

## マウス *in vitro* 精子形成法の開発

横浜市立大学大学院医学群泌尿器病態学  
小川 毅彦

### はじめに

哺乳類の精子形成は、精子幹細胞から始まり精子産生に至るまでに、マウスでは35日間、ヒトでは64日間の長期間を要する。細胞分裂と減数分裂、そして運動能をもつ精子完成への細胞形態の特徴的な変化は謎に満ちており、そのメカニズムの解明のためにも培養下での実験系が求められてきた。その歴史はおよそ1世紀前に始まり、多くの研究者がこの課題に挑戦してきた。しかしこれまでの成果はいずれも、部分的な成功に留まっていた。昨年、著者らのグループは新生仔マウス精巣組織を培養下で成熟させ、精子産生させることに成功した [1]。また体外移植培養法という手法を開発し、培養精子幹細胞からの精子産生にも成功した [2]。それらの成果について概説する。

### 精子幹細胞の培養

精子形成は精子幹細胞が精子になる細胞分化の過程であるが、生涯にわたって維持される精子形成の根幹には、精子幹細胞の存在がある。精子幹細胞が自己複製増殖することにより精子産生の元が維持されるからだ。精子幹細胞の実態は長く謎に包まれていたが、1994年に精子幹細胞の移植法が開発されたことから [3]、その研究は進歩し、2003年にはマウス精子幹細胞を培養下で殖やすことが可能となった [4]。この培養下で自己複製増殖する精子幹細胞はGS細胞と名付けられた。当初、私は、GS細胞を培養することにより、培養下での精子産生も可能になると考えていた。たとえその効率がよくなくても、殖やしたGS細胞を実験材料として豊富に用いることができる強みがあるからだ。しかしながら、GS細胞は培養皿のなかで減数分裂を起こすことも、精子になることもなかった。GS細胞から精子を造るためには、生体マウスの精巣内精細管への移植が必要であった。

### 器官培養法による *in vitro* 精子形成

GS細胞からの *in vitro* 精子形成に限界を感じた私たちは、過去の文献を調べるなかで、1つの疑問を抱いた。それは1970年代初期まで盛んに行われていた器官培養法

による *in vitro* 精子形成の研究が、その後は全くと言ってよいほど行われなくなったことである。器官培養法を用いた培養実験自体が、時代遅れの技術として顧みられなくなっていた事情はあるが、もう1つは1960年代にSteinberger夫妻の完璧なまでの研究結果から、その限界が判明していたともいえる。すなわち、器官培養法を用いた場合は、精子幹細胞から減数分裂中期（パキテン期）の精母細胞までの分化は進むが、それ以上はけっして進行しないという結論である。それはある意味、定説のようにそびえる壁にも思えたが、ちょうどその時に私たちは非常に有用な実験マテリアルをもっていた。Haspin-GFPトランスジェニックマウス (Tg) である。このTgの精子形成細胞は円形精子細胞（半数体）になるとGFPを発現するという特徴をもっており、それゆえ精子形成の進行を簡便に判定できる点で非常に有利であった [5]。そこで、われわれは、Steinberger 達の研究成果をそのTgマウスを用いて再検討してみるという研究を開始することとした。その培養法は気層液層境界部培養法というもので、原法は1959年に報告されており、器官培養におけるゴールデン・スタンダードである [6]。その方法に多少の工夫を加えて、より単純な培養法を開発した。1.5%のアガロースゲルの台を作り、培養液に半分だけ浸し、その上に新生仔マウスの精巣組織片(直径2~3mm)を乗せるのである。培養液は、 $\alpha$ MEMというもっとも標準的なものを用いた。それに牛胎仔血清 (FBS) を10%加えて使用したが、結局のところ、それでは数分裂途中で精子形成は止まってしまう、先人の成果を超えることはできなかった [7]。

FBSを含む培地での培養実験に限界を感じ、ようやくわれわれは、無血清培地での実験に着手した。その手始めは血清代替物の検討であったが、そこで使用したKnockout Serum Replacement (KSR<sup>®</sup>) という血清代替物に意外な効果があることを発見した。KSRはES細胞やiPS細胞の培養に用いられる血清代替物であり、その効用は、ES細胞・iPS細胞の分化を抑えて、未分化状態のままの増殖を助けるというものである。そのKSRを精巣の器官培養に用いたところ、それまでみられなかった完全な精子形成が *in vitro* で完成したのである

[1].

