

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：35303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22748

研究課題名（和文）精原細胞ニッチを再構築する新たな移植法の異種移植への応用

研究課題名（英文）Reconstruction of germ cell niche for xenogeneic transplantation

研究代表者

横西 哲広（Yokonishi, Tetsuhiro）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40881008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、男性がん患者の妊孕性の温存方法の確立のため、マウス精巣内での異種精巣の再構築を目標としている。ブスルファンによって精原細胞を除去後に、ベンザルコニウム塩化物を精細管内投与することでセルトリ細胞を除去した宿主マウスにCAG-EGFPマウスの精巣細胞を移植したところ、ドナーの精原細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞や筋様細胞の定着率を改善することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児がんに対する放射線や抗がん剤治療の晩期合併症に不妊症がある。精子凍結保存ができない性未成熟な男性がん患者の妊孕性の温存方法は確立されていない。がん治療前に精巣組織を凍結保存し、必要時に解凍して自身に移植する方法が考えられるが、混入したがんの再発の危険がある。そこで、凍結した精巣細胞または組織をマウスに移植して、精子が得られれば安全である。しかし、ヒト精巣組織や精子のもとである精原細胞をマウスに移植しても精子形成は進行しない。そこで、本研究では、マウスの精細管を空にした精巣内にヒト精巣細胞を移植することで、マウス精巣の一部をヒト精巣細胞に置換し、ヒト精巣を再構築させ、ヒト精子形成を実現させる。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on recreating xenogeneic testis in the mouse testis to develop a novel strategy for preserving the fertility of young cancer patients. Busulfan ip treatment followed by Benzalkonium chloride (BC) injection into seminiferous tubules of host mouse increased the colonization efficiency of donor Spermatogonia, Sertoli cells, Leydig cells and myoid cells cultivated from CAG-EGFP mouse. This method would be a powerful tool for xenogeneic transplantation.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：精子形成 妊孕性 精原細胞 異種移植

1. 研究開始当初の背景

近年のがん治療の発展によって、小児がん患者の生存率が飛躍的に改善された。その結果、小児がんサバイバーの晩期合併症である不妊症が問題となっている。精子凍結保存は妊孕性の温存法として確立しているが、精子が得られない性未成熟な男性患者には応用できない。そこで、がん治療前に精原細胞や精巣組織を凍結保存し、必要時に解凍して精子まで分化誘導させる技術が必要である。そこで、凍結保存した精巣細胞や精巣組織を自家移植または異種移植することが挙げられる。自家移植法では、検体中にごん細胞が混和している危険性が懸念され、臨床応用にはハードルが高い。一方、異種移植法は、がんの再発の可能性は低く、侵襲性も低いが、ヒト精原細胞やヒト精巣組織をマウスの精巣に移植した過去の研究では、ヒト精原細胞はマウスの精細管内に定着して長期間生存するが、精子形成は誘導されず、移植されたヒト精巣組織はマウス精巣内で線維化し、ヒト精子形成は誘導されなかった。

申請者は、異種精細管内移植に立ち戻り、マウスの精原細胞ニッチが、異種の精子形成を支持できないと考え、精原細胞ニッチを再構築する技術を探索した。その結果、申請者は、2020年にベンザルコニウム塩化物(Benzalkonium Chloride; BC)を宿主マウス精巣内に注入することで、精原細胞ニッチを構成する代表的なセルトリ細胞を除去することを発見した。本薬剤で処理した精巣に別個体の精巣細胞を移植することで、精原細胞ニッチであるセルトリ細胞、ライディッシュ細胞や筋様細胞と精原細胞の再構築に、世界で初めて成功した(Yokonishi, Nat Commun. 2020)。

2. 研究の目的

さらなる研究発展に向け、本システムには移植効率の改善やドナー由来の精子の完成度の証明、さらに異種移植の挑戦が必要であり、臨床応用に向け、本システムは移植効率の改善とドナー由来の精子の完成度の証明、さらに異種移植への挑戦が課題である。本研究では、申請者が開発したマウス精原細胞ニッチの再構築法に、ブスルファン投与を追加することで、同種移植の精原細胞と精原細胞ニッチの再構築効率が向上するか検証した。先ず、①ブスルファン投与とBC注入によるマウス精巣への影響を観察した。次に、②ブスルファン投与とBC注入を組み合わせたマウス宿主に同種移植をおこなった。

3. 研究の方法

①ブスルファン投与+BC投与による精巣細胞への影響

6週齢のB6マウスをブスルファン投与群、ブスルファン投与+BC注入群と、BC注入群に分けた。BC投与後に精巣を回収し、HE染色にて精巣の構造と影響を受けた精細管を定量した。免疫染色にて精原細胞、セルトリ細胞、ライディッシュ細胞や筋様細胞の個数を測定した。

