134　生殖細胞内因性不妊マウスの体外精子形成誘導	佐藤　卓也

【目的】精子形成は、精子幹細胞の分裂増殖、2 回の分裂を伴う減数分裂、そしてダイナミックな形態変化を伴う精子変態から構成され複雑かつ緻密な分化過程である。以前、我々は器官培養法によって、未熟な精原細胞から精子へ至る精子形成過程を、体外において進行させることが可能な培養法を開発した。器官培養は培養液の組成を自在に変更できるため、生体内では実現が難しいような精巣内環境でさえ作れるという強みがある。それゆえ、男性不妊治療に応用できる可能性もあると期待される。レトロトランスポゾンを抑制する遺伝子である Piwi 経路構成遺伝子を欠損すると精子形成不全となり不妊となることが知られている。本研究では、Piwi 経路構成遺伝子ノックアウトマウスを不妊モデルして、精巣器官培養法よって、精子形成不全を *in vitro* で治療する方法を開発することを目的として開始した。これまで Piwi 経路構成遺伝子ノックアウトマウスの一つ、Tdrd7 KO マウスを対象に取り組んできたが、現在までに有効な方法の確立には至っていない。しかし、その研究過程で使用した逆転写酵素阻害剤が、野生型マウスの精巣の器官培養において、*in vitro* 精子形成効率を改善することを示唆する結果が予想外に得られた。我々の開発した精巣の器官培養法は、効率が低いという点が問題となっていた。そのため本結果は、この問題を解決する突破口となり得る重要な結果であると思われた。そこで逆転写酵素阻害剤の精巣の器官培養における精子形成誘導効率の改善効果とその作用機序の解明を行った。

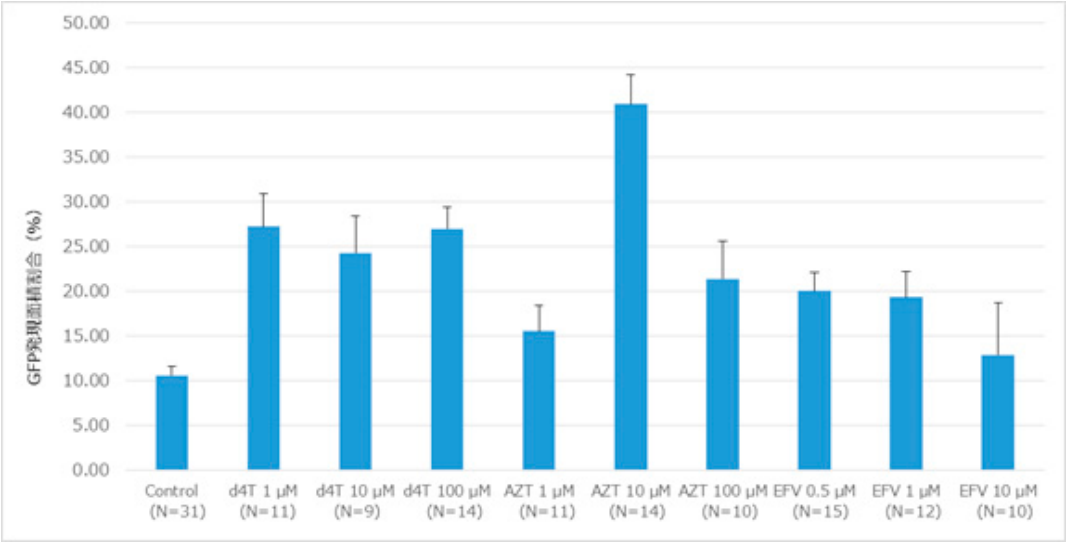
【方法】本研究では、3 種の逆転写酵素阻害剤について *in vitro* 精子形成の誘導効率への影響を調べた。精子形成のレポーターマウスである Acr-GFP マウスの新生仔の精巣を、それぞれの逆転写酵素阻害剤を添加し器官培養を行った。

