン B 値が有意に低く[40]、精巣固定術を行うと上昇すること[41]が報告されている。一方で、過去には精巣の位置とインヒビン B 値との関連がないとする報告もあり、今後さらに詳細な研究が望まれる[42]。

アクチビン

アクチビンはインヒビンと同じ TGF- β ファミリーに属し、FSH 刺激で分泌されるサイトカインとしてインヒビンの反対の作用を持つものとして同定された。インヒビン βA (Inhba) と βB サブユニットが複数のヘテロ二量体を形成し、それらの組み合わせによってアクチビン A~E の 5 種類が存在する[43]。動物種や成熟段階によっても異なるが、精巣内では精子形成細胞、Sertoli 細胞、Leydig 細胞、筋様細胞など複数の細胞で存在することが報告されている[43]。

アクチビンは細胞膜上に存在する Activin receptor type II、type I と結合し細胞内の Smad2、Smad3 のリン酸化によりシグナル伝達を行う。インヒビンや Follistatin の結合によりアクチビンの生理活性が抑制され、アクチビン A を欠損する Inhba^{-/-}マウスでは精巣重量は有意に低下し、Sertoli 細胞数の減少が認められた[44]。アクチビンは幼若期の Sertoli 細胞の成熟[45]や、成熟期には Sertoli 細胞間の tight junction を制御して精子の管腔内への放出 (spermiation) に関与することが報告されている[46]。

FSH

精巣における FSH 受容体 (FSHR) は Sertoli 細胞だけに発現しており、ラット精巣では精細管ステージ XIII~II に最も強く発現する。FSHR は細胞膜上にある G タンパク結合型受容体で、cAMP や MAP kinase など複数の経路で細胞内へシグナルを伝達する[28]。FSH は Sertoli 細胞の増殖・機能を制御しており、FSH 機能を欠損させたマウスでは、Sertoli 細胞数とともに精子数も減少する[47]。また、FSH は精原細胞のアポトーシスを抑制することで、精原細胞数を維持する[28]。精原細胞の前駆細胞 (Gonocytes) の成熟には Sertoli

細胞から分泌される SCF が必要とされるが、FSH は SCF の産生を制御することで精原細胞分化にかかわると考えられている。

また、FSH はテストステロンと協調的に作用し、Sertoli 細胞の形態・機能を制御するとともに、精子形成細胞（とくに精母細胞、円形精子細胞）のアポトーシスも抑制することが報告されている[28]。その他、成熟精子を放出する際、テストステロンと強調して $\beta 1$ -integrin を介した制御にかかわることも報告されている[28]。

甲状腺ホルモン

甲状腺ホルモン (thyroid hormone) には thyroxine (T4)、triiodothyronine (T3) があり、核内受容体である甲状腺ホルモン受容体と結合してホルモン活性を発揮する。甲状腺ホルモンは脳の発生、心機能、組織の代謝など多くの作用を有するが、精巣では甲状腺ホルモン受容体は Sertoli 細胞に存在し、ステロイド合成や、精子形成に影響することが報告されている[48]。幼若期の精巣では一過性の甲状腺機能低下は、Sertoli 細胞の分化・増殖を抑制し、精子形成を阻害する。また逆に、幼若期の T3 投与が精原細胞数を増加させることも報告されている[49]。

おわりに

これまで述べてきたように、アンドロゲンだけでなく、非常に多くのホルモンが精巣の発生・下降や精子形成にかかわることが報告されている。また、各ホルモンは複雑なネットワークやフィードバック経路により制御され、発生段階や細胞種によって機能が異なる。さらに、生体内の濃度や暴露される期間によっても与える影響が異なり、全体像を把握するのは容易ではない。しかし、精巣発生・下降の異常や造精機能障害など、それぞれの病態への各ホルモンのかかわりを解明することができれば、成育医療や生殖医療における新しい診断や治療法の開発へ応用できると考えられる。

【参考文献】

1. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 1991;351: 117–121.
2. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Kohri K, et al. Gene expression profile during testicular development in patients with SRY-negative 46,XX testicular disorder of sex development. *Urology*. 2013;82: 1453.e1–7.
3. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Nakane A, et al. Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome wide analyses. *J Urol*. 2014;192: 535–541.
4. Iliadou PK, Tsametis C, Kaprara A, Papadimas I, Goulis DG. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones*. 2015;14: 504–514.
5. Hutson JM. A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet*. 1985;2: 419–421.
6. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, et al. Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol*. 1999;13: 681–691.
7. Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet*. 1999;22: 295–299.
8. Kojima Y, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Advances in molecular genetics of cryptorchidism. *Urology*. 2009;74: 571–578.
9. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Influence for testicular development and histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. *Int J Urol*. 2007;14: 67–72.
10. Barthold JS, Wang Y, Kolon TF, Kollin C, Nordenskjold A, Olivant Fisher A, et al. Pathway analysis supports association of nonsyndromic cryptorchidism with genetic loci linked to cytoskeleton-dependent functions. *Hum Reprod*. 2015;30: 2439–2451.
11. Dalgaard MD, Weinhold N, Edsgård D, Silver JD, Pers TH, Nielsen JE, et al. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J Med Genet*. 2012;49: 58–65.
12. Wang Y, Li J, Kolon TF, Olivant Fisher A, Figueroa TE, BaniHani AH, et al. Genomic copy number variation association study in Caucasian patients with nonsyndromic cryptorchidism. *BMC Urol*. 2016;16: 62.
13. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF- κ B associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model. *Urology*. 2009;73: 389–393.
14. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Early orchiopexy improves subsequent testicular development and spermatogenesis in the experimental cryptorchid rat model. *J Urol*. 2008;179: 1195–1199.

15. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Kohri K, et al. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol.* 2009;181: 1330–7; discussion 1337.
16. Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Hayashi Y, Kohri K. Attenuation of spermatogonial stem cell activity in cryptorchid testes. *J Urol.* 2012;187: 1047–1052.
17. Hadziselimovic F, Herzog B. The importance of both an early orchidopexy and germ cell maturation for fertility. *Lancet.* 2001;358: 1156–1157.
18. Clermont Y, Perey B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat.* 1957;100: 241–267.
19. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91: 11298–11302.
20. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod.* 2003;69: 612–616.
21. Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Lei Z, Rao CV, Shinohara T. The luteinizing hormone-testosterone pathway regulates mouse spermatogonial stem cell self-renewal by suppressing WNT5A expression in Sertoli Cells. *Stem Cell Reports.* 2016;7: 279–291.
22. Culty M. Gonocytes, from the fifties to the present: Is there a reason to change the name? *Biol Reprod.* 2013;89: 1–6.
23. Wang Y, Culty M. Identification and distribution of a novel platelet-derived growth factor receptor beta variant: effect of retinoic acid and involvement in cell differentiation. *Endocrinology.* 2007;148: 2233–2250.
24. Zhou B, Hutson JM. Human chorionic gonadotropin (hCG) fails to stimulate gonocyte differentiation in newborn mouse testes in organ culture. *J Urol.* 1995;153: 501–505.
25. Garcia TX, DeFalco T, Capel B, Hofmann M-C. Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Dev Biol.* 2013;377: 188–201.
26. Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology.* 1994;135: 1227–1234.
27. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PTK, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, et al. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 1327–1332.
28. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol.* 2010;205: 117–131.
29. O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis.* 2011;1: 14–35.

30. Tan KAL, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PTK, et al. The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology*. 2005;146: 2674–2683.
31. Welsh M, Saunders PTK, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J*. 2009;23: 4218–4230.
32. Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones*. 2015;14: 479–503.
33. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001;22: 289–318.
34. Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365: 1501–1515.
35. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. *Urology*. 2011;77: 251 e1–6.
36. Endo T, Mikedis MM, Nicholls PK, Page DC, de Rooij DG. Retinoic acid and germ cell development in the ovary and testis. *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9120775
37. Jauregui EJ, Mitchell D, Topping T, Hogarth CA, Griswold MD. Retinoic acid receptor signaling is necessary in steroidogenic cells for normal spermatogenesis and epididymal function. *Development*. 2018;145. doi:10.1242/dev.160465
38. Radicioni AF, Anzuini A, De Marco E, Nofroni I, Castracane VD, Lenzi A. Changes in serum inhibin B during normal male puberty. *Eur J Endocrinol*. 2005;152: 403–409.
39. Longui CA, Arnhold IJ, Mendonca BB, D'Ostvaldo AF, Bloise W. Serum inhibin levels before and after gonadotropin stimulation in cryptorchid boys under age 4 years. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 1998;11: 687–692.
40. Hamdi SM, Almont T, Galinier P, Mieusset R, Thonneau P. Altered secretion of Sertoli cells hormones in 2-year-old prepubertal cryptorchid boys: a cross-sectional study. *Andrology*. 2017;5: 783–789.
41. Irkilata HC, Yildirim I, Onguru O, Aydur E, Musabak U, Dayanc M. The influence of orchiopexy on serum inhibin B level: relationship with histology. *J Urol*. 2004;172: 2402–5; discussion 2405.
42. Esposito S, Cofini M, Rigante D, Leonardi A, Lucchetti L, Cipolla C, et al. Inhibin B in healthy and cryptorchid boys. *Ital J Pediatr*. 2018;44: 81.
43. Wijayarathna R, de Kretser DM. Activins in reproductive biology and beyond. *Hum Reprod Update*. 2016;22: 342–357.
44. Mendis SHS, Meachem SJ, Sarraj MA, Loveland KL. Activin A balances Sertoli and germ cell proliferation in the fetal mouse testis. *Biol Reprod*. 2011;84: 379–391.

45. Buzzard JJ, Farnworth PG, De Kretser DM, O'Connor AE, Wreford NG, Morrison JR. Proliferative phase sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. *Endocrinology*. 2003;144: 474–483.
46. Nicholls PK, Stanton PG, Chen JL, Olcorn JS, Haverfield JT, Qian H, et al. Activin signaling regulates Sertoli cell differentiation and function. *Endocrinology*. 2012;153: 6065–6077.
47. Grover A, Sairam MR, Smith CE, Hermo L. Structural and functional modifications of sertoli cells in the testis of adult follicle-stimulating hormone receptor knockout mice. *Biol Reprod*. 2004;71: 117–129.
48. Hernandez A. Thyroid hormone role and economy in the developing testis. *Vitam Horm*. 2018;106: 473–500.
49. Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Orkisz S, Slowikowska-Hilczer J. Triiodothyronine modulates initiation of spermatogenesis in rats depending on treatment timing and blood level of the hormone. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;341: 25–34.