

精子幹細胞の培養と精子形成

小川 毅彦

横浜市立大学大学院医学研究科泌尿器病態学教室

はじめに

精原細胞移植法と精子幹細胞の培養法の開発により、精子幹細胞に関する研究は過去15年間で大きく進展した。ここでは、われわれの最近の研究成果も交え、精子幹細胞研究の経緯を振り返り、今後の課題を概説する。

精原細胞移植（精細管内移植法）

1994年、米国ペンシルベニア大学の Brinster らは、アルキル化抗癌剤のブスルファンで前処理したマウス（レシピエント）精巣の精細管内に、無処理マウス（ドナー）の精巣細胞を注入移植するとドナー由来の精子形成がレシピエント精巣内に生じることを報告した [1]。精原細胞移植（spermatogonial transplantation）あるいは精細管内移植と呼ばれるこの研究成果は、精子幹細胞を組織から取り出してその幹細胞活性を証明した最初の報告であった。その後、この手法を用いていくつかの興味深い発見がなされた。その1つは、ラットの精巣細胞をヌードマウス精巣に移植することにより、ラット精子がマウス精巣内で産生されたことである [2]。このことはマウスのセルトリ細胞がラットの精細胞の精子形成をサポートしたことを意味していた。この異種移植法はさまざまな動物種でも試され、ハムスター精子形成もマウス精巣内で進行することが報告された [3]。しかし、ウサギ、イヌ、ブタ、サル、ヒトなどの場合、マウス精細管内の基底膜上に精原細胞の定着は認めるものの、精子形成が生じることはなかった [4]。一方、ドナーマウスの精巣細胞を凍結保存し、解冻後に移植しても精子形成が再生できることが示された [5]。このことは、精子幹細胞が凍結保存できることを実証し、特定の雄の生殖能を無限的に保存できることを意味していた。（図1）

連絡先：小川 毅彦，横浜市立大学大学院医学研究科泌尿器科病態学教室

〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9

TEL：045-787-2679

FAX：045-786-5775

E-mail：ogawa@med.yokohama-cu.ac.jp

精子幹細胞の培養

精原細胞移植法の開発は、次に続くべきもう1つの技術的 breakthrough を内包していたといえる。精子幹細胞の培養法の開発である。Brinster 等は、精原細胞移植と精原幹細胞の培養は1組の研究テーマとして考えており、当初から精力的に培養実験を行っていた。実際、精原細胞移植法は精子幹細胞の幹細胞活性を検定できる唯一の方法であり、移植法が完成してはじめて精子幹細胞の培養実験も可能になったといえる。しかし当時は、生殖細胞の培養は不可能に近いという認識があり、その培養法の開発は困難が予想された。実際、マウス精子幹細胞の培養法が完成するにはその後9年間を要した。

マウス精子幹細胞の培養法は、京都大学の篠原らにより開発された。GDNF 他の細胞成長因子を加えた培養液を調整し、そのなかで Germline stem cell (GS 細胞) と名付けられた精子幹細胞は指数関数的に増殖した [6]。GS 細胞を精細管内に移植すると精細管内の基底膜上に増殖して広がり、精子形成が再生された。よって GS 細胞は自己複製増殖能と精子形成能（分化能）を併せもつ真正銘の精子幹細胞であることが確認できた。GDNF を用いる培養法はその後複数のグループから報告・確認され、現在ではマウス精子幹細胞の培養法は確立している [7, 8]。それらの培養精子幹細胞への遺伝子導入や遺伝子改変に関する報告もあり、受精卵への遺伝子導入や ES 細胞での遺伝子改変に代わる発生工学の手法としても注目されている [9, 10]。またラットの精子幹細胞も、ほぼ同様の方法で培養できることが報告されている [11, 12]。しかしながら、げっ歯類以外の動物での精子幹細胞培養は未だ困難である。ごく最近では、ヒト精子幹細胞の培養に成功したとの報告もあり、今後の確認が待たれる [13, 14]。