【結果】逆転写酵素阻害剤を添加した群では、GFP の発現面積割合が向上し、精子形成誘導効率の改善が認められた。

逆転写酵素阻害剤は、レトロトランスポゾンの転移を抑制することが報告されているため、生体内精巣と培養した精巣の生殖細胞のレトロトランスポゾンのコピー数をそれぞれ調べた。その結果、生体内精巣に比べ培養した精巣ではレトロトランスポゾンのコピー数の増加が認められた。このことから、前述の逆転写酵素阻害剤による *in vitro* 精子形成効率の改善効果は、培養下の精巣組織で減弱した生殖細胞中のレトロトランスポゾン抑制の働きが、逆転写酵素阻害剤により補われ、レトロトランスポゾンのレトロ転移による、生殖細胞ゲノムへのダメージを抑制していることによると考えている。

今後、培養環境においてレトロトランスポゾンの抑制を減弱させる原因を探索し特定することで、より生体内の環境に近い培養法を開発し、高効率な精子形成誘導が可能になると予想している。

逆転写酵素阻害剤の添加による Acr-GFP 発現面積割合への影響



134. 生殖細胞内因性不妊マウスの体外精子形成誘導

佐藤　卓也

*横浜市立大学 医学群 分子生命医科学系列 プロテオーム科学(生命医科学)

Key words：精子形成，不妊，レトロトランスポゾン，器官培養

緒　言

精子形成は、精子幹細胞の分裂増殖、2 回の分裂を伴う減数分裂、そしてダイナミックな形態変化を伴う精子変態から構成され複雑かつ緻密な分化過程である。以前、我々は器官培養法によって、未熟な精原細胞から精子へ至る精子形成過程を、体外において進行させることが可能な培養法を開発した。器官培養は培養液の組成を自在に変更できるため、生体内では実現が難しいような精巣内環境でさえ作れるという強みがある。それゆえ、男性不妊治療に応用できる可能性もあると期待される。レトロトランスポゾンを抑制する遺伝子である Piwi 経路構成遺伝子を欠損すると精子形成不全となり不妊となることが知られている［1]。本研究では、Piwi 経路構成遺伝子ノックアウトマウスを不妊モデルして、精巣器官培養法よって、精子形成不全を *in vitro* で治療する方法を開発することを目的として開始した。これまで Piwi 経路構成遺伝子ノックアウトマウスの一つ、Tdrd7 KO マウスを対象に取り組んできたが、現在までに有効な方法の確立には至っていない。しかし、その研究過程において逆転写酵素阻害剤が、野生型マウスの精巣の器官培養の *in vitro* 精子形成効率を改善することを示唆する結果が予想外に得られた。我々の開発した精巣の器官培養法は、効率が低いという点が問題となっていた。そのため本結果は、この問題を解決する突破口となり得る重要な結果であると思われた。そこで逆転写酵素阻害剤の精巣の器官培養における精子形成誘導効率の改善効果とその作用機序の解明を行った。

方　法

1. 精巣組織培養

精巣組織の培養は、我々が以前報告した方法にしたがって行った［2]。安楽死させた Acr-GFP マウス（1.5～5.5 日齢）から精巣を摘出し、直ちに培養液中へ移し、白膜を引き裂き精巣組織を露出させた。その精巣組織を，ピンセットで切断し小さな精巣組織片にした。培養液に浸漬したアガロースゲルにのせ培養を行った。34℃、5% CO_2 に設定したインキュベーターにプレートを入れ、精巣組織を培養した。培地交換は、週に一度、全量の培地を新鮮な培地と交換した。

2. GFP 蛍光像からの GFP 発現面積割合の定量

週に一度、培養中の精巣組織を実体蛍光顕微鏡で観察し，培養終了時には，実体蛍光顕微鏡で明視野像と GFP 蛍光像を撮影した．画像処理ソフト ImageJ を用いて GFP 蛍光像から GFP 発現面積割合を算出した。培養組織の中心領域は，おそらく酸素不足のために GFP を発現しないため、組織全体からその領域を除いた周辺領域における GFP 発現面積を定量した。

