

# 精子形成を長期間維持できる in vitro 精巣組織培養システムの開発

古目谷 暢<sup>1)</sup>, 林 功晃<sup>2)</sup>, 山中 弘行<sup>1)</sup>, 三條 博之<sup>1)</sup>, 小島 一晃<sup>2)</sup>, 片桐久美子<sup>2)</sup>, 佐藤 卓也<sup>2)</sup>,  
矢尾 正祐<sup>1)</sup>, 木村 啓志<sup>3)</sup>, 藤井 輝夫<sup>4)</sup>, 小川 毅彦<sup>1,2)</sup>

- 1) 横浜市立大学大学院医学研究科泌尿器科学
- 2) 横浜市立大学生命医科学研究科プロテオーム科学
- 3) 東海大学工学部機械工学科
- 4) 東京大学生産技術研究所統合バイオメディカルシステム国際研究センター

## はじめに

これまで男性不妊の病態の解明を目指し多くの研究が行われてきたが、その主役は動物実験 (in vivo) による精子形成研究であった。生体内現象を忠実に体现する優れた研究手法で多くの成果を上げている。しかし、ヒトでの精子形成の研究をすすめる際には in vivo 実験は行えない。男性不妊の研究をすすめるためには、ヒト精巣組織やヒト由来の精巣構成細胞を用いた in vitro 実験の確立が求められる。また、in vivo 実験は、観察評価のために精巣を摘出する必要があり同一サンプルで経時的な評価が行えない、視床下部・下垂体、副腎など精巣以外の臓器の相互作用の影響を受けるため結果の解釈が複雑になる、といった特有のデメリットも存在する。しかし、in vitro 研究はこれらのデメリットを補完するというメリットもある。

このような観点に基づき in vitro 精子形成研究は古くから行われている。1938年にはマウス新生仔の精巣を凝血塊の上に乗せて培養し、減数分裂パキテ期まで精子形成が進行した [1]。1960年代には気相液相境界部培養法 [2] を用いて Steinberger 夫妻が精巣器官培養を行い、精子形成において重要な因子や条件をいくつも明らかにしたが、精子形成はパキテ期の精母細胞よりも進展することはなかった [3]。その後も、器官培養の他に細胞培養を含めた様々な手法が試みられたが in vitro 精子形成は減数分裂の壁を超えられなかった。そのような状況でわれわれは精巣内環境をそのまま利用できる器官培養法の有用性を重視し、2011年に器官培養法のスタンダードである気相液相境界面培養法に準じ、精巣

の小組織片を培養液に半分浸したアガロースゲルに乗せて培養するシンプルな培養方法を開発した。試行錯誤の後に到達した培養液 (Minimal essential medium eagle alpha modification ( $\alpha$ MEM) 培地に血清代替物である knockout serum replacement (KSR) を10%添加) を用いて34°Cで器官培養すると、減数分裂像、円形精子細胞、精子を認めた (図1)。得られた精子を用いて顕微授精したところ産仔が得られ、順調に発育し、兄妹交配により孫世代も誕生した。顕微授精の成功率は in vivo に由来する精子細胞や精子を使った結果に劣らないものであった [4, 5]。これによってマウスでの in vitro 精子形成を実現することに成功した。しかし、生体内と比べて精子形成の持続期間が最長でも2ヵ月ほどと短く、精子形成効率も低く、真の意味で in vivo を再現できておらず、その結果が必ずしも生体内現象を反映しているわけではないという欠点がある。われわれは、培養環境が非生理的であることが一因と考え、マイクロ流体システムを用いて生体内微小循環系を再現することで生体内での精子形成を in vitro で再現することを目指した。

## マイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流体システムは半導体製造技術を応用し、 $\mu\text{m}$  レベルの微細な回路状流路を作製することが可能で、その中に培養液を流すことによって生体内環境を再現することができる [6-9]。今回われわれは毛細血管を模倣した培養回路と精巣組織培養スペースを多孔膜で隔てる膜型デザインを採用した (図2A)。このデザインでは培養液の流れが組織培養スペースに入り込むことなく、拡散による物質供給が可能であり [10-13]、生理的な物質供給を再現できる (図2B)。

