

新規生殖細胞毒性試験系の開発

信州大学繊維学部 応用生物学系 生物機能科学課程

高島 誠司

1. 研究の背景及び目的

近年多くの化学物質や薬剤が生産され、これらの人体への毒性を調べる簡便な方法が必要とされている。生殖毒性の検定には動物実験が広く用いられているが、動物実験では個体を維持するコストやばらつきに加え、ヒトの薬物代謝活性の違いや他の臓器への影響等から、必ずしも正確に評価することはできない。加えて、動物愛護の観点からも、動物実験を回避することが望ましい。こうした背景から、動物実験の代替として、組織細胞を用いた生殖毒性試験系の開発が期待されている。

体細胞に対する薬物毒性に関しては、近年ES細胞やiPS細胞を利用した医薬品の機能的スクリーニング系が確立されつつある。しかし生殖細胞については、ES細胞から試験管内で精子形成を誘導する効率は極めて低い(Toyooka, Y., et al., 2003)。また、生殖毒性のより正確な評価には生殖細胞とその精子形成を支持する細胞を含んだ精巣組織を用いることが望ましい。ES細胞やiPS細胞からの器官レベルでの誘導としては、神戸理研の笹井らによる大脳組織や眼杯等の神経器官が挙げられるが(Eiraku, M., et al., 2008; Eiraku, M., et al., 2011)、精巣組織を誘導する試みはまだ報告が無い。単一の胚葉(外胚葉)より誘導される神経系とは異なり、精巣組織はエピプラストに由来する生殖細胞と中胚葉由来の間質組織により構成される複雑な組織であり、器官レベルでの誘導はより難しい。

一方、試験管内での哺乳類の精子形成誘導は一世紀以上に渡り試みられてきた。これまでに、生殖細胞への不死化因子の導入や、精巣の支持細胞であるセルトリ細胞との共培養など様々な方法が試されたが、いずれの方法でも試験管内で機能的に活性のある精子を作出することはできなかった。しかし2011年、横浜市立大学の小川らのグループが器官培養系を用いることで、マウス精子幹細胞から試験管内で精子形成を誘導することに成功した(Sato, T., et al., 2011)。しかしながらこの誘導系が確立され手いるのはマウスのみであり、薬剤の毒性検定に用いられるラットなど他の種では成功していない。またマウスであっても、精子形成効率は未だ低いことが問題となっている。

マウス精子幹細胞の試験管内長期培養法は、申請者の所属していた篠原グループが2003年に世界に先駆けて開発し、現在この技術はラット、ハムスターに適用可能となっている(Germline Stem Cell: GS細胞; Kanatsu-Shinohara, M., et al., 2003; Kanatsu-Shinohara, M., et al., 2008; Kanatsu-Shinohara, M., et al., 2011)。ペンシルベニア大の久保田らはウサギ精子幹細胞の長期培養を行っているが、その細胞に由来する子孫作成には至っていない(Kubota, H., et al., 2011)。また、セルトリ細胞と精子幹細胞の共培養による生殖細胞の試験管内維持法もまた申請者らが初めて成功させたものであるが、申請者の知る限りでは他のグループからの報告は無い(Kanatsu-Shinohara, M., et al., 2012)。GS細胞を用いることで、『精子幹細胞の生存・増殖』を指標とした毒性試験は可能になっているが、GS細胞は試験管内での精子形成誘導法が確立されていない(Marcon, L., et al., 2010)。生殖毒性試験系を確立するためには、GS細胞の試験管内分化誘導法を確立する必要がある。

こうした背景から本研究では、①マウスで開発された精巣片器官培養法のラットへの応用、②マウスGS細胞の試験管内精子形成誘導法の確立を目的とした。

2. 方法

①マウスで開発された精巣片器官培養法のラットへの応用

精子形成が始まっていない幼若なラット精巣より精巣片を調製し、アガロースゲルで作製したブロックの上に設置し、半気相培養を行うことで試験管内精子形成誘導を試みた。方法の詳細は以下の通り。

超純水を溶媒とした1.5%アガロースゲルを作製、無菌のメスでおよそ10 mm × 10 mm × 8 mm (高さ)のステージを作製し12穴プレートに設置、ウェルに培地(組成は後述)を600 μ l入れ32~37 $^{\circ}$ Cの炭酸ガスインキュベーター(5%CO₂)で2時間~12時間インキュベートし、アガロースゲルを培地で平衡化した。使用直前に新鮮培地に交換し、精巣片の培養に使用した。

次に、生後2.5~7.5日齢のオスSDラットより精巣を摘出した。皮膜を切開し得られた精細管の束を鋭いピンセットで1~3 mm長径の大きさに細切し、前述のアガロースゲルステージ上に設置、培養を行った。培地は1週間ごとに交換し、28日~78日間培養した。培地の組成は3パターンあり、MEM α 培地を基本培地とし、①

