

ストライプ状照射を用いた精子形成能維持と臨床応用

福永 久典*¹ 横谷 明德*²
Fukunaga Hisanori Yokoya Akinari

1. 緒言

放射線による生体組織への影響が初めて認識されたのは、1895年のヴィルヘルム・レントゲン博士によるX線発見の直後である¹⁾。1902年には皮膚に生じた放射線発がんが初めて報告され、更に1911年には放射線業務従事者5名が白血病の診断を受けている²⁾。そして、広島、長崎における我が国の被ばく者の調査等を含めた放射線疫学研究の結果から、閾値の有無にかかわらず、これらの放射線による生体影響は被ばく線量に依存していると従来考えられてきた³⁻⁵⁾。

しかし、近年の放射線生物学研究の成果から、組織当たりの放射線被ばく線量は同じでも、生物学的影響の質や量が異なる現象が見出されている。例えば、組織代償効果 (tissue-sparing effect, TSE) や放射線誘導バイスタンダー効果等、線量に依存しない放射線生物学的現象が報告されている。これらの「非標的効果」、すなわち放射線トラックが直接ヒットした細胞とヒットしていない細胞の間の相互作用は、放射線生物学における重要な研究対象となっている。その分子メカニズムは未明であるが、最近の成果から、この生物学的な応答は、細胞、組織の種類や、微視的に見たときの放射線エネルギー付与分布等に起因することが徐々に明らかになってきた⁶⁾。

TSEの本質は「空間的分割照射により生じる組織レベルでの放射線耐性の獲得」である。臨床においては、空間的に不均一な照射野内で生じるTSEについて1世紀以上前から認識されていた。1909年

にアルバン・ケーラー博士が、格子状に放射線源を配置して空間的な分割照射を行うという格子放射線治療により、世界で初めてTSEの臨床観察を報告している⁷⁾。更に、1995年には米国ブルックヘイブン国立研究所の放射光シンクロトロン実験施設で行われたストライプ状照射実験でラット脳組織におけるTSEが報告されている⁸⁾。このような空間的分割照射によるTSEは、臨床応用だけでなく、環境放射線等の不均一な照射被ばく後の生物学的影響の評価にも重要である⁹⁾。

本稿では、最近、筆者らが見出したTSEによるストライプ状照射後の精子形成能の維持と、その臨床応用の可能性について概説したい。

2. マウス精巣器官培養法

ヒトの精子形成は約60~70日、マウスの精子形成は約30日で進む。言うまでもなく、精子形成は「遺伝情報の継承」という意味で、生物にとって最も重要な生理的現象である。しかし、この精子形成は放射線被ばくによる障害を受けやすく、実際、放射線治療における重篤な有害事象の1つとして不妊が上げられる。そこで、筆者らは「精巣でのTSEを制御することで放射線治療後の精子形成能の保護が可能になる」という仮説を立てた。

2011年、筆者らの共同研究者である小川毅彦教授 (横浜市立大学) らの研究グループによって、「精子幹細胞から生殖能を有する精子の形成までの誘導」を可能とするマウス精巣器官培養法が世界で初

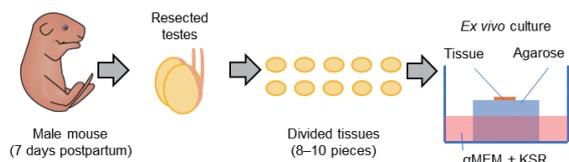


図1 マウス精巣器官培養法

生後7日齢の仔マウスから精巣を摘出し、 1 mm^3 大の組織片に分割する。溶媒に半分ほど浸したアガロースゲル上に組織片を置き、培養する

めて開発された(図1)¹⁰⁾。更に、この培養法に加えて、精子形成細胞特異的にマーカー遺伝子を発現する *Acr-GFP* トランスジェニックマウスを用いることで、このマウスは減数分裂中期(パキテン中期)から細胞質に GFP を発現するため、精子細胞に至る精子完成の過程を蛍光顕微鏡下で容易に観察することができる¹¹⁾。筆者らは、この実験系を用いて、まず既知の放射線被ばく影響を再現できるかどうかを検討した。分娩後7日目の *Acr-GFP* トランスジェニックマウスから精巣を摘出し、 1 mm^3 程度の大きさの小切片に切り分けて、溶媒に浸した1.5%アガロースゲル上で培養した後、放射線を照射してから蛍光顕微鏡で精子形成の進行を詳細に解析した。そして、生体内の精子形成に対してよく知られている放射線被ばく影響、すなわち一時不妊や永久不妊等を再現できることを示した¹²⁾。