連絡先：古目谷 暢，横浜市立大学大学院医学研究科泌尿器科学

〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9

TEL : 045-787-2511 (内線2679)

FAX : 045-786-5775

E-mail : komeyam@yokohama-cu.ac.jp

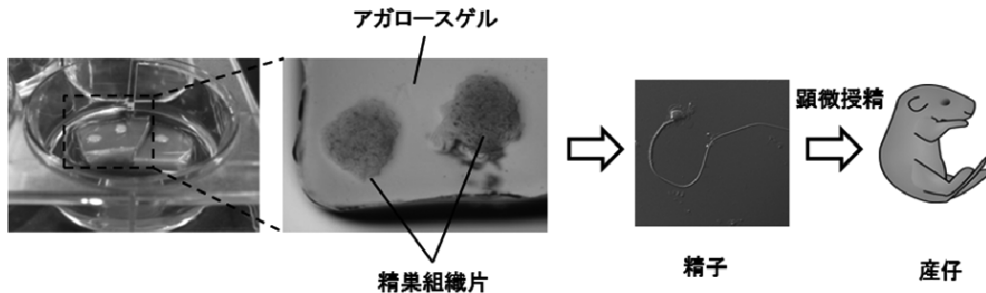


図1 気相液相境界部培養法

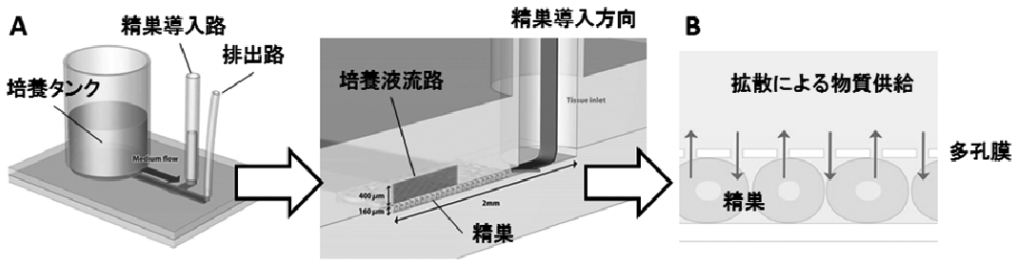


図2 マイクロ流体デバイス

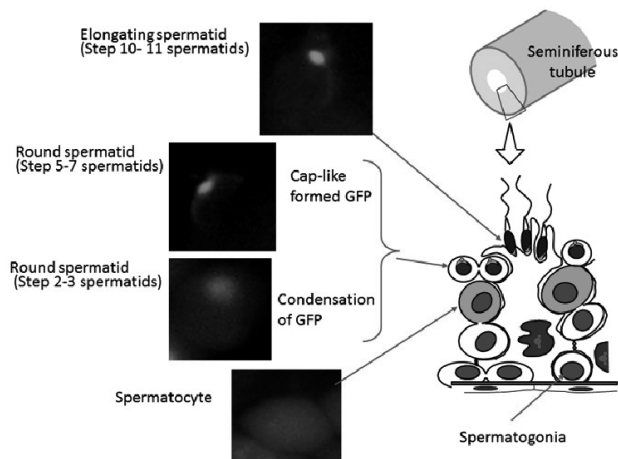


図3 *Acrosin-Gfp* トランスジェニックマウスの生殖細胞の GFP 発現

### マイクロ流体デバイスによる精子形成効率の改善

新生仔マウス精巣の培養42日目の観察で精細管が1本の厚さで培養スペースに配列していることが確認でき、組織中央部も含めて組織全体で GFP 発現を認めた (図 4 A)。一方で AG 群では組織を1本の厚みでアガロースゲルに載せても半円状に凝集してしまい、中央部の精細管の変性や壊死を認め、GFP 発現は認めなかった (図 4 B)。マイクロ流体デバイスで培養した精巣をほぐし、精子細胞を確認した (図 4 C)。マイクロ流体デバイスは、従来法とは異なり培養精巣全体での精子形成を実現することができた。