3. レトロトランスポゾンのコピー数の定量

培養した精巣組織をコラゲナーゼとトリプシンによって処理し、単一細胞に分散処理を行った。セルソーター（MoFlo Astrios High-speed cell sorter）によって、GFP（＋）細胞をソーティングした。ソーティングした細胞は、QIAamp DNA Micro Kit を用いてゲノム抽出を行った。これを鋳型としてレトロトランスポゾン LINE1 の ORF2 に対応するプライマーを用いて、SYBR green を用いた定量 PCR を行った。また、ノーマライズは、5S rDNA に対応するプライマーを用いて行った。

*現在の所属：横浜市立大学 医学群 分子生命医科学系列 創薬再生科学（生命医科学）

結果および考察

1. 逆転写酵素阻害剤は *in vitro* 精子形成誘導効率を改善

Piwi 経路構成遺伝子を欠損した不妊モデルマウスの体外精子形成誘導法を用いた治療法を開発する過程で、偶然ながら逆転写酵素阻害剤が *in vitro* 精子形成の誘導効率を改善することを示唆する結果が得られた。そこで、本研究では，ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤である Sanilvudine（d4T）、Zidovudine（AZT）の 2 剤、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 Efavirenz（EFV）の 1 剤を用いて *in vitro* 精子形成の誘導効率への影響を検討した。