マイクロドロップ培養法

GS 細胞の培養は確立した技術になりつつあるが、遺伝子導入やマウス以外の動物での GS 細胞の樹立は非常に困難である。GS 細胞への遺伝子導入が難しい理由と

精原細胞移植法

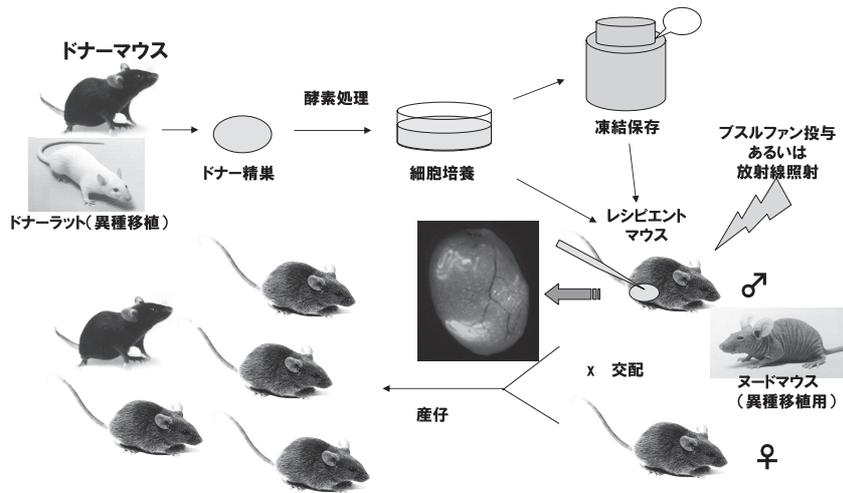


図1

して、3つの点が挙げられる。第1点は、GS細胞は精原細胞の性質を有しているが、それらすべてが精子幹細胞ではないことである。精細管内移植にもとづく検討から、GS細胞中の精子幹細胞の割合はおよそ1%と見積ることができる [15]。よってGS細胞に遺伝子導入しても幹細胞に導入している確率は1/100になってしまう。第2点は、GS細胞のクローニングが難しいことである。GS細胞は集団ではよく増殖するが、単一細胞にすると増殖しにくい傾向が顕著である。よって、遺伝子導入できたGS細胞をクローニングすることに難しさが伴う。第3点は、GS細胞の増殖速度がES細胞や線維芽細胞などに比べて緩慢なことである。GS細胞の倍加時間は通常4~5日で、条件が悪化すると~7日くらいになる。よって遺伝子導入できたGS細胞の選択にも時間を要するため、長期間にわたるきめ細かな管理が必要となる。以上のような理由から、GS細胞への遺伝子導入は難易度が高いと言わざるとえない。GS細胞のそのような特徴は、マウス以外でのGS細胞樹立が困難であることの原因にもなっていると私は推察する。そのような観点から、GS細胞の培養条件のさらなる改良が必要であると思われる。われわれはGS細胞のクローニングが特に重要であると考え、マイクロドロップ法という培養法を用いることとした。マイクロドロップ法は、胚培養では一般的に用いられている培養法であるが、一般の細胞培養に用いられることはほとんどない。マイクロドロップ法の利点は、ドロップ内で培養している細胞を見失うことなく追跡できる点であるが、それ以外にもいくつか有利な点がある。例えば、培養液の液量は少量ですむことから、高価な成長因子などはごく微量でもよい。

また細胞数も少ないので、将来ヒトサンプルを用いる時などに向いていることである。

われわれは、マイクロドロップ内でGS細胞を維持・増殖させることができるかを検討するために、5 μ l, 10 μ l, 20 μ lのドロップを作り、そこにGS細胞のコロニーを入れてその増殖を調べた。その結果、いずれの大きさのドロップでもGS細胞の増殖が確認できた。次に、導入するGS細胞の数を1, 10, 20個として5 μ lのマイクロドロップでの増殖を調べた。1個のGS細胞からは増殖は得られなかったが、10個と20個のGS細胞を入れたドロップではそれぞれ60ドロップ中10ドロップ(16.7%)と45ドロップ中19ドロップ(42.2%)でGS細胞の増殖が認められた。これらのデータは、GS細胞が予想どおり単一では増殖しにくいことを示しており、細胞集団においては何らかの要因により増殖しやすい微小環境が作られていることを示唆するものと考えられる。今後、マイクロドロップの系を用いてそのような環境因子の詳細を検討してゆくことが重要であると思われる(図2)。

