

Title	Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia.
Author(s)	藤田, 和利
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46247">https://hdl.handle.net/11094/46247</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	藤 田 和 利
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20177 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. (白血病マウスから分離した精原性幹細胞の移植により白血病を発症することなく妊孕性を回復できた。)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥 山 明 彦  (副査) 教 授 大 藪 恵 一 教 授 仲 野 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

小児白血病は治療法の発達により 70%以上で完治するようになったが、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することにより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射出精子及び精巣内精子を得ることができない。思春期前の小児に対する治療法として、療治療開始前に患児の精巣から精細胞を採取、保存し、癌治療後に成熟精子まで分化誘導させる種々の方法が開発されつつある。この中の一つが Brinster らにより 1990 年代前半に開発された精細管内移植法である。輸出精細管より精原幹細胞を含む精細胞を精巣内に注入すると、精細胞は精細管内で生着し新たに造精が行われる。マウスだけでなくサルからサルへの精細管内移植も成功しており、ヒトの不妊治療への応用が期待されている。つまり、癌治療前に患児の精巣から精細胞を採取、凍結保存し、癌治療後に無精子となった精巣へ精細管内移植を行い、妊孕性を回復させる方法である。しかし、白血病モデルのラットの精巣を摘除し、間質の細胞を除いただけの精細胞を用いて精細管内移植を行うと、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ため、この方法をそのままヒトに応用することはできない。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孕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。そこで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分離した精細胞を精細管内移植し、妊孕性を回復させる目的として研究をおこなった。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

白血病モデルマウスとして、マウスは C57B1/9 を、白血病細胞は C57B1/9 由来の骨髓系白血病細胞である C1498 を用いた。これまでに多くの精原性幹細胞特異的の表面マーカーが報告されているが多くのマーカーは腫瘍細胞でも発現されているため、腫瘍細胞を精原性幹細胞より 100%除去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発現パターンを正常マウス精巣より調整した精細胞および白血病細胞を別々に Flowcytometry 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 (-) の細胞集団 (精細胞分画)

として、白血病細胞は MHC-class I (+) および CD45 (+) の細胞集団 (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。

次に白血病細胞をマウス腹腔内に投与して末期状態となり白血病細胞の浸潤した精巣を用いて、2種類の抗体で染色し Fluorescence activated cell sorting (FACS) により白血病細胞分画と精細胞分画を分離した。安全性の確認のため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。次に白血病マウスより分離した精細胞分画の精細管内移植を試みた。移植を受けるマウスはアルキル化剤であるブスルファンを移植 4 週間前に投与し、無精子症とした。ドナー細胞由来およびレシピエントの精巣由来の精子形成を区別するため、GFP マウスに白血病細胞を接種し、白血病細胞が浸潤した GFP マウスの精巣をドナーとして用いた。2種類の抗体を用いて同じように FACS で精細胞分画を分離した。分離前の細胞を精細管内移植したところ、移植後 2 週間で精巣内に白血病細胞の浸潤を認めた。しかし、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 カ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。

#### 〔 総 括 〕

MHC-class I および CD45 に対する抗体を用いて、白血病マウスモデルの精巣より精原性幹細胞を含む精細胞を分離することができ、この分離した精細胞を精細管内移植することにより、白血病を発症することなく精細管内に生着させ、得られた精子を用いて正常仔を ICSI により得ることが出来た。

### 論文審査の結果の要旨

現在小児白血病は集学的治療により長期生存が可能となった。しかし成長後無精子症のため男性不妊となる晩期障害が問題となっている。生殖機能を温存する方法として精細管内移植法があるが、そのまま精細胞を移植すると白血病が再発する。そこで白血病モデルマウスで細胞表面マーカーによる精細胞の分離を行い精細管内移植法により妊孕性を回復させる方法を検討した。

具体的にはマウス由来の白血病細胞を用いて分離に使用する抗体を探索した結果、CD45 と MHC-class I に対する 2種類の抗体を組み合わせることにより白血病細胞と精細胞を完全に分離できることを明らかにした。白血病を発症させたマウスから 2種類の抗体を加えて分離した精細胞を抗癌剤投与により無精子症となったマウスに精細管内移植を行うと、白血病が発症することなく生殖機能を回復させることに成功した。

本実験系の臨床応用が可能となれば白血病など悪性腫瘍患児の生殖機能の回復および維持に大きな福音となり、学位の授与に値すると考えられる。