3. マイクロビームを用いたストライプ状照射と精巣組織代償効果

次に、筆者らは高エネルギー加速器研究開発機構フォトンファクトリー(PF)の放射光X線マイクロビーム照射実験施設を用いて^{13,14)}、ストライプ状照射実験を行った。マイクロビームは、荷電粒子、X線、電子等のミクロン又はサブミクロンサイズの電離放射線を個々のサンプル又はその一部に照射できる便利なモダリティである¹⁵⁾。PFのBL-27にあるマイクロビーム照射装置も、5.35 keVエネルギーのX線の照射範囲をマイクロメートルオーダーで自在に操作することができる(図2)。

本研究では、図3aのように、不均一な放射線被ばくを再現するため、7日齢マウスから摘出した精巣片の照射野50%に当たるよう200 μm 間隔でストライプ状に照射を行った。そして、驚くべきことにストライプ状に5 Gyを50%に照射したサンプル

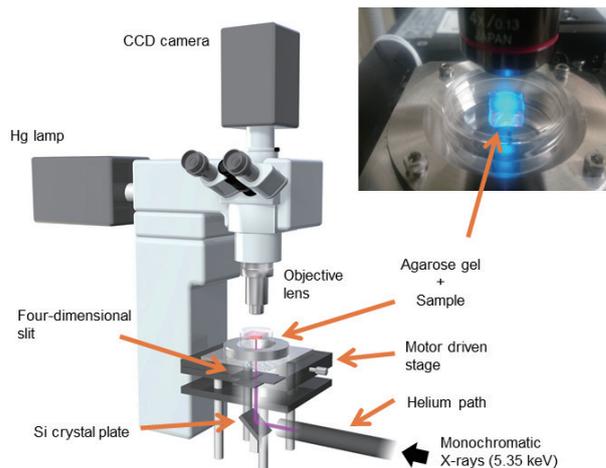


図2 放射光X線マイクロビーム照射装置

培養中のディッシュから溶媒を抜いて逆さまにして、マイクロビームを下から精巣組織内の設定範囲に照射する。右上は実際の写真

(2.5 Gy 換算相当)と、2.5 Gyを全体に照射したサンプルでは、その後の精子形成に明らかな違いが生じることを発見した(図3b)¹⁶⁾。更に、Periodic acid-Schiff stain 染色を用いて、ストライプ状照射後に受精可能な精子細胞まで形成されることも確認した。

全体均一照射と不均一(スリット状)照射は、組織レベルでは同じ2.5 Gy相当の放射線被ばくであるが、微視的に見たときに放射線によるエネルギー付与分布は明確に異なっている。したがって、その差異によってTSEが生じ、精子形成が保存されると考えられた。生殖機能を司る器官でTSEが生じることを世界で初めて示した成果となった。

4. 一般的なX線照射装置を用いたストライプ状照射と精巣組織代償効果

更に、筆者らは精巣でTSEが生じるX線のエネルギー幅について検証を加えた。一般的なX線照射装置(SOFTEX, Sagami, Japan)と300 μm 厚の鉛薄板を用いて、150 kVpエネルギーのX線の300 μm 間隔ストライプ状照射を試みた。そして、ストライプ状に10 Gyを50%に照射したサンプル(5 Gy換算相当)と、5 Gyを全体に照射したサンプルでは、その後の精子形成に明らかな違いが生じることを確認した(図4)¹⁷⁾。すなわち、一般的なX線照射装置を用いてもTSEを生じさせることが可能であることが確認され、適用できるX線のエネルギー領域は非常に広いことが明らかとなり、将来