抗生剤＋10％ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS; Biowest社) ②抗生剤＋10％Knockout Serum Replacement (KOSR; Life technologies社製) ③抗生剤＋B27サプリメント (Life technologies社製) について検討した。また、培養温度については、34/37℃の二条件を検討した。

培養28日目、78日目で精巣片を回収、ブアン固定液 (Sigma) で固定後、パラフィン切片を作製、ヘマトキシリン/エオジン染色を行い精子形成の有無を検討した。

②マウスGS細胞の試験管内精子形成誘導法

7.5日齢のオスDBA/2背景のEGFPトランスジェニックマウス精巣より常法によりGS細胞を樹立し、常法に従い培養した。実験により増殖因子GDNF, FGF2の添加/無添加条件にて、20μg/ml ラミニンコートディッシュで培養を行った。シグナル伝達経路の機能解析を行うべく各種キナーゼ阻害剤を添加し培養を行った。濃度は以下の通り。PP2:10μM (Src family inhibitor, Calbiochem)、PD0325901:2μM (MEK1/2 inhibitor, Selleck)、LY294002:33μM (PI3K inhibitor, Calbiochem)、AKT inhibitor IV:80nM (Calbiochem)、SB203580:60μM (MAPK11/14 inhibitor, Calbiochem)、SP600125:40μM (MAPK8/9/10 inhibitor, Calbiochem)。

GS細胞の細胞表面マーカー発現解析及び遺伝子発現解析については、既報のプロトコルに従いフローサイトメトリー及びreal-time PCRにより行った (Takashima, S., et al, 2013)。不妊マウスへのGS細胞移植及び顕微授精による子孫作製に関しても、既報のプロトコルに従い行った (Kanatsu-Shinohara, M., et al., 2003)。

3.結果

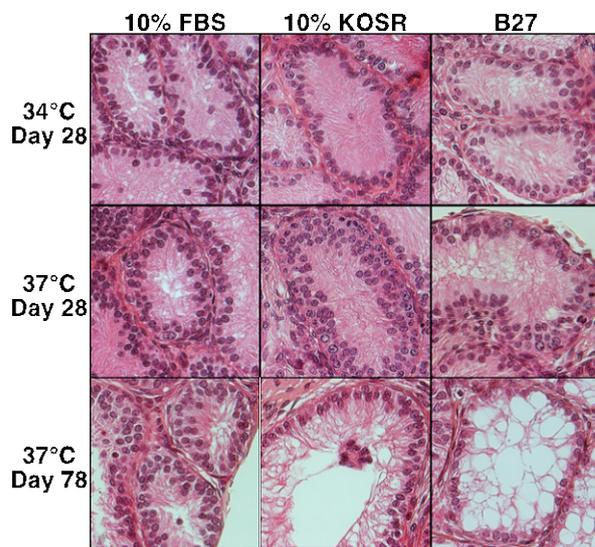


図1：ラット精巣器官培養

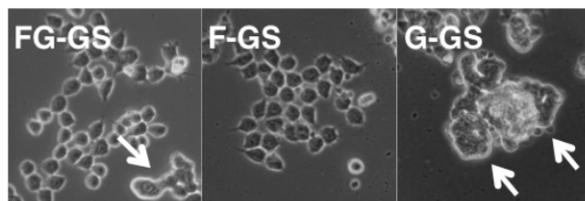


図2：培養GS細胞の形態。矢印は盛り上がったコロニーを示す。

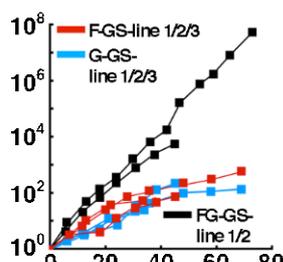


図3：GS細胞の増殖

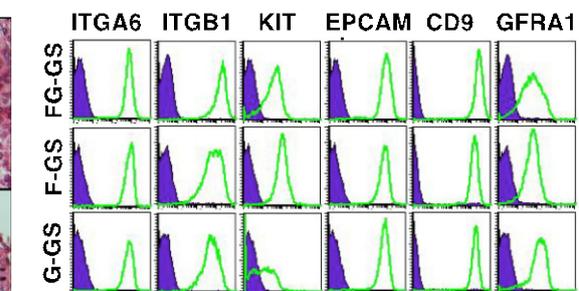
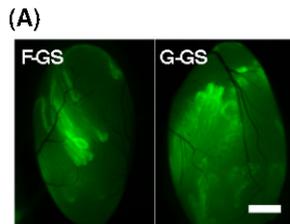


