

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 橋本 雪司

横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科

副査 横浜市立大学附属市民総合医療センター

副査 横浜市立大学附属市民総合医療センター

組織学 主任教授 大保和之

病理診断科 准教授 堀井 理絵

婦人科 講師 葉山 智工

## Culture-Space Control is Effective in Promoting Haploid Cell Formation and Spermiogenesis In Vitro in Neonatal Mice

培養空間制御がもたらす新生児マウスの半数体形成と体外精子完成の促進効果

### 1. 序論

2018年,我々の研究グループは,ポリジメチルシロキサン(Polydimethylsiloxane:PDMS)というシリコン樹脂を用いて作製したチップを培養組織に被覆する器官培養法を開発した(PDMS-ceiling method:PC法)(Kojima, 2018).PC法は,培養組織を平坦化させることで酸素・栄養素の供給を均一化し,精子形成効率の向上をもたらす(Komeya, 2019).また,培養空間の高さが規定されるため,培養組織の組織体積変化を正確に,かつ経時的に測定することが可能である.ここでは,このPC法を用いて培養空間の制御がもたらす精巣組織の体積変化と精子形成効率について調査した.そして,PC法を用いた体外培養系が生殖毒性試験として有用である可能性について検証した.

### 2. 実験材料と方法

マウス精子形成の進行を2段階で評価可能な*Acrosine-GFP/H3.3-cherry*ダブルトランスジェニックマウスの新生仔(1.5日齢)を使用した.精巣を摘出,白膜を剥離した後,顕微鏡下に鑷子で細切した.その細切した組織片を,アガロースゲル上に置き,PCチップを被せて器官培養を行った.PCチップは,60 $\mu$ m,100 $\mu$ m,160 $\mu$ mの3種類の溝の深さを用意した(PC60,PC100,PC160).更に,培養2週目にPCチップの溝の深さを100 $\mu$ mから160 $\mu$ mに変更する培養法も設定した(PC-replacement:PC-r).培養には,基礎培地である $\alpha$ MEMに血清成分としてAlbuMAX<sup>®</sup>を40mg/mLで溶解した培地を使用した.実体顕微鏡で撮影した培養組織の水平投影面積を画像解析ソフトによって測定し,PCチップの溝の深さを乗じて組織体積を算出した.各培養群を比較するため,各実験における培養7日目を基点とし組織体積変化率を算出した.実体顕微鏡下にGFPの発現面積比を経時的に記録し,精子形成効率を評価した.培養終了後に,培養精巣組織の免疫化学組織蛍光染色を行い,核の形態変化と染色パターンにより精子形成の進行度を分類し,半数体形成効率を評価した.[酸素濃度実験]インキュベーターの酸素濃度を20%,15%,10%に設定し,PC-rで培養を行った.[毒性実験]Ethinyl Estradiol(EE)を0,0.01,0.1,1.0nMの濃度で溶解した培養液を用いてPC-rで培養を行い,その毒性評価について検証した.また,PC法を用いた培養系において,Cisplatinを0,0.4,1,4,12,40 $\mu$

g/mL の濃度で溶解した培養液を 24 時間暴露し、その毒性評価について検証した。全ての動物実験は、横浜市立大学医学部等遺伝子組換え実験安全委員会および横浜市立大学動物実験委員会の審査・承認を得て行った(プロトコル番号 FA-20-038)。

