

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659711

研究課題名(和文) 幹細胞を用いた障害精巣の賦活化の検討

研究課題名(英文) The activation of injured testis by a novel system of using mesenchymal stem cell

研究代表者

高山 達也 (TAKAYAMA, TATSUYA)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：少子化が国家的問題として注目されている現在、男子不妊症も解決されなければならない大きなテーマである。今回、我々は体細胞由来幹細胞の一つである間葉系幹細胞を不妊モデル雄ラットに移植し、精子産生能を復活または正常化させることに成功した。また、細胞融合や造腫瘍性がないこと、その精子産生は移植した細胞からの精子への分化誘導ではないことを示し、安全性も確認した。今後はヒトへの応用を視野にブタ等の大動物での検討を開始した。

研究成果の概要(英文)：Decline birth rate is national problem in Japan. It is also expected that male infertility comes to a settlement. We achieved the activation of injured testis in rat by the novel methods of using mesenchymal stem cell (MSC) which is one of stem cells derived from somatic cells. In this model, there was neither cell fusion nor tumorigenicity. Sperm production was not derived from transfected MSC but host origin. Taking the application to human into consideration, we are now starting to try pig experiment.

研究分野：泌尿器癌、尿路結石症、腎移植、男子不妊症

キーワード：間葉系幹細胞 不妊症 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 我が国において、10組に1組の割合の夫婦が不妊の状態にあると云われており、年々増加傾向にある。不妊の原因の多くは男性側の無精子症・精子減少症・陰茎勃起不全・性器形態異常などで、特に『無精子症』と『精子減少症』が大部分を占めている。
- (2) 無精子症は『閉塞性無精子症』と『非閉塞性無精子症』に分類され、さらに非閉塞性無精子症は下垂体や視床下部から分泌される『ホルモン異常』と精子を産生する場所である『精巣異常』の2種類に細分化される。ホルモン異常の場合は体外からホルモン投与することにより不妊治療が可能であり、これまでにヒト精子成熟停止状態に成長ホルモンの誘導が有用であることを報告した(*Int J Urol* **12**: 815-20 (2005))。また、精巣異常の場合には『顕微鏡下精巣内精子採取術 (MD-TESE)』により(*Hum Reprod* **14**: 131-135 (1999))、精子形成されている部位を特定し、回収する手術が行われる。
- (3) 近年、MD-TESE は改良および技術向上に伴い不妊治療に貢献しているが(*Arch Androl.* **53**: 63-65 (2007); *Fertil Steril.* **90**: e5-7 (2008))、患者に対する侵襲性が高く、また再手術の必要な場合も多いことから新しい治療法の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

- (1) 体細胞由来幹細胞の一つである間葉系幹細胞を不妊モデル雄ラットに移植し、精子産生能を復活または正常化させることを目的としている。
- (2) 種々の蛍光標識遺伝子を組み込んだ遺伝子改変ラットを用いて『細胞融

合や造腫瘍性の否定』・『移植細胞から精子へと分化誘導する可能性の否定』を確認すると同時に、『治療効果』・『安全性』を明確にする。

## 3. 研究の方法

- (1) 野生型 LEW 雄ラットの精巣 (陰囊) を 42 に設定した恒温槽に浸し、熱処理により不妊化する。麻酔下にて 15 分、30 分、45 分、60 分の各条件で精巣を加温処理し、加温処理 24 時間後に精巣を摘出して病理検討を行った。各ポイントで摘出した精巣の病理標本を作製し、精巣構造の維持、精子形成の有無について評価した。
- (2) 自治医科大学で樹立されたイメージング用遺伝子組み換えラットから皮下脂肪を摘出し、脂肪組織由来間葉系幹細胞を樹立した。樹立した細胞は、キャラクターは膜抗原の発現有無 (CD29, CD31, CD34, CD105) および骨・軟骨・脂肪細胞への分化誘導の確認を行い、既に報告のある間葉系幹細胞と同じであることを確認する。
- (3) 精巣への細胞移植ルートの確定の目的で、陰茎静脈からの投与、局所的 (精巣) 投与、尾静脈からの投与の 3 つの方法を検討した。移植に使用する細胞は、細胞動態が視覚化可能である in vivo imaging system (IVIS100) と Luciferase-Tg ラット由来 MSCs を用いて移植細胞の精巣への到達性などを評価した。
- (4) 移植した MSCs は 3~5 日で消失する事が報告されている。そこで、オス不妊モデルラットに  $5.0 \times 10^5$  細胞を一週間に 1, 2, 3 の各回数に振って精巣に移植し、反復投与の有効性についての評価を移植 3 週間目に精巣を摘出し、病理標本にて行った。
- (5) 不妊モデルオスラット治療群 (脂肪