In vitro 精子形成の可能性

精原細胞移植法の開発は、精子幹細胞培養法の開発を内包していたと上述した。また精子幹細胞の培養は、上述のごとく遺伝子導入や遺伝子改変に順調に発展していった。そのみならず、in vitroでの精子形成も数年のうちには可能になるだろうと私は予想していた。つまりGS細胞を大量に培養すれば、たとえ効率は低くとも精子形成が進行し、少なくとも減数分裂は完了するまで自然に分化する細胞があるだろうと考えていた。よって精

マイクロドロップ法

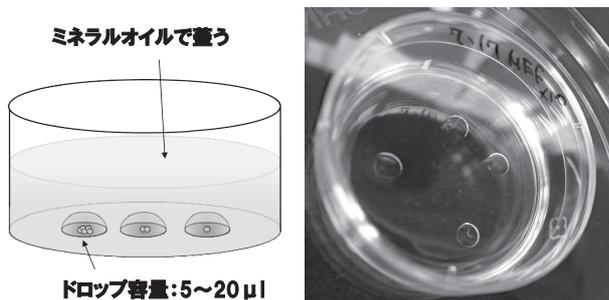


図2

子の産生までは行かなくとも半数体細胞(円形精子細胞)は *in vitro* で産生されることを期待していた。しかし現在までのところ GS 細胞を培養していても減数分裂に入るような所見は得られていない。ましてや減数分裂完了はまったく望めない状況である。またそのような報告もこれまでにはない。

これまでに *in vitro* 精子形成の成果に関する報告は、けっして少なくない。その方法を大別すると、① 精巣組織の器官培養 [16]、② 精子形成開始以前、あるいは途中の未成熟動物の精巣から得られた生殖細胞を材料に feeder 細胞上で細胞培養 [17]、③ 不死化した生殖細胞を用いて細胞培養 [18, 19]、④ セルトリ細胞の cell line を用いるなどの Feeder 細胞の工夫 [20]、⑤ 3次元培養法 [21]、などである。これらの試みのなかには、*in vitro* での半数体形成に成功したと報告しているものもある。そのような過去の報告から、それらの方法を用いれば、GS 細胞からの精子形成が成功するだろうと私は思っていた。しかし現実にはそうはならず、精子幹細胞からの *in vitro* 精子形成実験は暗礁に乗り上げたままの状況である。振り返って上記論文を精読してみるとそれらの内容や結論には、曖昧な点があったと思われる。特に、精原細胞からの減数分裂完了を主張する論文でも実際は、精母細胞が混在していると思われる実験系や、半数体形成を主張する論文でも単に遺伝子発現のみや、あるいは、フローサイトメーターのデータに依存する報告もある。

GS 細胞誕生から 8 年目を迎えても精子幹細胞からの *in vitro* 精子形成系が完成しないところに、その難しさが表われている。いずれにしても GS 細胞からの *in vitro* 精子形成は、精子形成研究における重要な課題であり、今後の成果が待たれるところである。