図4：GS細胞の細胞表面マーカー発現解析

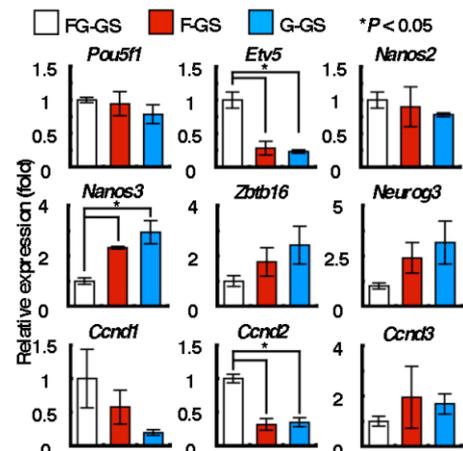


図5：GS細胞の遺伝子発現解析

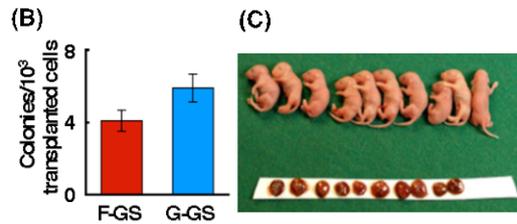


図6：F-GS細胞の精子幹細胞活性。(A)不妊マウス精巣への移植によるコロニー形成能解析。(B)G-GSとのコロニー系精嚢比較。(C)F-GSの子孫作製能力.F-GS由来精子から作製された子孫。

①マウスで開発された精巣片器官培養法のラットへの応用

マウスは34℃・5%CO₂条件下、10%KOSRを加えたMEM α 培地でアガロースゲル上半気相培養することにより試験管内精子形成誘導が可能である (Sato, T., et al., 2011)。しかし、この条件がそのままラットに適用

できるかは不明であった。そこで、温度を34/37°C、添加因子を10%FBS/10%KOSR/B27、とし、ラットの試験管内精子形成誘導が可能な条件を検討した。各条件で4週間培養後病理切片を作製し解析したところ、培養温度が34°Cの場合はいずれの添加因子条件でも精細管内の細胞は精子形成に伴う細胞の重層化を示さなかった(図1上段)。しかし、37°Cの場合は、いずれの添加因子条件でも細胞の重層化が確認された(図1中段)。そこで、37°Cの条件で更に培養を続け、78日後に病理切片を作製し解析したところ、10%KOSR/B27培養条件では細胞は単層化しており精子形成が阻害されていた(図1下段中央・右)。一方10%FBS添加条件では伸張精子細胞は認められなかったものの、重層化が維持されていた(図1下段左)。

②マウスGS細胞の試験管内精子形成誘導法

申請者は以前、GS細胞を精子形成に必要なセルトリ細胞を共培養する方法を確立した(Kanatsu-Shinohara, M., Cell Stem Cell, 2012)。しかしながら、この培養条件では分化誘導は見られず、自己複製のみが確認された。更に検討を進めた結果、セルトリ細胞が発現するGDNFがGS細胞の自己複製を促進し、分化を抑制していることが示唆された。

通常GS細胞はマウス胎児繊維芽細胞(Mouse embryonic fibroblast: MEF)からなるフィーダー細胞上、基礎培地に加え増殖因子GDNF、FGF2を添加した条件で培養すると、試験管内で対数増殖を示す。そこで申請者は、GDNFを除去した状態でGS細胞がどのくらいの期間生存可能かを検証した。MEFからのGDNF産生の可能性を排除するため、GS細胞培養はラミニンコートディッシュ上で行った。この場合、GDNFを添加した培養系ではGS細胞は盛り上がったコロニーを形成し増殖を示すが、増殖因子が無い条件では死滅する(図2)。意外なことに、GDNF非存在下でもFGF2添加によりGS細胞が生存し、伸展形態を示しながら緩やかに増殖することを見いだした(図2)。長期培養を行ったところ、GDNF+FGF2、GDNFのみの条件に比較し増殖速度は遅いものの、対数増殖を示した(図3)。申請者はこの細胞をF-GS細胞と名付け、その性状を更に解析した。細胞表面マーカーの発現を解析したところ、F-GSはG-GS(GDNFのみで培養したGS)、及び通常のGSに比較し、分化の進んだB型精原細胞に高発現するKITの発現が上昇していた(図4)。更にreal-time PCRにより遺伝子発現を比較したところ、未分化状態の維持に必要な*Etv5*や増殖に必須の*Ccnd2*の発現が低下する一方、*Nanos3*の発現上昇が確認され、F-GSは通常のGSよりもより分化傾向にある可能性が示唆された(図5)。幹細胞活性の有無を検証すべく、不妊マウス精巣への移植を行ったところ、G-GSほどではないものの、精巣に生着しコロニーを形成、精子形成を示した(図6A, B)。その精巣から得た円形精子細胞により顕微授精を行ったところ、F-GS由来の子孫の作製が確認され、F-GSに精子幹細胞としての性質が維持されていることも証明された(図6C)。以上のことは、F-GSは精子幹細胞としての性質を維持していながら、通常のGSよりも分化傾向にあることを示唆していた。