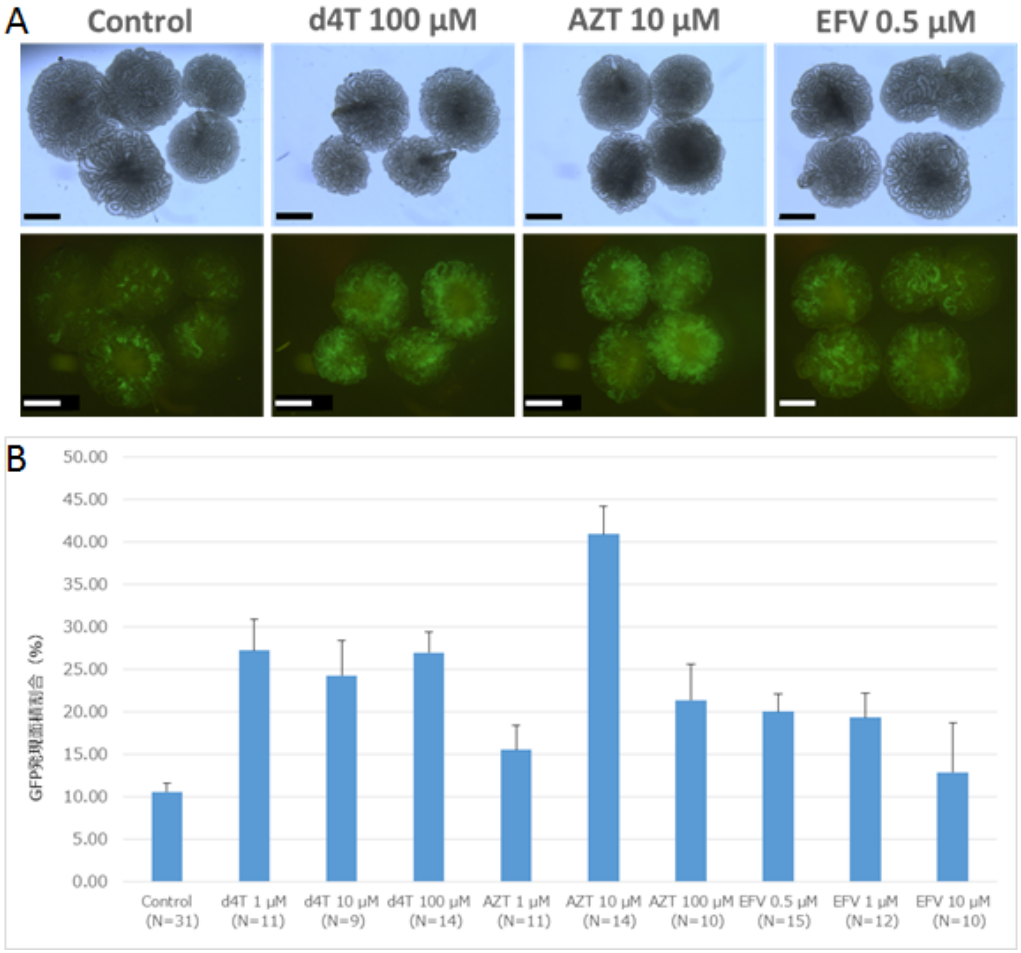


図 1. 逆転写酵素阻害剤の添加による Acr-GFP 発現面積割合への影響

(A) 3.5 日齢の Acr-GFP マウス精巣組織を、9 条件の逆転写酵素阻害剤を添加して、36 日間培養した。培養終了時の明視野像，GFP 蛍光像の一部を示した．スケールバー = 1 mm。(B) 1.5～5.5 日齢の精巣を培養した。GFP 蛍光像をもとに算出した GFP 発現面積割合 (%) を比較した。AZT 10 μM，d4T 100 μM で培養した群において、Acr-GFP 発現範囲割合が高くなっていた (mean + s. d.，N：サンプル数)。

d4T、AZT、EFV の濃度をそれぞれ 3 段階に割り振り，培養液に添加して，d4T、AZT を添加して 1.5～4.5 日齢 Acr-Gfp マウスの精巣組織を 36～42 日間培養した。Acr-GFP マウスは、緑色蛍光タンパク質（green fluorescence protein，GFP）が減数分裂パキテン期の精母細胞の細胞質で発現し始め，円形精子細胞が精子になる過程で形成される先体（acrosome）に凝集する。精子形成の進行をモニターすることが可能なトランスジェニックマウスである。コントロール群では，培養 15 日目、19.5 日齢相当には GFP 発現が確認され、培養 28～32.5 日齢相当で GFP の発現面積はピークを迎えたが、その後、GFP の発現面積は次第に退行していった。これは我々の以前の報告と同様の結果である [2]。逆転写酵素阻害剤を添加した組織のうち d4T を 100 μM, AZT を 10 μM 添加した 2 条件で培養した組織は、

添加していないコントロール群に比べて、39.5 日齢相当においても広範囲での GFP の発現を維持していた（図 1A)。

画像処理ソフトを用いて GFP 蛍光像から精巣組織の GFP 発現面積 を定量した。その結果、どの逆転写酵素阻害剤でも GFP 発現面積がコントロールに対し 2 倍以上向上していたが、特に AZT を 10 μM で添加した群が最も GFP 発現面積割合が高く，コントロール群に対し約 4 倍の発現面積割合を示した（図 1B)。この結果から、逆転写酵素阻害剤が *in vitro* 精子形成の効率の改善させる可能性が考えられた。

2. 培養した精巣中の生殖細胞における LINE1 のコピー数の増加

逆転写酵素阻害剤はレトロウイルスの増殖を抑制する治療薬として開発されたが、レトロトランスポゾンの転移も抑制することが報告されている［3]。ほ乳類のゲノムの大半を占めるレトロトランスポゾンなどの転移因子は、ほとんどの場合、抑制され不活性化されている。これは、その活性化がゲノムに挿入変異を引き起こし、様々な障害をもたらすからである。オスの生殖細胞においてレトロトランスポゾンの脱抑制が生じると、精子形成が停止し雄性不妊になることが知られている。このことから、前述の逆転写酵素阻害剤による *in vitro* 精子形成効率の改善効果は、培養下の精巣組織で減弱した生殖細胞中のレトロトランスポゾン抑制の働きが、逆転写酵素阻害剤により補われ、レトロトランスポゾンのレトロ転移による、生殖細胞ゲノムへのダメージを抑制していることによるという仮説をたてた。