### 3. Results/結果

①精巣組織の成長と精子形成に対する培養空間の高さの影響： PC60, PC100, PC160, すべてのグループで組織体積は増大傾向を示したが、グループ間での有意な差はなかった、精子形成効率においては、PC60 と PC100 では PC160 に比べて GFP 発現面積比が低く、PC60 では培養 35 日目以降に低下する傾向が認められた。一方、PC160 では培養期間を通じて高い GFP 発現面積比が維持された。②PC チップ交換の効果： PC-r を用いると、組織体積は交換後 7 日目にも増大し、その傾向は持続した。また、GFP 発現も PC160 と同様に培養 42 日目まで高い GFP 発現面積比が維持される結果であった。免疫組織化学染色では、図 1, 2 に示すように、PC160 よりも PC-r において後期の円形精子細胞以降の半数体細胞を有する精細管の割合が高いことが示された(PC-r : 37.4% vs. PC160 : 12.3%)。③至適酸素分圧の検討；PC-r における組織増大度は、15% O<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> では差を認めなかったが、10% O<sub>2</sub> では有意に低い結果であった。また、伸長精子細胞を含む精細管の比率は、15%O<sub>2</sub> が他 2 条件に比し有意に高い効率を示した。④EE 毒性実験：組織増大度は濃度依存性に低くなる傾向を認めた。特に、EE 各濃度における精細管径は、コントロール群とは対照的に狭小化する傾向を示した。PAS 染色像から、各培養組織の精細管当たりの半数体細胞数を測定したところ、濃度依存性に半数体形成が有意に低い結果であった。⑤Cisplatin 毒性実験：4 μg/mL 以上の高濃度暴露群では暴露後 14 日目まで組織増大度は低濃度暴露群に比し有意に低い結果であったが、cis-4, 12 では、その後、control 群まで改善する傾向を認めた。GFP 発現割合は、cis-1 以下の暴露群では control 群とほぼ同様に推移したのに対し、cis-4 では暴露後 14 日目に著しい低下を認め、3 週間かけて control 群と同等にまで改善を認めた。Cis-12 は GFP 発現が低い状況が遷延したが、暴露後 5 週目以降、緩徐に増大傾向を認めた。一方、cis-40 では観察期間中に組織の増大ならびに GFP の発現はほとんど認めなかった。PAS 染色像から、各培養組織の精細管当たりの半数体細胞数を測定したところ、他の評価項目において control 群と有意差を認めなかった cis-1 においても半減する結果が得られた。

### 4. 考察

PC 法において、培養空間の高さは重要なパラメータであり、PC チップ中心部の溝の深さによって決定される。これらの高さによって定義される培養空間は、培養後しばらくの間は、

新生児組織に適応していたが、狭い培養空間では、組織の増大に伴い精子形成の促進を阻害する可能性が示唆された。PC-r という試みは、組織体積変化ならびに精子細胞の成熟を顕著に促進する効果を示した。これは、物理的な因子が精子形成の制御に関与している可能性を示唆している。PC-r に適した酸素濃度は 15% 近辺にあることが示されたが、興味深いことに低酸素状態は特に spermiogenesis を促進させることが明らかとなった。理論的には、生体内において毛細血管に囲まれた精細管内では、基底膜から管腔中心部にかけて酸素濃度勾配が形成されていると考えられ、これらを裏打ち所見として重要である。PC-r を用いた EE の毒性試験は、0.01nM という低濃度でも、その精巣毒性を実証することに成功した。培養組織体積と精細管直径の経時的な測定は、精巣毒性をモニタリングするための高感度な指標となり得ることが示唆され、生体実験における精巣重量測定の代替法として今後の応用が期待される。これは、使用する実験動物数の削減に大きく貢献し、遺伝子改変動物を必要としないという展望を期待させる。本研究は、PC-r という人為的な培養空間の操作を通じて、組織の成長と精子形成の両方において、培養空間制御の重要性を示した。今後、体外精子形成系研究において培養空間は重要なパラメータの一つとなることが予想され、培養空間の形状や容積、培養微小環境に応じた空間制御の自動化など新しい技術の応用が期待される。

#### 質疑応答詳細

**シスプラチンは将来起こりうる生殖毒性のリスク分類において中リスクに該当する薬剤であるが、そこを選択した理由は何か？シスプラチンではなく、ブスルファンなどの高リスク薬剤や、まだ生殖毒性が不明な薬剤、放射線治療などによる生殖毒性について、この実験系を用いて評価はしなかったか？また、していくのはどうか？(葉山先生)**

☞本研究では、この実験系が毒性評価系としてどの程度有用であるかという検証実験であり、その点においては、ご指摘頂いたお話の前段階にあたる研究と考えている。そのため、毒性とその標的細胞がある程度わかっていて、かつ、実験にあたってハードル(難易度)の低い、生殖毒性を有する抗がん剤としてシスプラチンを選択した背景がある。シスプラチンは親水性であるため、培地への溶解がしやすく PC チップへの吸着もほとんどないことが実験のしやすさ(ハードルの低さ)として選択した理由に挙げられる。

