

小児がん患者の妊孕性温存法と薬剤による精巣細胞除去

川崎医科大学 解剖学 講師 横西 哲広

はじめに

がん治療の晩期合併症として不妊症がある。成人男性の場合は、がん治療前に精子凍結保存し、必要時に解凍して顕微受精をすることで妊孕性は温存できる。女性がん患者における妊孕性の温存法として、凍結保存した卵や卵巣組織の自家移植法が第一選択となってきた。しかし、精子が得られない性成熟に達していない男性の小児のがん患者は、妊孕性を温存する手段がない。未分化な精細胞を精子まで分化誘導する手法として、精巣組織培養法、精原細胞移植や精巣組織移植などが試みられている。しかし、ヒト精子形成の遂行は未だ成功していない。

筆者は、異種精原細胞移植に立ち戻り、マウスの精巣内にヒトの精巣組織を再構築する方法を探索した。その結果、薬剤によるセルトリ細胞除去後に全精巣細胞移植を行うと、間質細胞と精上皮を置換でき、ドナー由来の精巣を宿主精巣内に再構築することに成功した。その課題と成果、ならびに薬剤による精巣細胞除去について概説する。

Key words : 精子形成、精原細胞ニッチ、セルトリ細胞

若年性男性がん患者の妊孕性の温存法

近年の医療の進歩によって、小児がん患者の生存率は飛躍的に改善した。放射線療法や化学療法によるがん治療の晩期合併症に不妊症があり、がん生存者の約3割が発症すると報告されている。そのため、不妊症を患う小児がん生存者は少なくない。血中のホルモン値、精巣容積や尿中精子の有無などから、精子が得られる年齢の目安は、およそ13、14歳と推定されている^{1,2}。この年齢以上であれば、妊孕性の温存法として、精子凍結保存が適応となる可能性が高い。しか

し、この年齢未満では、精液を採取したとしても精子が得られない。そのため、性未成熟な精巣の一部を凍結保存し、精原細胞から精子まで分化させる必要がある。または、患者から始原生殖用細胞 (Primordial germ cell like cell ; PGCLC) を樹立し、分化誘導させる方法がある。このような未熟な精巣組織や細胞から精子形成を誘導させる方法として、精巣組織培養法や移植法がある。移植法には、自身の体内に移植する自家移植と、マウスなどの別の種へ移植する異種移植法がある (図 1)。

