

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 医薬品開発の迅速化・高度化に資する「次世代型」雄性生殖毒性評価法の開発
(英語) Development of safety evaluation of male reproductive toxicity which can contribute to the drug discovery

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 横田 理
(英語) Satoshi Yokota

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター毒性部・主任研究官
(英語) Division of Cellular & Molecular Toxicology, Center for Biological Safety & Research, National Institute of Health Sciences・Senior Researcher

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

雄性生殖細胞系列に対する毒性が認められると、発生毒性・遺伝毒性の懸念があるとして医薬品開発の中止を余儀なくされる。現在、医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドライン（ICH-S5）に記載されている受胎能及び初期胚発生（FEED）に関する非臨床試験において、実験動物の交配前から交尾、着床に至るまでの投与による有害作用（ハザード）の検討が行われている。雄動物に対しては、雄受胎能評価、精巣及び精巣上体の病理組織学的検査（通常、一般毒性評価で実施）、精子検査が行われる。しかし、薬剤誘発性の生殖ハザードは、精子形成過程のあらゆる段階での毒性を想定する必要がある、医薬品候補化合物の有害性の有無、また、有害性が顕在化するタイミングを適切に評価することが重要である。本研究では、これら既存の毒性試験法の現状と特徴を鑑み、医薬品開発の迅速化・高度化を見据えたヒトへの予測性向上に資する「次世代型」雄性生殖毒性評価法の開発を目的とし、3年間研究を遂行してきた。

先行研究において我々は、染料である Reactive Blue 2（RB2）を用いたヒト精子染色診断法を開発した。興味深いことに、従来法ではいわゆる良好精子と判定される頭部形態が楕円形の運動性を有した不妊患者精子に対して RB2 染色を実施すると、精子頭部に空胞が高頻度に検出された。加えて、高解像度な DNA 損傷の可視化技術を開発し、当該不妊患者精子から極微細な DNA 断片化の検出にも成功した。実際に、当該患者精子は生殖補助医療の成功率が極めて低く、臨床診断における本手法の有用性が示唆された（Kaneko and Yokota et al., *J Med Diagn Meth.* 2023）。

本研究では、このヒト精子染色診断法をマウスに適用するため、C57BL/6J マウスに対し、抗がん剤ブスルファンを 40 mg/kg の用量で腹腔内に投与し、精子形成障害（不妊）モデルを作製後、RB2 色素を用いた生殖毒性評価の有用性・頑健性を検証することとした。まず、野生型マウス精巣組織に対し弱塩基性条件下で RB2 染色を行った。この結果、精上皮周期（精子形成サイクル）のステージ XII, I-VIII の精細管において内腔側の step12-16 の伸長精子細胞において RB2 の染色特異性が確認された。マウス精子形成においては、step12-16 の伸長精子細胞の分化過程において、ヒストンの大部分はプロタミンへと置換され、妊孕能を獲得すると考えられている。従って、RB2 はプロタミンに化学結合することにより精子染色特異性を発揮することが想定された。そこで、ヒトまたはマウス由来の標準プロタミンタンパク質を購入し、RB2 と *in vitro* 環境下で反応させた。この結果、弱塩基性条件下においては、プロタミンと RB2 の化学結合による青い凝集像を顕微鏡下で確認した。一方で、陰性対照として用いた体細胞（HeLa 細胞）核画分などプロタミンを発現しないタンパク質と RB2 を反応させても凝集像は全く確認されなかった。興味深いことに、中性条件下でこれらタンパク質と RB2 を反応させるといずれも青い凝集像を形成し、プロタミンに対する染色（結合）特異性は消失した。この染色特異性は、マウス精巣組織に対しても同様な結果が得られた。すなわち、中性条件下では step12-16 伸長精子細胞以外の全ての生殖細胞系列やセルトリ細胞などの体細胞核にも染色性を示し、染色特異性の消失を確認した。一般的に、プロタミンはアルギニンリッチなタンパク質のため、生体内におけるタンパク質の中で最も塩基性を示すことが知られている。このため、弱塩基性条件下では、プロタミンのみが正に荷電するため、RB2 のスルホン基の負電荷とのイオン結合が可能となり、プロタミンへの染色（化学結合）特異性が認められたものと考えられた（特願 2022-39134）。

次に、ブスルファン投与 4 週経過した雄性不妊モデルマウス精巣組織に対し RB2 を用い染色すると、野生型と比較し RB2 陽性の精細管の割合が有意に低下することが明らかとなった。さらに、ブスルファン投与群においては、野生型マウスの精巣上体頭部組織で検出されるような精巣上体管内における RB2 陽性の精子細胞は全く検出されなかった。このように、RB2 は精子細胞特異的に染色するため、生殖細胞数の定量的評価にも今後活用できるものと期待され、従来の HE 染色を用いた病理組織学解析における精子形成障害の迅速評価

の一助となることが示唆された (Yokota et al., *Andrologia*. 2023, Miyaso and Yokota et al., *J Toxicol Sci*. 2024)。

精子形成におけるヒストンからプロタミンへの置換は、遺伝情報保存に有利な精子ゲノム DNA のパッケージングに重要である。この置換異常は、RB2 の染色性変化として捉えられ、精子 DNA 損傷との関連が疑われた。しかし、精子ゲノム DNA はプロタミン等のタンパク質と強力に相互作用するため、体細胞を対象に実施される従来のゲノム DNA 電気泳動法ではタンパク除去が不十分と考えられ、DNA 損傷を捉えることが困難であることが懸念された。そこで我々は、シングルセルパルスフィールドゲル電気泳動 (SCPFGE) 法による精子 DNA 損傷の解析手法を独自開発した。本 SCPFGE 法は、精子細胞の可溶化とゲノム DNA から核タンパク質の効率的な除去を行い、パルスフィールドと薄層アガロース上での電気泳動法を採用したことにより DNA 損傷の微細な変化を高感度かつ高解像度に可視化することに成功した。これにより、従来の遺伝毒性評価で実施されるコメットアッセイでは評価困難な DNA の初期断片化の観察が可能となった。結果として、当該精子の割合が野生型と比較してブスルファン投与後 4 週経過時のマウス精子において有意に亢進することが明らかとなり、精子 DNA 損傷の早期検出に成功した。ブスルファン投与 12, 18 週経過時には大半の精子において DNA の末期断片化を認め、本モデルマウスが確かに雄性不妊であることを確認した。