実験の立案段階では、共同研究者から高リスク群に該当するシクロフォスファミドなども提案があった。この薬剤は代謝産物が生殖毒性を有することが分かっているが、これまでの生体実験では、毒性が判明している市販の代謝産物を直接投与した報告しかない。計画段階では、シクロフォスファミドを代謝酵素を用いて試験管内で代謝させた後の多様な代謝産物を含む溶液を暴露させる案もあったが、様々な考慮すべき点がありハードルが高いと判断したため、本実験の結果を受けて実施するかを検討する方針となった。今後はそういう薬剤も含め、実験系自体もブラッシュアップさせながらトライする可能性がある。

シスプラチンの生殖毒性は中リスクに該当するが、治療歴のある患者さんの妊娠においては流産が多いなどの報告がある。それは、精子自体の DNA に影響が及んでいる可能性を示唆しているが、そのような精子の質について DNA の断片化などでも良いので評価するような実験が出来るとおもしろいのではないか。(葉山先生)

☞興味深い提案であると同時に、がん治療歴のある患者さんにとってセンシティブな問題であるため、より実臨床との乖離が少ない実験計画の立案が必要である。実際の臨床ではシスプラチンの単回投与により治療が終わることは少なく、複数回の投与が標準治療となっている癌腫が多いと認識している。本実験では単回投与によるシスプラチンの生殖毒性を評価しうることを示したが、今後は複数回投与を考慮した実験計画を立案すべきと考えている。しかし、そのためには、長期の培養に耐えうる実験系の確立が必要である。また、本実験では新生児マウスの精巣組織に暴露させた毒性試験となっているが、成体マウスの精巣組織を用いた毒性評価系が確立されれば、より実用的であると考えている。しかし、現状では成体マウス精巣組織の体外培養は難易度が高く、毒性評価系としては現実的ではない。今回の研究報告には出していないが、新生児マウス精巣組織を予め 5-6 週培養することでマウス精巣組織の成熟を待つて毒性物質を添加する実験も行っている。その結果には、また新しい難点があるが、ゆくゆくは実臨床との乖離が少ない実験計画と、それに耐えうる実験系が確立できれば、最終的にご指摘頂いた精子の質に言及した実験をする意義がより高くなると考えている。

この実験系におけるインデックスを設けることで、その有用性は高まるのではないか？(葉山先生)

☞その方向性は有用であると考えている。既に生殖毒性が明らかな物質について、この実験系で評価し、インデックスを設定した上でデータを蓄積できれば生体実験の代替として実用的な評価系の一つとなる可能性がある。

PC チップを交換するアイデアはどこから想起されたか？(堀井先生)

☞小島らの先行研究において PC60  $\mu$  m のように狭い培養空間において組織体積変化が大きいという結果が示された。これは、物理的に培養空間が狭いことで組織内部の精細管が栄養供給の場であるアガロースゲル面に接地する面積が増加し、より高い栄養供給が得られる培養環境が実現したことが要因と考えられた。一方で、古目谷らの報告では、長期的にみると PC150-200  $\mu$  m の広い培養空間において精子形成効率が低いという結果であり、体外培養系においては組織の成長と精子形成効率には培養空間の広さにおいて異なるアプローチが必要である可能性が示唆された。それは、おそらく体外培養系において微小循環系が破綻していることに起因したものと考えられるが、そのトレードオフの関係をつなぐうえで、体細胞、特にマウスセルトリ細胞の成熟が約 2 週間という知見を根拠に培養 2 週目でより深い溝、つまり、より培養空間が高い PC チップに交換することで両者の良いところ取りが出来るのでは

ないかと考えた。

#### 酸素濃度以外に、精子形成効率を上げるためには何が重要と考えているか？(堀井先生)

☞我々の研究室では、マウス体外精子形成において最も再現性、有効性の高い血清として AlbuMAX を使用してきた。そのため、この AlbuMAX に含まれる化学的因子の特定を重点的に行ってきた経緯がある。一方で、松村さんらが行ったラットの体外精子形成においては酸素濃度もまた重要なファクターであることが示された。本実験では、物理的な因子について焦点を当てて研究を行ってきたが、実際には酸素濃度などの培養条件や化学的因子が及ぼす良い影響と比べると、物理的な因子が与える影響は現状のデバイスでは低いことが分かっている。ただし、こういう小さい積み重ねで総合的に精子形成効率を上げていくのも一つの戦略と考えている。また、益性(促進)因子の特定だけでなく、阻害因子(炎症、線維化に関わる因子)を特定し除外することも精子形成効率の向上における鍵と考えている。体外培養系は人為的に化学的因子の調整が可能であるという advantage があるため、これらの解明に注力していくことは、今後も重要と考えている。