異所性精子形成

In vitro 精子形成の困難さを実感し、私たちは別の方法も模索した。そこで2002年の“nature”論文に着目した。それはヌードマウス皮下に新生仔精巣組織を移植すると完全な精子形成が生じるという報告である [22]。ヌードマウス皮下にはマウス・ラット・ヒツジ・ブタ・サルなどさまざまな動物の精巣組織片が移植されたが、いずれもほぼ完全な精子形成が誘導された。われわれはこの成果とマウス GS 細胞を組み合わせるために、精細管再構成法を考案した。新生仔精巣組織をそのままグラフトするのではなく、酵素処理により一度浮遊細胞とし、それをヌードマウス皮下に注射して移植すると、精細管構造が再構成されることを発見した。さらにその精巣細胞浮遊液に GS 細胞を混入することにより、GS 細胞が再構成精細管内に組み込まれることを確認した。ここでわれわれは *haspin* (*Gsg2*)-GFP Tg マウスを用いる工夫をした。*Haspin* は精子形成の半数体細胞特異的に発現する遺伝子で、そのプロモーター領域に GFP を付けた *Haspin*-GFP 遺伝子は半数体になると GFP を発現する仕組みになっていた [23]。この *Haspin*-GFP Tg マウスの精巣から GS 細胞を樹立し、それを実験に用いることでヌードマウス皮下での精子形成が半数体産生まで到ったことを感度良く検出できるようになった。その結果、GS 細胞由来の精子細胞(半数体)がヌードマウス皮下で産生されたのを確認することができた。そして、その精子細胞を用いて産仔にも成功した [24] (図3)。この精細管再構成法はマウス・ラットのみならず、ブタにも応用でき [25]、その他の動物種にも広く応用できると思われる。

In vitro 器官培養

精細管再構成法に用いた *Haspin*-GFP Tg は減数分裂の進行を確実に反映していることから、われわれはこれを *in vitro* 精子形成にも用いることを考えた。上述のごとく GS 細胞からの *in vitro* 精子形成は前途多難であることから、まずは器官培養に *haspin*-GFP Tg を使用することとした。そもそも *in vivo* における精子形成は、生殖細胞のみで進行できるわけではなく、セルトリ細胞と筋様細胞で形成されている精細管構造内で行われており、精細管周囲の間質細胞(ライディッヒ細胞)の存在も不可欠である。よって、常識的に考えると *in vitro* での精子形成には器官培養が圧倒的に有利のはずである。当然のことながら、organ culture による精子形成実験

マウス背部皮下での精子形成

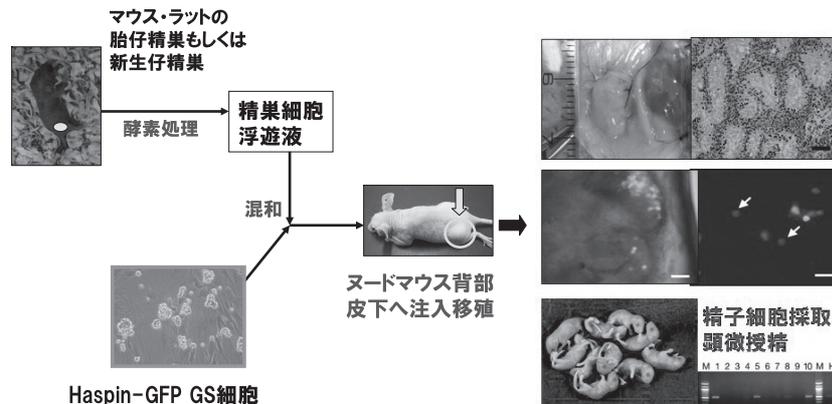


図 3

はこれまでに十分試みられてきた。実際、その歴史は1世紀前に逆のぼる。特に1937年には、Martinovichが“Nature”にその成果を報告している [26]。彼によれば、マウス胎仔精巣を凝血塊上で器官培養し、精子形成が減数分裂のpachytene期まで進行したという。培養技術がさらに開花するのは、1959年Eagleが合成培地を開発したことに大きく依存する。ほぼ同時期にTrowelらがGasliquid interphase法を確立するとそれらの技術を応用して、Steinberger等は精力的にorgan cultureでの精子形成を研究した。しかし、結論としては、organ cultureではpachyteneを越える分化を確認することはできなかった [16]。そればかりか、organ cultureでは、使用するマウスの日齢をあげて、減数分裂開始後の精巣を使っても相変わらずpachyteneを越える分化は得られず、またadult精巣を培養すると精子細胞は2~3日で変性消失してしまうことが観察された。すなわちorgan cultureは、減数分裂後期から精子細胞にとっては非常に不利な微小環境になっていることが判明してきた。そのような研究結果を経て、in vitro精子形成実験はorgan cultureからcell culture法へと転換していった。Organ culture以外のin vitro精子形成については、上述したとおりであり、未完成のままである。