他方で、抗がん剤の投与量や投与間隔などの違いにより、雄性生殖細胞に対する毒性発現メカニズムは異なることが予想される。投薬後から毒性発現時期や休薬後の回復に関する時間情報は現状乏しく、どの時点で実験動物を屠殺し解析に供する必要があるのかを的確に判断することは容易なことではない。我々は、これまで非侵襲的評価が困難とされた小動物に対し磁気共鳴画像法 (MRI) を用いた生体イメージングによる病理学的・解剖学的評価を実施し、マウス精巣障害の検出に国内外で初めて成功した (Yokota et al. *J.Toxicol.Sci*. 2023)。ブスルファン投与 1 週後より、経時的に小動物用 MRI を用い、イソフルラン麻酔下にてマウス精巣を撮像した。MRI の撮像条件は断続的に撮像可能なグラジエントエコー (GRE) 法を採用し、精巣組織とその周辺領域を高いコントラストにて判別した。各スライスの精巣領域を囲み T1 強調画像を得た。また、これらを三次元再構築し、精巣体積を算出した。MRI の撮像後にマウスを解剖し、精巣や精巣上体の重量を測定した。精巣および精巣上体はブアンまたはホルマリン固定し、アルコール系列で脱水後パラフィン包埋し、作製した切片は PAS 染色により病理組織学的解析に供した。T1w GRE シーケンスの結果、投与 4 週経過時においてブスルファン投与群マウス精巣の萎縮と T1 強調画像の高信号を認めた。実際に、解剖にて採取した精巣の重量は、ブスルファン投与群で有意な減少を認めた。さらに病理組織学的解析により、ブスルファン投与群の精巣間質では浮腫がみられ、PAS 陽性の浸出成分が検出された。このことより、MRI で観察された T1 強調像での高信号は、間質で認められた浸出成分による高分子水和効果によるものと推察された。また、投与 12, 18 週経過時において精巣体積は、投与 4 週経過時と比較し有意な減少を示した。これらの結果より、ブスルファン投与により精子幹細胞がダメージを受けた可能性が考えられ、休薬後に精子産生能が回復しなかったと考察された。実際に、本結果は上述の病理組織学的所見とも高い相関を示すことから、MRI を用いた非侵襲的評価により、マウスの精巣毒性を評価可能なことが明らかとなった。

以上、本研究において開発してきた一連の雄性生殖毒性評価法は、既存の医薬品ガイドラインに基づき実施される生殖毒性評価 (一般毒性試験や生殖発生毒性試験) を補強する新技術として、医薬品開発の迅速化・高度化に資するものと期待される。

英文：

The evaluation of male reproductive toxicity is a crucial aspect of drug discovery, given that the detection of toxicity in preclinical studies results in the termination of drug development. Toxicity can be detected using several approaches, and the identification of histopathological alterations in the seminiferous tubules is the most accepted, sensitive, and direct marker of male reproductive toxicity. However, this conventional approach of employing experimental animals cannot be compared with human testis and requires considerable effort. In the absence of expert evaluation, the use of this method may result in defective figures. Therefore, there is an urgent need to develop rapid and efficient methods to detect and clarify the causes and nature of male reproductive toxicity. Furthermore, for the most accurate evaluation of male reproductive toxicity, other key reproductive endpoints must be considered to determine the underlying cause and suppression of spermatogenesis, ultimately resulting in reduced sperm quality and fertility. However, sperm quality and fertility data obtained from rodents exposed to chemicals (i.e., anticancer drugs) poorly predict human sperm toxicity, and there is limited information available regarding the impact of several chemicals on human spermatozoa. Moreover, chemicals that negatively impact sperm quality in rodents without affecting mating outcomes may still pose a risk to humans, as these findings may indicate undesirable effects on reproductive development.

Herein, we developed a novel method to evaluate male reproductive toxicity in experimental animals. First, we developed a mammalian male germ cell-specific staining method using Reactive Blue 2 dye (RB2), as previously described for human sperm. Second, we successfully developed a method for detecting the early stages of DNA fragmentation in a single nucleus from mouse spermatozoa using single-cell pulsed-field gel electrophoresis. In this method, the elongated DNA fibers were classified into four categories: long-chain fibers, stretching from the origin without interruption; fibrous fragments that had separated beyond the anterior end of the long-chain fibers; granular fragments that were discharged beyond the fibers; and ultimately, almost all the DNA degraded to granular fragments. The comet assay is routinely used to detect DNA fragmentation; however, this assay is insensitive to the early stages of DNA fragmentation. Single-cell pulsed-field gel electrophoresis enabled the precise evaluation of sperm DNA integrity. Third, we established a new, ready-to-use, and compact magnetic resonance imaging (MRI) platform using a high-field permanent magnet to evaluate male reproductive toxicity. The histopathological analysis supported the suitability of the MRI platform, and the present study, for the first time, revealed a rapid, noninvasive evaluation of male reproductive toxicity in vivo using compact MRI.

The present study successfully developed a novel staining technique for evaluating sperm quality and a noninvasive imaging analysis of male reproductive toxicity.