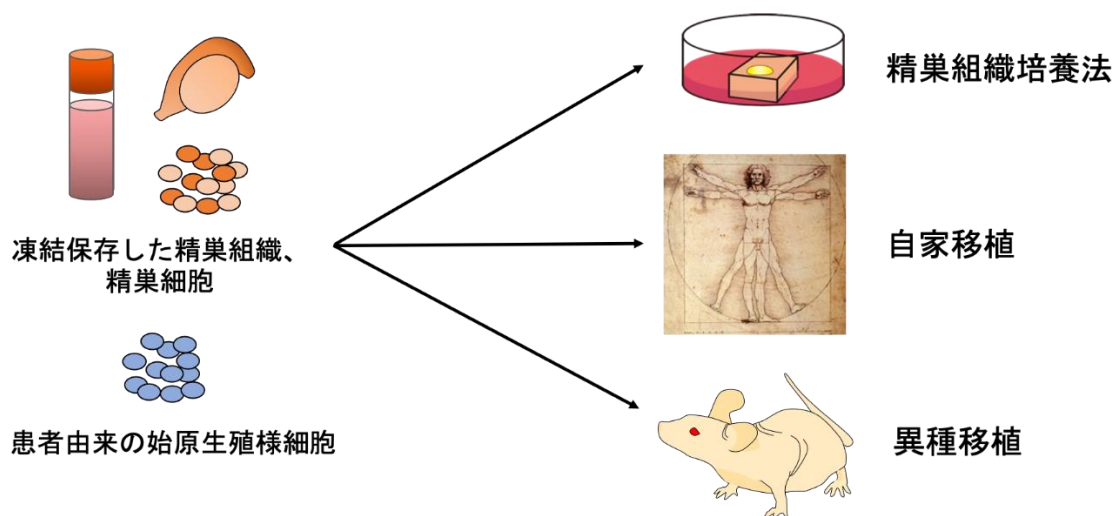


図1 性未成熟な精巣検体または始原生殖様細胞を用いた精子への分化誘導法

精巣組織培養法

精巣の組織培養の研究は歴史が深く、約1世紀前にさかのぼる。1960年代には4日齢のラットの精巣組織を培養し、減数分裂後期まで分化させた報告があるが³、その後は目立った成果はなかった。しかし、2011年に小川らが、基礎培地に AlbuMAX または KSR という血清アルブミンを添加することによって、新生仔マウスの精巣組織から *in vitro* で精子を得ることに成功し、得られた精子の機能を、顕微受精で実証した⁴。凍結保存した精巣組織も培養して機能を有する精子を産生できるか、精巣組織に適した凍結保存法も含めて検討した。DMSO、プロパノールや市販の凍結保存剤などと比較した結果、卵や胚の保存に用いられているガラス化凍結保存法を行った検体で、解凍後の精子形成率が良好であ

った。凍結保存後に解凍して、組織培養を行って得られた精子にも妊孕性があることを顕微受精で確認できた。さらに産仔のインプリンティング遺伝子のメチル化修飾率が正常と大差ないことがわかった⁵。この方法は臨床応用できると期待された。本グループはマイクロ流体系を組み合わせた培養系の改良や⁶、AlbuMAXの成分を明らかにすることで精巣組織に最適な培養液の改良に挑んでいる⁷。しかし、現在のところ、ラットの精子形成の誘導は実現できたが⁸、ヒトの培養系の確立はまだ難しい課題である。

多能性幹細胞を用いた生殖腺の *in vitro* 再構築法

2011年に斎藤らは、始原生殖細胞の発生過程を培養下で再現することで、マウスの多能性幹細胞を起点としてPGCLCを誘導することに成功した⁹。マウスのメスPGCLCを、胎児マウスから採取した卵巣体細胞と共培養後に、宿主の卵巣に移植することで卵までの分化を実現した¹⁰。PGCLCの分化誘導法には生体由来の体細胞または移植が必要であったが、最近では生殖腺の体細胞さえもES細胞から分化誘導することに成功し、卵胞の培養法も開発された。これにより、PGCLCから卵までの分化の過程を、多能性幹細胞から*in vitro*で成し遂げた¹¹。ヒトiPS細胞からのPGCLCへの分化誘導法にも成功しており、今後の臨床応用への発展が期待される¹²。しかしながら、オスのPGCLCからの精子までの分化誘導には、未だ生体の宿主精巣が必要である¹³。マウスの精巣細胞懸濁液からの細胞集合体の形成法とその後の培養法での精子形成はすでに報告されている¹⁴。この方法を応用し、卵巣と同様に、ヒト精巣の体細胞も多能性幹細胞から分化誘導できれば、完全培養下での精子形成誘導法が現実となるであろう。しかしながら、臨床応用するには、ここにおいてもヒト精巣組織の培養技術の確立が課題となっている。

自家移植法

移植を行う場合、精巣組織移植と精原細胞移植の2種類がある。精巣組織移植法は、精巣組織を数mm大に刻み、その小片を背部皮下または精巣白膜下に移植する非常に単純な方法である¹⁵。精原細胞移植は、キャピラリーを精巣輸出管、精巣網または曲精細管内に刺し、ドナーの精原細胞を注入する方法である^{16,17}。

マウスの場合には精巣網が精巣表面からよく観察できるが、ウシ、サルやヒトの場合には精巣の中央部にある。しかしながら、超音波画像を見ながら穿刺することで、ヒトでも可能な手法である¹⁸。また、精原細胞は凍結保存後に移植しても精子形成を再開することが知られている¹⁹。これらの精巣組織片や精原細胞移植は赤毛ザルでも可能であることが実証されている^{20,21}。精原細胞移植では、ホジキン病の患者の精原細胞を凍結保存し、実際に自家移植した報告があり、経過報告が待たれる²²。

精巣組織や精原細胞の自家移植において、最も懸念される点は、がん細胞の混入と移植によるがんの再発である。これらの検体はがん治療前に凍結保存する必要があり、移植する検体にがん細胞混入の有無を完全には否定できない。白血病のラットの精巣細胞をドナーに移植した報告では、わずか20個の白血病細胞の混入によって、宿主は白血病を発症している²³。このようながん細胞の混入を細胞表面のタンパクをマーカーにしてFACSを用いて除く挑戦がされているが、完全な除去には至っていない²⁴。