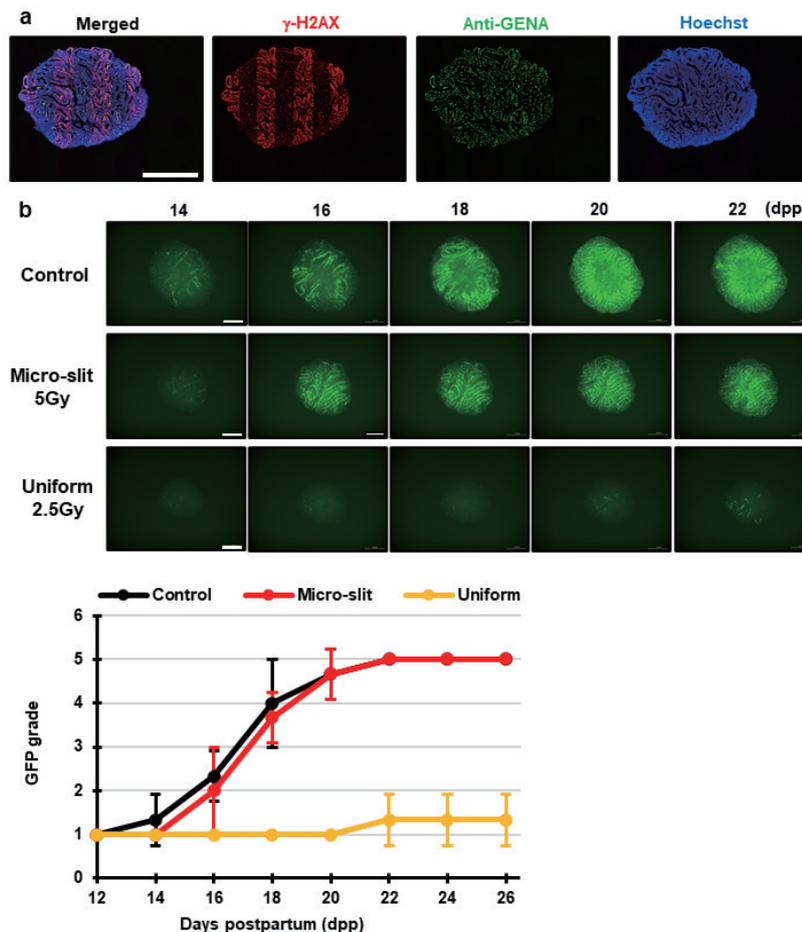


図3 マイクロビームを用いたストライプ状照射と精巣組織代償効果

(a) マイクロビームを200 μ m間隔でスリット状に照射後の精巣片。 γ -H2AX, Anti-GENA, Hoechstは、それぞれ放射線によるDNA二重鎖切断、生殖細胞、細胞核を示す。
 (b) 200 μ m間隔で5 Gyを照射したサンプル(中段)と2.5 Gyを全体に照射したサンプル(下段)。組織レベルでは同じ2.5 Gy相当の放射線被ばくだが、精子形成効率が明確に異なる

への臨床応用への可能性が示唆された。もしも空間的分割照射によってTSEを制御することで放射線治療に伴う男性の放射線不妊を克服することができれば、新しい放射線治療アプローチとしてストライプ状照射法が有望であると考えられる。

5. 考察及び今後の展望

マイクロビームと組織培養を組み合わせたアプローチによって、TSEによってストライプ状照射後の精子形成能維持が可能となること、更に放射線不妊克服へつながる可能性があることが明らかになった。しかし、精巣でTSEが生じる分子メカニズムはまだ十分に明らかになっておらず、今後、組織培養法等を用いた詳細な検討が必要になると考えられ

る。例えば、*ex vivo* マウス精子形成系を用いることで、空間的に不均一な放射線環境下での精子幹細胞の生物学的変化について、そこに介在するTSEのメカニズム解明も含めて、更なる検証が可能になる。更に、今後、精子幹細胞動態を制御する幹細胞とその周囲の分化した細胞との間(ニッチ)におけるシグナル分子の交換の様子等、実験に加えシステム生物学的なシミュレーションへの展開も期待される。

謝辞

本稿の執筆に関して、多くの御指導を賜りましたQueen's University BelfastのProf. Kevin M. Prise、横浜市立大学の小川毅彦教授、佐藤卓也博士、高エネルギー加速器研究開発機構の宇佐美徳子博士に御礼申し上げます。