4.考察

①マウスで開発された精巣片器官培養法のラットへの応用

ラットの精巣片器官培養による精子形成誘導はマウスでの至適条件と異なり、培養温度37°Cであればどのような添加因子条件でも精上皮の重層化が確認された。しかしながら、更に培養を継続すると、10%FBS条件以外では精上皮の単層化が起きており、精子形成が途絶えてしまっていた。重層化が維持されている10%FBS添加条件でも、円形/伸張精子細胞の確認にはいたらなかった。

マウスにおいてはFBS中に精子形成阻害物質が含まれていることが示唆され、精子形成阻害物質が入っていないと思われる10%KOSR添加条件で精子形成が達成された。一方ラットでは一旦精上皮の重層化が見られたが、最終的には単層化してしまった。このことは、ラット試験管内精子形成にはKOSRの添加は十分ではなく、更に精子形成を促進する物質の添加が必要であることを示唆している。培養組織片の観察を行う限り、精巣の間質細胞、特にライディッヒ細胞の数が少なく且つ萎縮した形態をとっていることが見いだされた。10%KOSR培養条件では、変成しているライディッヒ細胞の機能補完としてテストステロンの補充が有効かもしれない。

②マウスGS細胞の試験管内精子形成誘導法

申請者はこれまで、GS細胞に種々の方法で分化誘導を試みたが成功しなかった。GS細胞培養系への添加が必須なGDNFは、GS細胞あるいはin vivo精子幹細胞の分化を抑制することが示されている(Kanatsu-Shinohara, M., et al., 2012; Meng, X., et al., 2000)。そこで申請者はGDNFを一時的に除去し、GS細胞に分化誘導許容性をもたらそうと考えて本研究を開始した。しかしながら意外なことに、GS細胞はGDNF非存在下でも生存し、速度は遅いものの対数増殖すること、そして精子形成能力をも保持していることを見いだした。このことは『精子幹細胞・GS細胞の生存・自己複製はGDNFに依存する』という従来の定説を覆すものであった。F-GSがこれまでの研究で明らかにされてきた精子幹細胞システムのヒエラルキーのどこに位置づけられるのか？精子幹細胞制御におけるFGF2とGDNFの役割の違いは何なのか？今後の研究でF-GS及びFGFシグナルの役割を明らかにすることにより、これまでのGDNF中心のストーリーとは異なる切り口で、精子幹細胞のバイオロジーに貢献できるのではないかと期待される。

この発見はGS細胞による試験管内精子形成法の確立にも貢献すると考えている。GS細胞はこれまでGDNF

存在下で培養されていたため、種々の分化誘導因子に対し反応することができなかった可能性がある。F-GSはGDNF存在下で培養されたGSと異なり、未分化状態維持や増殖に必要な*Etv5*、*Ccnd2*の発現が低下している一方、精子形成促進因子KITLの受容体であるKITを高発現している。このことは、F-GS細胞が分化型精原細胞に近い性質を有することを示唆しており、分化誘導に対してコンピテントな状態にある可能性が考えられる。今後は分化誘導因子によるF-GSの試験管内精子形成誘導の可能性を検討する予定である。

5.参考文献

- Eiraku, M., et al., *Cell Stem Cell*, 3, 519-532, 2008.
- Eiraku, M., et al., *Nature*, 471, 51-56, 2011.
- Kanatsu-Shinohara, M., et al., *Biol. Reprod.*, 69, 612-616, 2003.
- Kanatsu-Shinohara, M., et al., *Biol. Reprod.*, 78, 611-617, 2008.
- Kanatsu-Shinohara, M., et al., *Biol. Reprod.*, 85, 208-217, 2011.
- Kanatsu-Shinohara, M., et al., *Cell Stem Cell* 11, 567-578, 2012.
- Kubota, H., et al., *FASEB J.*, 25, 2604-2614, 2011.
- Marcon, L., et al., *Biol. Reprod.*, 83, 228-237, 2010.
- Sato, T., et al., *Nature*, 471, 504-507, 2011.
- Takashima, S., et al., *Genes Dev.*, 27, 1949-1958, 2013.
- Toyooka, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11457-11462, 2003.