異種移植

自家移植ではがん細胞の混入が懸念されることから、異種移植が次に考えられる選択肢である。自家移植と同様に、異種精巣組織移植と異種精原細胞移植がある。免疫不全マウスの背部に、性未成熟のヒツジの精巣組織片を異種移植して精子形成を確認した報告がある²⁵。ヒトの精巣組織を免疫不全マウスに異種移植した報告では、ヒト精原細胞の生存は確認出来たものの、ヒト精巣組織は線維化をきたし精子形成は進まなかった²⁶。

免疫不全マウスに対する異種精原細胞移植の成功例として、ラットとハムスターがあるが、標識したヒト精原細胞を免疫不全マウスの精細管内に異種移植した報告では、ヒト精原細胞はマウスの精細管内に定着して生存したが、精子形成は認めなかった²⁷。

精巣組織移植は、精原細胞ニッチを構成するセルトリ細胞、血管内皮細胞、筋様細胞やライディッヒ細胞も含めて、構造を維持したまま移植できる点が、精原細胞移植と比べて優れている。しかし、異種精巣組織移植の効果は限定的であった。そこで、精原細胞移植を改良し、宿主の精細管と間質の細胞をドナー由来の細胞に置き換える方法を考えた。そうすれば、管腔構造と間質構造の足場を宿主

に借りることで、曲精細管内のフローや血流も確保でき、異種精原細胞移植の壁を破れると期待された。

薬剤による精巣細胞除去

細胞を移植するためには、宿主の細胞を除去してドナー細胞が定着する空間を確保する必要がある。細胞を除去する方法としては、近年では、目的とする細胞特異的にジフテリアトキシン受容体を発現させ、毒素を投与することで除去する方法がある²⁸。このような技術が開発される以前では、古くから薬剤による細胞の除去が試みられていた。精巣の細胞においても、薬剤による細胞除去が報告されている。薬剤による細胞除去の利点は、宿主を選ばないことや汎用性の高さなどが挙げられる。

精原細胞移植にはアルキル化剤であるブスルファンを投与することで精原細胞を除去することが可能である¹⁶。精原細胞移植の宿主には、c-Kitに変異を持つW/W^vマウスか、ブスルファンを投与したマウスが一般的に用いられている。精巣の間質細胞であるライディッヒ細胞に関しては、エタンジメタンスルホネートを精巣内に注入することでライディッヒ細胞を特異的かつ早期にアポトーシスを誘導して除去することができることが知られている²⁹。精原細胞ニッチを構成する重要な細胞の一つとして、間質のマクロファージがある。リポソーム製剤を精巣の間質に注入することで、精巣内マクロファージを特異的に除去することが可能である³⁰。一方で、カドミウムを精巣内に注入することでセルトリ細胞を除去する試みがあるが、セルトリ細胞に特異的な効果ではなく、間質や管腔構造なども損傷される³¹。

ベンザルコニウム塩化物は陽イオン界面活性剤で、殺菌成分として多くの点眼剤に添加されているが、その副作用として角膜上皮を障害することが知られている³²。セルトリ細胞は精上皮であり、ベンザルコニウム塩化物を精細管内に注入することで、セルトリ細胞を除去できるのでは無いかと考えた。そこで、新生仔マウスの精巣を白膜ごとベンザルコニウム塩化物溶液に反応させた後に培養すると、セルトリ細胞の除去を認めた。次に、成熟したマウス精巣の輸出管から逆行性にベンザルコニウム塩化物を注入してみると、セルトリ細胞の除去と生殖細胞の二次的な消失を認めた。注入後7日目には、空の管腔構造が得られた³³。

精原細胞ニッチの再構築

ベンザルコニウム塩化物によってセルトリ細胞と生殖細胞を除去したマウスの精巣に、別のマウスの精巣細胞懸濁液を移植した。その結果、宿主マウスの精巣内にドナー由来の精原細胞、セルトリ細胞が精細管内に定着しただけでなく、間質にはライディッヒ細胞と筋様細胞が定着し、宿主精巣内でドナー由来の精巣を再構築することに成功した³³。間質に定着したドナー細胞らは、ドナーの精原細胞とセルトリ細胞が定着した精細管内周囲に認められたため、宿主のセルトリ細胞が欠損した精細管から間質へ漏出し定着したと考えられた。同様に、凍結保存した精巣細胞懸濁液を移植しても、ドナー由来の精巣が宿主精巣内で再構築できた³³。