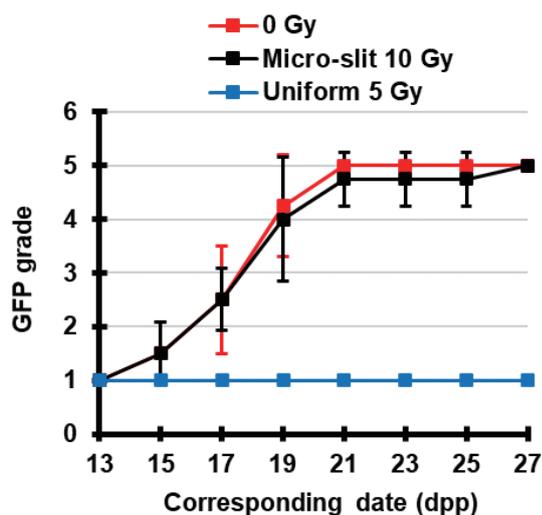
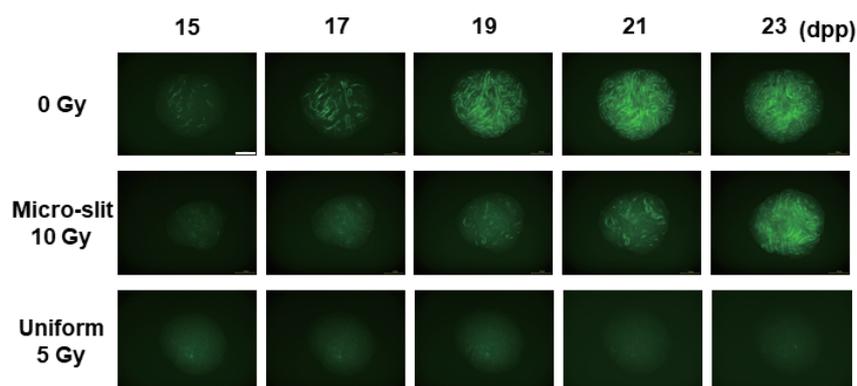


図4 一般的な X 線照射装置を用いたストライプ状照射と精巣組織代償効果

一般的な X 線照射装置と鉛板を用いて 300 μ m 間隔で 10 Gy を照射したサンプル (中段) と 5 Gy を全体に照射したサンプル (下段)。組織レベルでは同じ 5 Gy 相当の放射線被ばくだが、精子形成効率が明確に異なる

参考文献

- 1) Daniel, J., *Science*, **3**, 562-3 (1896)
- 2) Shah, D. J., *et al.*, *Br. J. Radiol.*, **85**, e1166-73 (2012)
- 3) Brenner, D. J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 13761-6 (2003)
- 4) Kamiya, K., *et al.*, *Lancet*, **386**, 469-78 (2015)
- 5) Ozasa, K., *et al.*, *J. Epidemiol.*, **28**, 162-9 (2018)
- 6) Watanabe, R., *Radiat. Biol. Res. Commun.*, **47**, 335-346 (2012)
- 7) Schültke, E., *et al.*, *Br. J. Radiol.*, **90**, 20170073 (2017)
- 8) Slatkin, D. N., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 8783-7 (1995)
- 9) Fukunaga, H., and Prise, K. M., *Environ. Heal.*, **17**, 93 (2018)

- 10) Sato, T. *et al.*, *Nature*, **471**, 504-7 (2011)
- 11) Yokonishi, T., *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, **927**, 479-88 (2013)
- 12) Fukunaga, H., *et al.*, *Radiat. Res.*, **189**, 661-7 (2018)
- 13) Kobayashi, K., *et al.*, *J. Radiat. Res.*, **28**, 243-53 (1987)
- 14) Yokoya, A., and Usami, N., *Quantum Beam Sci.*, **4**, 2 (2020)
- 15) Ghita, M., *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **94**, 708-718 (2018)
- 16) Fukunaga, H., *et al.*, *Sci. Rep.*, **9**, 12618 (2019)
- 17) Fukunaga, H., *et al.*, *J. Clin. Med.*, **9**, 1089 (2020)

(* 1 東北大学東北メディカル・メガバンク機構,

* 2 量子科学技術研究開発機構量子生命科学領域)