器官培養法により確かに精子が産生されたが、その数はけっして多くはなかった。それは、精子形成が生じているのが組織片の辺縁部のみであることが1つの原因である。培養液からの栄養素の吸収と気層からの酸素の供給、さらに老廃物の排出という生体内と同様の代謝を維持できる部位が組織片辺縁に限定されているためであろう。そうではあるが、*in vitro* で生体内に近似する微小環境を再現できたことが精子産生の秘訣であった。器官培養法によって造られた精子細胞や精子の妊孕能を調べる顕微授精実験も行った。産仔たちはすべて順調に成長し、兄妹交配により次世代が誕生しており生殖能も正常であった。また、精巣組織を組織片のまま凍結し、液体窒素内に保存する実験も行った。解凍して培養すると、精子形成が再開した。

### GS細胞からの精子産生

GS細胞から精子を産生するためには、生体の精巣内への移植が必要であることは上述した。そこで、われわれは器官培養法を応用すれば、GS細胞からの*in vitro*精子形成が可能ではないかと考えた。まずGS細胞を宿主マウスの精巣（精細管内）に注入移植し、その直後に精巣を摘出し、器官培養と同様に精巣を細切してアガロース上で培養した。ユビキタスに発現するGFP遺伝子が組み込まれているGS細胞を用いたので、その挙動を培養継続中に追跡することが可能であったが、培養開始数日後には、精細管の内腔から辺縁の基底膜上に移動し、そこで増殖する像が確認された。それは生体内への移植実験の結果と同様であった。その所見に勇気づけられたわれわれは、生体へのGS細胞移植後に精巣を取り出すのではなく、生体から精巣を取り出して、その後に移植して培養を開始するという体外移植培養法を開発した。それでもGS細胞は同様の挙動を示し、最終的には培養組織内において精子産生が認められた。GS細胞から*in vitro*で作られた精子細胞を用いた顕微授精実験では、健康な産仔が得られた[2]。

おわりに

これまで不可能だった*in vitro*での精子形成が、KSRという血清代替物を培養液に添加することにより可能と

なった。それではKSRとは何なのか。その構成成分は何で、そのなかの何が重要な因子なのか。残念ながらKSRは企業製品であり、成分の詳細は不明である。ただし、その後の研究で1つのヒントを得た。AlbuMAXというアルブミン製剤が、KSRとほぼ同様の効果をもっていたのである。AlbuMAXは、クロマトグラフィー精製された牛血清アルブミンであり、lipid-rich albuminとも紹介されている。となると、*in vitro*精子形成の成功の鍵はアルブミンか、あるいはAlbuMAXに含有されている脂質成分ということになるかもしれない。あいにくAlbuMAXも同企業の製品であり、アルブミン以外の構成成分については明らかにされていない。

器官培養法での*in vitro*精子形成を完成させるためには、KSR/AlbuMAX内の重要因子を同定し、その効力のメカニズムを解明することが必要であろう。それにより、*in vitro*でのヒト精子形成も可能となるはずである。

### 引用文献

1. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T (2011) *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504-507.
2. Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T (2011) *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 13, 472.
3. Brinster RL, Zimmermann JW (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 22, 11298-11302.
4. 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.
5. Kita K, 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.
6. Steinberger A, Steinberger E, Perloff WH (1964) Mammalian testes in organ culture. *Exp Cell Res* 36, 19-27.
7. Gohbara A, Katagiri K, Sato T, Kubota Y, Kagechika H, Araki Y, Araki Y, Ogawa T (2010) *In Vitro* Murine Spermatogenesis in an Organ Culture System. *Biol Reprod* 83, 261-267.