この研究から、免疫不全マウスの精巣にベンザルコニウム塩化物を注入してセルトリ細胞を除去した後に、異種の新精巣細胞を移植することで、マウス精巣内に異種の精巣を再構築できる可能性が示唆された。このような異種移植の臨床応用に関しては、宿主動物由来のレトロウイルス感染症や倫理面などの課題もあるが、若年性男性がん患者の妊孕性の温存法として応用できるかも知れない(図2)。さらには、絶滅危惧種などの精巣を再構築することで、種の温存もできると期待される。

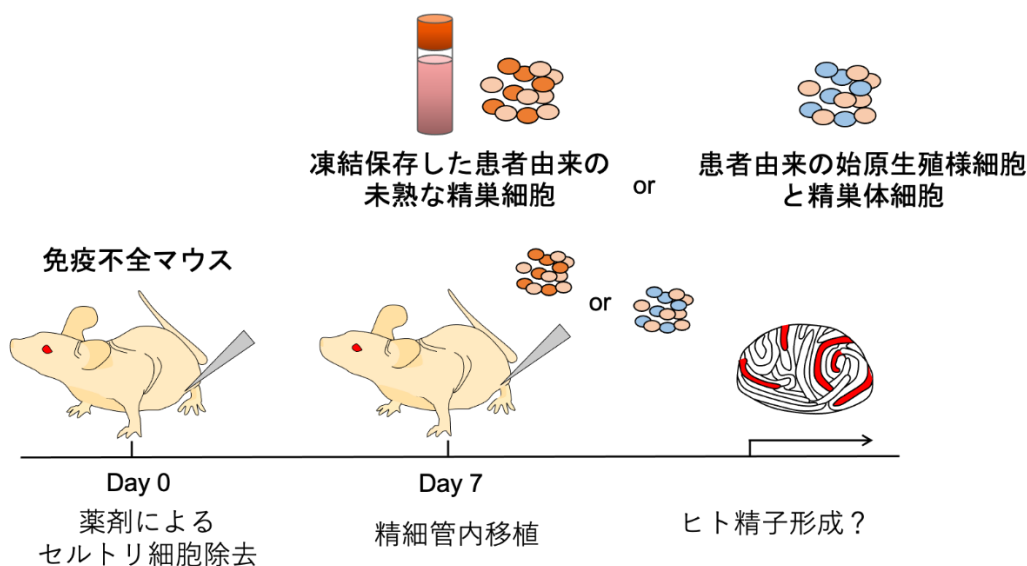


図2 マウス精巣内ヒト精巣の再構築

おわりに

若年性女性がん患者における卵巣組織凍結保存と自家移植による挙児が報告されている中、男性がん患者の妊孕性の温存法は未だ確立されていない。精巣は、精子形成の場である曲精細管とその周囲を取りまく間質からなり、様々な支持細胞によって精原細胞ニッチが構成されている。この構造を保持したまま移植できる異種精巣の再構築における問題点をひとつひとつ明らかにすることで、マウス精巣内ヒト精子形成の実現や、ヒトの精子形成におけるホルモンや組織学的構造も明らかになってゆくと期待される。

