APP-085 小児癌治療後に生じる男性不妊症に対する治療法の開発—白血病モデルマウスにおける精細管内移植法を用いた検討—

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(泌尿器科)¹⁾, 大阪警察病院泌尿器科²⁾, 理化学研究所神戸研究所発生・再生科学総合研究センターゲノム・リプログラミング研究チーム³⁾

藤田 和利¹⁾, Phanu Tanjapatkul¹⁾, 小森 和彦¹⁾, 松岡 庸洋¹⁾, 高尾 徹也¹⁾, 宮川 康¹⁾, 高田 晋吾¹⁾, 辻村 晃¹⁾, 松宮 清美²⁾, 大田 浩³⁾, 若山 照彦³⁾, 奥山 明彦¹⁾

【背景】現在70%以上の小児白血病は完治し長期生存が可能となったが、治療により造精機能は障害を受け、晩期副作用として男性不妊症が生じる。思春期以降の男性は治療前に射出精子を凍結保存し、将来挙児を得ることが可能であるが、思春期前の小児では精巣内に成熟精子は存在しない。これに対して治療前に患児の精巣から精細胞を採取して保存し、治療後に精細管内移植法を用いて妊娠性を回復させる方法が期待されたが、白血病ラットから採取した精細胞を無処理のまま移植すると、移植を受けたラットに白血病が発症することが報告された。【目的】白血病モデルマウスの精巣より細胞表面マーカーを用いて精原性幹細胞を分離し、分離した精細胞を用いて精細管内移植を行い妊娠性を回復させる。【方法・結果】マウスはC57Bl/9を、白血病細胞はマウス骨髄系白血病細胞C1498を用いた。多くの精原性幹細胞特異的表面マーカーが報告されているが多くの腫瘍細胞でも発現されており、腫瘍細胞と精原性幹細胞を100%分離できる表面マーカーが必要となる。そこで精原性幹細胞に発現しているマーカーと白血病細胞に発現しているマーカーを組み合わせて、正常マウス精巣より調整した精細胞および白血病細胞の発現パターンを各々フローサイトメトリーにより検討した。その結果、MHC-class IおよびCD45に対する抗体を組み合わせることにより、精細胞はMHC-class I (-) およびCD45 (-) の精細胞分画として、白血病細胞は共に陽性の白血病細胞分画としてin vitroで分離できることが明らかになった。これらの抗体により異なるマウス白血病細胞株の赤白血病細胞も分離可能であった。次に白血病細胞が浸潤したマウス精巣よりこれらの抗体で染色しFACSを用いて白血病細胞分画と精細胞分画を分離した。分離した細胞分画をマウス腹腔内に接種すると、白血病細胞分画群は40日以内に死亡したが、精細胞分画群は全て300日以上生存した。次に白血病細胞が浸潤したGFPマウスの精巣より分離した精細胞分画の精細管内移植を試みた。分離を行わずに移植すると精巣内に腫瘍が浸潤し、マウスが死亡したのに対して、分離した精細胞分画を移植したマウスは白血病を発症することなく、2ヵ月後には精細管内に生着し、GFPシグナルをもつ成熟精子を確認できた。この成熟精子を用いて、卵細胞質内精子注入を行った結果、正常仔が得られた。最後にヒト白血病細胞株でこれらの表面マーカーの発現をフローサイトメトリーで検討したところ、マウス白血病細胞と同様に分離できる可能性が示唆された。【結論】白血病マウスより精細胞と白血病細胞を分離し、精細管内移植により白血病を生じることなく精細胞を生着させ、成熟精子を得ることに成功した。この方法は特定の白血病細胞株だけでなく、ヒトへ応用できる可能性も示唆された。

APP-086 男子不妊症に対する遺伝子治療を目指した精巣内遺伝子導入に関する基礎的研究

名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野

小島 祥敬, 黒川 覚史, 水野 健太郎, 梅本 幸裕, 佐々木 昌一, 林 祐太郎, 郡 健二郎

【目的】近年補助生殖医療は、特にICSIの出現により目覚ましい発達を遂げた。しかしながら、これらはあくまでもin vitroによる授精であるのみならず、長期安全性については未だ不明である。さらに男子不妊症の多くにはその適応に限界があり、今後新しい治療が望まれている。私達は、将来の男子不妊症に対する遺伝子治療の可能性を見据え、安全で効率的な精巣内への遺伝子導入方法について検討した。【方法】プラスミドDNAとしてpCAGGS-LacZ (cytomegarovirus enhancer/chicken β -actin promoter + E.coli β -galactosidaseを含むLacZ遺伝子)を用いた。遺伝子導入方法としてはcationic liposome法 (CLGT法), electroporation法 (EPGT法), adenovirus vector法 (AdVGT法)を用いた。8週齢B6D2F1雄マウスの陰嚢を切開し、精巣を露出した後、精細管内にマイクロガラス管を用いて、遺伝子発現ベクターを注入し、7日、14日、28日、56日後に屠殺。以下について、それぞれの遺伝子導入方法の特徴を検討した。(1) 精巣内の細胞、精子における遺伝子発現の局在の検討、および β -galactosidaseの発現強度による遺伝子導入効率の検討。(2) 遺伝子導入による造精機能への影響(TUNEL法によるアポトーシスの検出)および炎症細胞浸潤の有無。(3) 精子および次世代への影響を含めた安全性。【結果】(1) 遺伝子の発現は、CLGT法は精子に、EPGT法は精子形成細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞に、AdVGT法はセルトリ細胞とライディッヒ細胞に認めた。発現強度はいずれの方法も導入後7日目にピークを認め、AdVGT法(1.53+/-0.42 unit)がCLGT法(0.07+/-0.09unit)やEPGT法(0.73+/-0.56 unit)に比較して有意に高かった($p<0.01$)。AdVGT法においては、導入後56日まで遺伝子の発現が持続したが、CLGT法、EPGT法は28日目以降の発現は認めなかった。(2) 導入後7日目のapoptosis indexはEPGT法(2.34+/-0.91, $p<0.05$)で高く、最も造精機能障害を強く認めた(CLGT法: 0.83+/-0.87 AdVGT法: 0.78+/-0.43)。いずれも28日目以降にはほぼ正常にまで改善した。CD4, CD8陽性細胞を中心とした軽度の細胞浸潤はいずれの遺伝子導入方法でも認めたが、遺伝子導入方法による有意な差は認めなかった。(3) 遺伝子導入マウスにおいて、有意な精子運動能の低下、奇形率の上昇はいずれの遺伝子導入方法でも認めなかった。生殖能力の低下、胎仔異常、仔の発育異常は認めず、次世代への影響はいずれの遺伝子導入方法でもなかった。【考察】CLGT法、EPGT法はいずれも簡便な方法ではあるが、AdVGT法に比較して遺伝子効率が低く、安全性や安定性に欠けていた。AdVGT法は、遺伝子導入効率が高く、精子形成細胞への遺伝子導入を認めないことから次世代への影響の可能性が極めて少なく、将来臨床応用する上では、体細胞を標的とした最も優れた遺伝子導入方法と考えられた。