#### 今後の精子形成研究はどうなっていくか、どう思いますか？(堀井先生)

☞現在、卵子の研究は飛躍的に進んでいる。しかし、雄性生殖細胞にはセルトリ細胞などの支持細胞とともに、複数の段階を経て分化しなければ精子に至らないという点で精子形成研究は非常に難易度が高い。自身の関わった研究では生体から摘出した精巣組織を使用しているが、精巣組織自体を再構築する系により生殖細胞の分化を促すことが可能となるかもしれない。そして、配偶子という観点から、卵子の研究結果が雄性生殖細胞の分化や精巣細胞の再構築においてヒントとなる可能性があり、卵子研究の進捗が結果的に精子形成研究を後押しする可能性が考えられる。そのため、近い将来といった表現は難しいが、いずれは体外精子形成系においても何かしらの前進が見られると期待される。一方で、ヒトなどの高等動物における生殖細胞系列においてはマウスよりもセンシティブな問題をはらんでいると考えられ、その点においては発生学的な研究結果などが統合されて初めて、ヒトに適用されるだろうと考えている。

#### 組織像の拡大所見等があまりないため分からないですが、精子細胞の細かい step は確認したか？その点について、この実験系で考慮されることはあったか？(大保先生)

☞体外精子形成系において細かい staging が難しいことは以前にお話しした通りであり、実際にこの実験系においても詳細な step を評価することは困難であった。また、実験計画として培養 35 日頃の培養精巣組織を組織学的に評価したが、実際には培養 42~49 日目頃の、もう少し培養日数が経過した時点の方が精子に至る生殖細胞数は多いため、その方がより細かい精子細胞の staging において評価が可能であったらという反省がある。

EE 実験では、自然界における暴露量よりかなり濃度が高い設定となっているのではないか？その点について考えはあるか？また、自然界では非常に低い濃度の暴露でも影響が表出する点を考えた時に、より感度の高い実験系にするためのアイデアはないか？(大保先生)

☞ 今回の EE 毒性実験においては、先行研究にある AG 法を用いた EE 毒性試験との比較が根底にあり、その論文を踏襲した濃度で実験を行った背景がある。実際の実験では、より低い濃度(1pM)まで試したが、10pM(0.01nM)以下はほとんど control と同等という結果となった。実際に自然界で暴露される状況を想定すると、生体に取り込まれたごく微量の EE は、消化や代謝などの様々な影響を受けると考えられる。それらを経て、実際の精巣組織に対して影響が及ぶことを考慮すると、精巣組織に直接的に暴露するこの実験系では、そもそも real world よりも高い濃度で暴露している可能性が考えられる。その上でコントロールとの有意差が出ない現状を考えると、より高い感度をもつ実験系として成立させるには、精子形成効率をより in vivo に近づけることが必要であると考えられる。

しかし、in vivo では代謝経路があることで影響がでていないという可能性もあり、直接暴露されるこの実験系であれば、代謝による影響を考えずに、薬剤が細胞自体に直接的な影響を与えるかどうかが見られるという点において、この実験系ならではの有用性があるのではないか？(葉山先生)

☞ その点において体外培養系は有用性の高い実験系であると考えられる。

新生児マウスの 1 週齢頃にシスプラチンを暴露していることから、セトリ細胞やライディッヒ細胞などの体細胞においても分化・増殖時期であることを考慮すると、シスプラチンの毒性は体細胞にも及んでいるのではないか？それについての考えや評価はしたか？(大保先生)

☞ 実際に、高濃度のシスプラチン暴露群となると生殖細胞はほとんど枯渇し、組織の増大率も全く変化がなかったことから体細胞への影響がありうるかもしれない。しかし、本実験では、その真偽の追求はできず実際に影響があるかは不明である。一方で、共同研究者からは生体実験において、そう考えるような知見があったという報告は受けており、今後、セトリ細胞の機能性を評価する指標について検討しているとのことであった。本実験系は、生殖細胞の分化の進行度や組織の形態変化について経時的な評価が可能な毒性評価系ではあるが、機能性を評価する上では更なる実験が必要であり、今後の課題と考えている。

以上の発表内容と質疑応答の結果、橋本雪司先生が行った研究は、横浜市立大学・医学博士(甲号)の学位を授与に値するものであると判断された。