【引用文献】

1. Hirsch M, Lunenfeld B, Modan M, Ovadia J, Shemesh J. Spermatogenesis--the age of onset of sperm emission. *J Adolesc Health Care*. 1985;6(1):35-39.
2. Schaefer F, Marr J, Seidel C, Tilgen W, Schäfer K. Assessment of gonadal maturation by evaluation of spermatogenesis. *Arch Dis Child*. 1990;65(11):1205-1207.
3. Steinberger E, Steinberger A, Perloff WH. INITIATION OF SPERMATOGENESIS IN VITRO. *Endocrinology*. 1964;74:788-792.
4. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*. 2011;471(7339):504-507.
5. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun*. 2014;5:4320.
6. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, Ogawa T. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016;6:21472.
7. Sanjo H, Yao T, Katagiri K, Sato T, Matsumura T, Komeya M, Yamanaka H, Yao M, Matsuhisa A, Asayama Y, Ikeda K, Kano K, Aoki J, Arita M, Ogawa T. Antioxidant vitamins and lysophospholipids are critical for inducing mouse spermatogenesis under organ culture conditions. *FASEB J*. 2020;34(7):9480-9497.
8. Matsumura T, Sato T, Abe T, Sanjo H, Katagiri K, Kimura H, Fujii T, Tanaka H, Hirabayashi M, Ogawa T. Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Sci Rep*. 2021;11(1):3458.
9. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146(4):519-532.
10. Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*. 2012;338(6109):971-975.
11. Yoshino T, Suzuki T, Nagamatsu G, Yabukami H, Ikegaya M, Kishima M, Kita H, Imamura T, Nakashima K, Nishinakamura R, Tachibana M, Inoue M, Shima Y, Morohashi KI, Hayashi K. Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells. *Science*. 2021;373(6552).

12. Sasaki K, Yokobayashi S, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Kurimoto K, Ohta H, Moritoki Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Sekiguchi K, Sakuma T, Yamamoto T, Mori T, Woltjen K, Nakagawa M, Yamamoto T, Takahashi K, Yamanaka S, Saitou M. Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2015;17(2):178-194.
13. Ishikura Y, Ohta H, Sato T, Murase Y, Yabuta Y, Kojima Y, Yamashiro C, Nakamura T, Yamamoto T, Ogawa T, Saitou M. In vitro reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2021;28(12):2167-2179.e2169.
14. Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Komeya M, Kubota Y, Ogawa T. In Vitro Reconstruction of Mouse Seminiferous Tubules Supporting Germ Cell Differentiation. *Biol Reprod*. 2013;89(1):15.
15. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K, Honjo T, Ogura A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum Reprod*. 2002;17(12):3039-3045.
16. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(24):11298-11302.
17. Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol*. 1997;41(1):111-122.
18. Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*. 2002;66(1):21-28.
19. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med*. 1996;2(6):693-696.
20. Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G, Peterson K, Masterson K, Ramsey C, Ward T, Lienesch M, Volk A, Cooper DK, Thomson AW, Kiss JE, Penedo MC, Schatten GP, Mitalipov S, Orwig KE. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):715-726.
21. Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, Houser L, Robertson N, Roberts V, Ramsey C, Hanna C, Hennebold JD, Dobrinski I, Orwig KE. Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*. 2019;363(6433):1314-1319.
22. Radford J, Shalet S, Lieberman B. Fertility after treatment for cancer. Questions remain over ways of preserving ovarian and testicular tissue. *Bmj*. 1999;319(7215):935-936.

23. Jahnukainen K, Hou M, Petersen C, Setchell B, Söder O. Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia. *Cancer Res.* 2001;61(2):706-710.
24. Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, Takada S, Nonomura N, Okuyama A. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. *Cancer Res.* 2006;66(23):11166-11171.
25. Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Schöler H, Dobrinski I, Schlatt S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature.* 2002;418(6899):778-781.
26. Schlatt S, Honaramooz A, Ehmcke J, Goebell PJ, Rübber H, Dhir R, Dobrinski I, Patrizio P. Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. *Hum Reprod.* 2006;21(2):384-389.
27. Nagano M, Patrizio P, Brinster RL. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril.* 2002;78(6):1225-1233.
28. Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 2001;19(8):746-750.
29. Kerr JB, Donachie K, Rommerts FF. Selective destruction and regeneration of rat Leydig cells in vivo. A new method for the study of seminiferous tubular-interstitial tissue interaction. *Cell Tissue Res.* 1985;242(1):145-156.
30. Bergh A, Damber JE, van Rooijen N. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *J Endocrinol.* 1993;136(3):407-413.
31. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biol Reprod.* 2003;68(3):1064-1071.
32. Noecker R, Miller KV. Benzalkonium chloride in glaucoma medications. *Ocul Surf.* 2011;9(3):159-162.
33. Yokonishi T, McKey J, Ide S, Capel B. Sertoli cell ablation and replacement of the spermatogonial niche in mouse. *Nat Commun.* 2020;11(1):40.