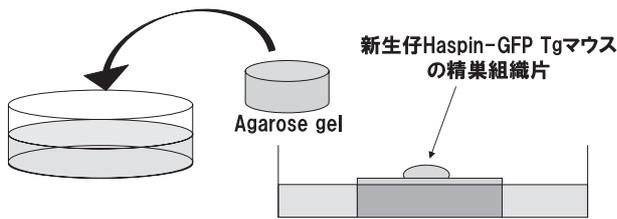
われわれの器官培養実験は、haspin-GFP Tgマウスの他に、Acr-GFP Tgマウスも加えて行われた。2つの遺伝子マーカーで同様の所見が得られれば、信頼性を増すことができることと、これら2つのマーカーは減数分裂の異なるタイミングで発現することから、in vitroでの減数分裂の進行をモニターするうえで非常に有効であった。さらにこれらの減数分裂特異的GFPマーカーは発光量も豊富なことから培養プレートの蓋をはずす必

要なく観察でき、培養を継続することができた。よって培養条件の調整も実験を継続しながら行うことが可能であった。これまでの成果から、器官培養でも半数体(円形精子細胞)の産生が可能であるというデータが得られており、さらなる培養条件の改良を進めている(図4)。

多能性幹細胞からの精子形成

現在、GS細胞や単離した精子幹細胞からの精子形成を生じさせるためには、精細管内移植、もしくは精細管再構成による精細管構造への組み込みが必要である。いずれの場合も、本来の精細管内という微小環境が必要であり、セルトリ細胞をはじめとした周囲の体細胞の支持なしには精子形成は進行しえないと考えられる。一方で、ES細胞(多能性幹細胞)から生殖細胞を分化誘導し、そこから精子形成へ誘導する試みが2003年以降に多数報告されている。野瀬らの報告はそのさきがけとなったものである。彼等の実験のポイントは、in vitroにおいてES細胞からの始原生殖細胞(Primordial Germ Cells; PGCs)を誘導することに成功した点である。産生されたPGCsが確かに生殖細胞であることを証明するために、彼らは、in vivoの系を用いた。すなわちES細胞由来のPGCsを13.5胎児齢の精巣の細胞に混和してペレットを作り、それを成熟マウスの精巣の白膜下に移植したのである。精巣内で、それらの細胞は精細管を再構成し、ES-PGCs由来の精子が産生された[27]。この報告以後、多くの研究グループがES細胞もしくはiPS細胞からin vitroで生殖細胞が作れることを報告している[28-30]。それらのなかには、in vitroで精子が作られたと主張するものもある。しかし、現在のところ未分化な生殖細胞

器官培養での精子形成



6日齢マウス精巣組織を培養して23日後 (29日齢相当)

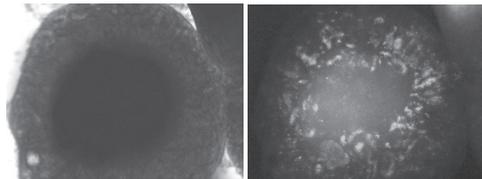


図4

(PGScやGS細胞, 精子幹細胞)を精子まで分化させるためには, 精細管内移植あるいは精巣内・皮下での精細管再構成法が必要であり [31], そのいずれも生体内での精子形成である。

ES細胞からの精子形成や卵形成などには, 本来の配偶子形成とは異なる分化の経路が生じている可能性はないだろうか。例えば, 体細胞からでも半数体を作ることがメダカでは示されている [32]。同様のことが哺乳類でも可能かも知れない。しかし, 配偶子形成は単なる半数体細胞の産生とは違う。例えば, インプリンティングに代表される生殖細胞特有のエピジェネティックな修飾が生じるし, 減数分裂期にはダイナミックなDNAの組み換えが生じる。少なくともこの2つを経て産生された配偶子でなければ, 世代を継続してゆく本来の生殖にはならないと思われる。ES細胞からの配偶子形成にもそのような視点での検討が, 今後必要であると思われる。