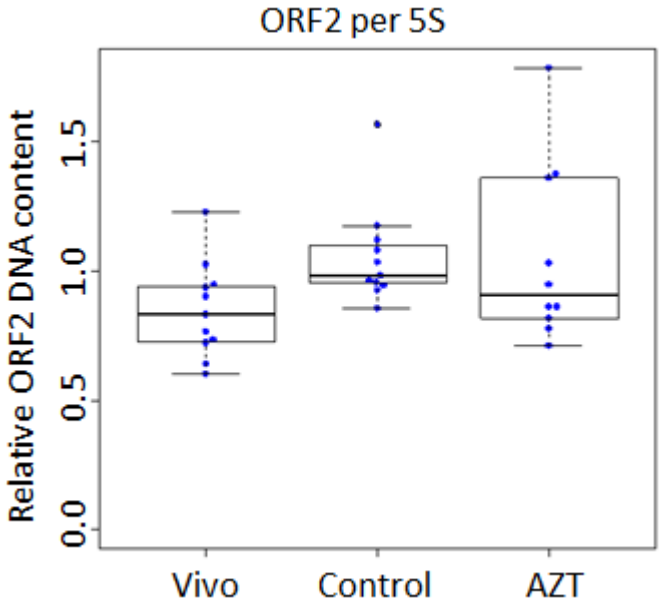


図 2. 生体内精巣由来の生殖細胞と培養した精巣由来の生殖細胞における LINE1 のコピー数の変化
新生仔Acr-GFPマウスの精巣を1個体毎にControlとAZT添加群に分けて器官培養を行った。22.5日齢相当まで培養を行いセルソーターで生殖細胞を分取し、そのゲノム中のLINE1のORF2のコピー数を定量PCRによって調べた。生体内精巣(Vivo）は、同腹仔の22.5日齢マウスを使用した。

そこで、培養した精巣組織中の生殖細胞でレトロ転移の脱抑制が生じているかどうかを調べるため、定量 PCR 法で調べた。レトロトランスポゾンの脱抑制によって精子形成不全となるマウスの多くは、減数分裂パキテン期で精子形成が停止し、最終的にはアポトーシスする。したがって、減数分裂が完了する 20 日齢相当の培養精巣中の生殖細胞はコピー数が増加した細胞が一定数含まれているのではないかと考えた。Acr-GFP マウスの精巣(3.5 日齢)を 19 日間培養し，22.5 日齢相当まで培養し、セルソーターで GFP 陽性細胞を分取し、ゲノムを抽出し、そのレトロトランスポゾン LINE1 の ORF2 のコピー数を調べた。

その結果、培養組織中の生殖細胞は、同時期の生体由来生殖細胞に比べレトロトランスポゾンのコピー数が増加する傾向があるということが分かった（図 2)。また、AZT を添加し培養することで、そのコピー数の増加がある程度抑制されていることも明らかになった。

本研究において、精巣の器官培養を引き金として、生殖細胞のレトロトランスポゾンの抑制が破綻することが示唆された。精巣の器官培養法の問題点は、その精子形成効率が低く、器官培養した精巣において精子が産生される精細管は、全体のわずか数%に過ぎないということである。この原因として、培養中にレトロタンスポゾンが脱抑制した生殖細胞がアポトーシスし消失することで精子形成効率が低下しているのではないかと考えている。今後、培養環境においてレトロトランスポゾンを脱抑制させる原因を探索し特定することで、より生体内の環境に近い培養法を開発し、高効率な精子形成誘導が可能になると予想している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学医学群分子生命医科学系列創薬再生科学（生命医科学）の小川毅彦教授、加藤小百合、小野有希奈である。

文　献

1） Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. 2013;368(1609):20110338. doi: 10.1098/rstb.2011.0338. PubMed PMID: 23166399; PubMed Central PMCID: PMC3539364.

2） Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature. 2011;471(7339):504-7. Epub 2011/03/25. doi: 10.1038/nature09850. PubMed PMID: 21430778.

3） Dai L, Huang Q, Boeke JD. Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Ty1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition. BMC biochemistry. 2011;12:18. doi: 10.1186/1471-2091-12-18. PubMed PMID: 21545744; PubMed Central PMCID: PMC3103432.