組織由来間葉系幹細胞投与群)と非治療群(生理食塩水投与群)の2群に分けて、8週齢メスの野生型 LEW ラットと交配を行い、生殖機能の治療効果について検討した。

- (6) 移植した細胞が宿主細胞とフュージョンする可能性を検討する為に、EGFP 遺伝子を組込んだ不妊モデル Tg ラットを加温処置により不妊化し、Luciferase 遺伝子を組込んだ Tg ラット由来間葉系幹細胞を移植した。評価は Living imaging system (IVIS100)を用いて実施した。移植3週間後に精巣を摘出し、抗 EGFP 抗体と抗 Luciferase 抗体を用いて多重染色を行った。
- (7) 移植した細胞の造腫瘍性を確認する目的で、不妊モデルオスラットおよび野生型オスラットの精巣内に脂肪組織由来間葉系幹細胞を移植し、6か月間の観察実験を行った。
- (8) 生殖能力が皆無になった高齢 LEW 雄ラット(24週齢)に間葉系幹細胞を移植し、精子形成の再開の可能性について調査を行った。細胞移植1週間後に LEW 雌ラットと交配させ、新生児の有無や個体数について評価した(単回投与)。
- (9) 温熱処理による不妊モデルラットの精巣内に、「分子量カラム」と「MSC を2日間培養した無血清培養液」を用いて作製した濃縮 MSC 分泌因子液を3日間毎に3回の反復投与を行った。3回の投与が終了し、3週間後に8週齢雌ラットと交配させ、新生児の有無について検討した。
- (10) 前臨床試験を行う為に、先端医療技術開発センター内にて家畜ブタ(30kg)の不妊モデル作製条件の検討を行った(n=1)。全身麻酔下にて

下腹部を切開し、精嚢から精巣を引き出し、42℃に保温した生理食塩水に30分間浸した。加温処理後に精巣を精嚢に戻し、60分後に精巣を摘出して、病理作製を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 加温処置15分間では非熱処理と殆ど変化が見られなかったが、30分以上のサンプルで精原細胞等の肥大化や空洞化が確認された。45分と60分熱処理群においては精巣内部で出血が確認された為、本研究では30分の熱処理を採用する事にした。
- (2) 樹立した細胞は、既に報告のある間葉系幹細胞と同等であることを確認した。
- (3) 陰嚢を切開して精巣を露出させ、直接細胞移植を行った結果、効率良く移植細胞が集積した。しかし露出した精巣の被膜修復や陰嚢に戻す操作が煩雑である事から、切開をせずに直接、精巣に細胞を移植した結果、精巣を露出した場合と同様の集積が確認された。一方、陰茎静脈投与の場合、肺への集積が顕著であった為、本研究では投与方法として不採用とした。
- (4) 1回投与群では細胞移植していない不妊モデルラット群と同レベルの HE 像および PCNA 陽性率であった。しかし、3回投与群においては正常ラットと同レベルの HE 像および PCNA 陽性率であった。また抗 Luciferase 抗体を用いて免疫染色を行った結果、全例で Luciferase 陽性細胞(移植した間葉系幹細胞)は確認されなかった。
- (5) 治療群においてはメス1匹あたり2~4匹の出産が確認されたが、一方、非治療群においてはメス1匹あたり

0~1 匹 (メス 5 匹中 1 匹が出産) の出産成績であった。野生型オスラットメスを交配した場合、メス 1 匹あたり 4~8 匹の出産が確認されている事から、生殖機能が完全に回復したとは考えられないが、少なくとも有効である事が判明した。

- (6) 抗 EGFP 抗体および抗 Luciferase 抗体による多重染色を行った。その結果、Luciferase 抗体に反応した細胞の存在は確認されなかった。そこで、細胞移植 3 日目の組織を免疫染色にて確認した結果、EGFP 陽性細胞と Luciferase 陽性細胞がそれぞれ独立して存在している像が確認された。次に EGFP 遺伝子を組込んだメスラットと交配し、出産した新生児を蛍光顕微鏡および IVIS を用いて確認した結果、EGFP 陽性個体は確認されたが、Luciferase 陽性個体および Luciferase-EGFP 二重陽性個体の出産は確認されなかった。
- (7) 見かけ上では精巣の肥大化など腫瘍性が疑われる所見は確認されなかった。また、精巣の病理学的検査を行った結果においても腫瘍性を示す像は確認されなかった。
- (8) 高齢雄ラットに MSC を単回投与して治療した結果、雌ラットで妊娠は確認出来なかった。しかし、精巣を摘出して病理標本 (HE 染色) を作製した結果、細胞移植治療群には精子の形成が確認され、少なくとも生殖細胞の賦活化に移植細胞が寄与している事が確認された。
- (9) 3 回の投与が終了し、3 週間後に 8 週齢雌ラットと交配した結果、投与群では雌ラット 1 匹から 1~2 匹の出産が確認された (5 匹中 4 匹)。一方、非治療群においては 1 匹も新生児が

得られなかった (3 匹)。以上の結果より、MSC を直接投与する場合よりも効果は弱い、少なくとも MSC 分泌因子に精巣賦活効果を有する物質が含まれている事が明らかとなった。

- (10) 病理の結果、精巣周辺領域では精巣の細部構造の破綻が確認されたが、中心付近の領域は正常である事が HE 染色で明らかとなった。大動物 (ブタ) での雄性不妊化には加温時間をラットで決定した 30 分から更に延長する必要があると判断した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)  
[学会発表] (計 0 件)  
[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等 <http://www.jichi.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高山達也 (TAKAYAMA TATSUYA)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90324350

##### (2) 研究分担者

大園誠一郎 (OZONO SEIICHIROU)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00183228

高岡直央 (TAKAOKA NAOHISA)  
浜松医科大学・医学部・研究員  
研究者番号: 30467229

寺谷 工 (TERATANI TAKUMI)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70373404