おわりに

過去15年間, 精子幹細胞と精子形成の基礎研究は大きく進展した。これらの成果が不妊臨床の応用に結実してゆくのは今後の15年間かもしれない。

引用文献

1. Brinster RL, Zimmerman JW (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11298-11302.
2. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL (1996) Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381, 418-421.
3. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL (1999) Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 60, 515-521.
4. Nagano M, Patrizio P, Brinster RL (2002) Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril* 78, 1225-1233.
5. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL (1996) Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med* 2, 693-696.
6. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T (2003) Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 69, 612-616.
7. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004) Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16489-16494.
8. Ogawa T, Ohmura M, Tamura Y, Kita K, Ohbo K, Suda T, Kubota Y (2004) Derivation and morphological characterization of mouse spermatogonial stem cell lines. *Arch Histol Cytol* 67, 297-306.
9. Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Kazuki Y, Lee J, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara T (2006) Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8018-8023.
10. Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T (2007) Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2596-2601.
11. Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2005) Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14302-14307.
12. Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL (2005) Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17430-17435.
13. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, Hovingh S, de Reijke TM, de la Rosette JJ, van der Veen F, de Rooij DG, Repping S, van Pelt AM (2009) Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 302, 2127-2134.
14. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M (2010) Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* 82, 363-372.
15. Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T (2005) Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-free feeder-free conditions. *Biol Reprod* 72, 985-991.
16. Steinberger A, Steinberger E (1970) In vitro growth and development of mammalian testes. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds) *The Testis*. Academic Press, New York and London, pp. 363-391.
17. Marh J, Tres LL, Yamazaki Y, Yanagimachi R, Kierszenbaum AL (2003) Mouse round spermatids developed in

- tro from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in vivo-developed mature oocytes. *Biol. Reprod* 69, 169-176.
18. Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M (2002) Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 297, 392-395.
 19. Hofmann MC, Narisawa S, Hess RA, Millán JL (1992) Immortalization of germ cells and somatic cells using the SV 40 large T antigen. *Exp Cell Res* 201, 417-435.
 20. Rassoulzadegan M, Paquis-Flucklinger V, Bertino B, Sage J, Jasin M, Miyagawa K, van Heyningen V, Besmer P, Cuzin F (1993) Transmeiotic differentiation of male germ cells in culture. *Cell* 75, 997-1006.
 21. Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D, Durand P (2000) The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 260, 85-95.
 22. Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Schöler H, Dobrinski I, Schlatt S (2002) Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 418, 778-781.
 23. Tanaka H, Yoshimura Y, Nozaki M, Yomogida K, Tsuchida J, Tosaka Y, Habu T, Nakanishi T, Okada M, Nojima H, Nishimune Y (1999) Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem* 274, 17049-17057.
 24. Kita K, Watanabe T, Ohsaka K, Hayashi H, Kubota Y, Nagashima Y, Aoki I, Taniguchi H, Noce T, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Tanaka H, Ogura A, Ogawa T (2007) Production of functional spermatids from mouse germline stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules. *Biol Reprod* 76, 211-217.
 25. Watanabe T, Hayashi H, Kita K, Kubota Y, Ogawa T (2009) Ectopic porcine spermatogenesis in murine subcutis: tissue grafting versus cell-injection methods. *Asian J Androl* 11, 317-323.
 26. Martinovich PN (1937) Development in vitro of the mammalian gonad. *Nature* 139, 413.
 27. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T (2004) Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11457-11462.
 28. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427, 148-154.
 29. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A, Engel W (2006) *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 11, 125-132.
 30. Kerr CL, Cheng L (2010) The dazzle in germ cell differentiation. *J Mol Cell Biol* 2, 26-29.
 31. Obinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M (2009) A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137, 571-584.
 32. Yi M, Hong N, Hong Y (2009) Generation of medaka fish haploid embryonic stem. *Science* 326, 430-433.