②精細管内移植

6週齢のB6マウスをブスルファン投与群、ブスルファン投与+BC注入群と、BC注入群に分けた。全身の細胞にGFPを発現するCAG-GFP B6マウスの新生仔精巣細胞を両群に移植した。移植8週後に各群の宿主精巣を固定した。免疫染色にてドナー由来(GFP陽性)の精原細胞ニッチの再構築割合を算出した。

4. 研究成果

①ブスルファン投与+BC投与による精巣細胞への影響

アルキル化剤のブスルファンの腹腔投与は、精原細胞を死滅させる。このため、アルキル化剤は精原細胞移植の宿主の前処置として使用されている。ブスルファン腹腔投与後の精巣にBCを注入し、精巣の構造と構成する細胞集団を観察した。

ブスルファンを腹腔投与し、4週間後に精巣内にPBSを注入した群を観察すると、生殖細胞は除去されたが、セルトリ細胞数はコントロールと変わらず精細管内に生存することを確認した。ブスルファンの溶媒(コントロール)を腹腔内投与し、4週後のマウス精巣にBCを注入した群

と、ブスルファン投与4週間後にBCを精巣内に注入した群に分けてセルトリ細胞の除去率を比較した。プレリミナリーな結果であるが、ブスルファン投与+BC注入群では、セルトリ細胞数の減少は同等度であったが、生殖細胞が残存する精細管の率は低下した。また、ブスルファン投与+BC注入群においても、管腔構造は維持され、間質に存在する細胞のポピュレーションに影響は与えなかった。

②精細管内移植

次に、ブスルファン投与+BC群、ブスルファン投与群、BC投与群に同種移植をおこなった。ブスルファン投与群では、ドナー精原細胞の定着と、その精子形成を認めた。一部に、ごく少数のセルトリ細胞の定着を認めたが、間質細胞の定着は認めなかった。BC群では、精原細胞、セルトリ細胞と間質細胞の定着は約半数に認め、ドナー由来の精子形成を認めた。ブスルファン投与+BC群においては、ドナー精原細胞の定着はすべてに認め、多数のセルトリ細胞の定着もほぼ全てに認めた(図A)。ライディッヒ細胞と筋様細胞の定着も半数以上に認め、精子形成も確認できた(図B)。

BC注入にブスルファン投与を加えることで、ドナー精巣細胞の定着率が向上したことから、異種移植の前処置としても有効な手法であると考えられた。

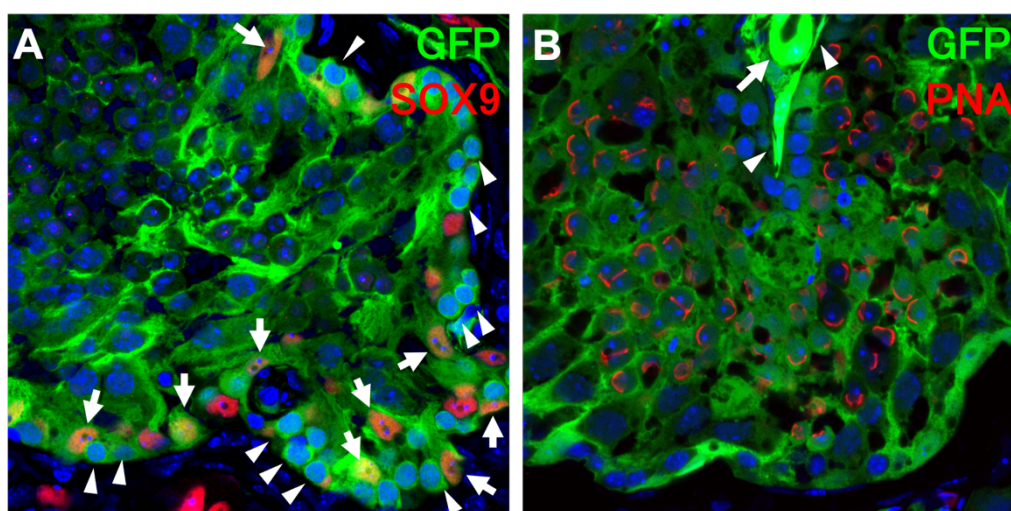


図 ブスルファン投与+BC注入した宿主へのCAG-GFPマウス精巣細胞移植。移植2ヶ月後。A) ドナーのセルトリ細胞(矢印)と精原細胞(矢頭)の定着が確認された。B) ドナー由来の精子細胞(PNA陽性)を多数管腔内に認めた。間質には、ドナー由来のライディッヒ細胞(矢印)と筋様細胞(矢頭)の定着を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横西哲広
2. 発表標題 精子幹細胞ニッチの再構築を用いた精子形成不全症とヒト精巢化マウスへの試み
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------