### マイクロ流体デバイスでの組織培養

新生仔 *Acr-Gfp* マウスの精巣をマイクロ流体デバイス培養群 (MF 群) と従来のアガロースゲルを用いた気相液相境界部培養群 (AG 群) に無作為に振り分けて培養した。このマウスは減数分裂を開始した生殖細胞で GFP を発現し、アクトソームが凝集するにつれて GFP 発現部位の形態が変化する特徴があるため、GFP の形態変化で精子形成の進展を評価することができる [14, 15] (図 3)。MF 群、AG 群ともに温度34℃、CO<sub>2</sub>濃度 5% に設定したインキュベータで培養した。培養液は  $\alpha$ -Minimum essential medium に AlbuMAX を濃度40mg/mL で添加したものをを用いた。

### マイクロ流体デバイスによる精子形成の長期維持

そこで長期培養下でも精子形成を維持できるのか確認するため、MF 群と AG 群に分けて24週間培養し GFP Grade を用いて精子形成効率を評価した。精巣全体に占める GFP 発現部位の割合を6段階に分類し、GFP 陽性を認めないものを Grade 0、10%以下を Grade 1、30%以下を Grade 2、50%以下を Grade 3、70%以下を Grade 4、それ以上を Grade 5 とした (図 5)。

培養24週間目に、MF 群で13組織中12組織、AG 群では27組織中5組織で GFP 発現を維持していた。しかし GFP Grade 3 以上を維持した組織は MF 群で13組織中11組織、AG 群では27組織中1組織であった。GFP Grade の平均値も MF 群では6ヵ月にわたり3以上を推移し

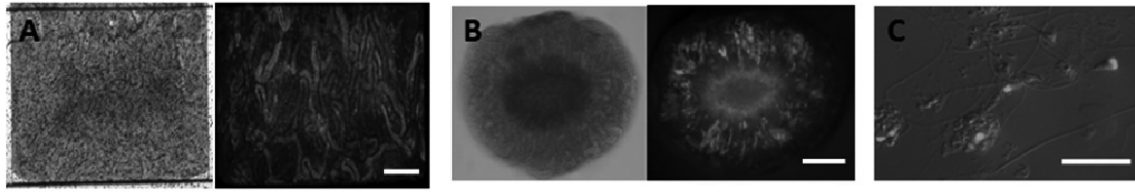


図4 MF群とAG群での6週間培養後の精子形成の評価  
Scale bars: 500 $\mu$ m (A & B), 20 $\mu$ m (C).

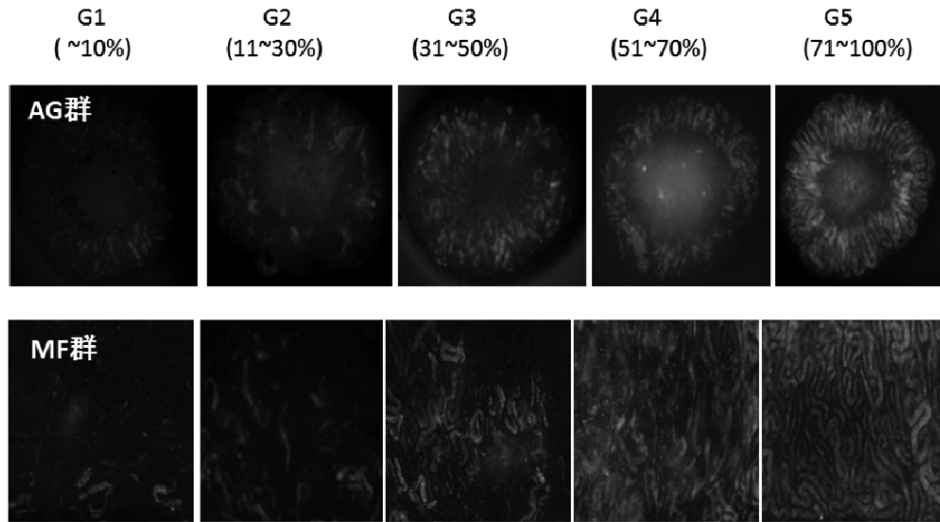


図5 GFP Grade Scoreによる精子形成効率の評価

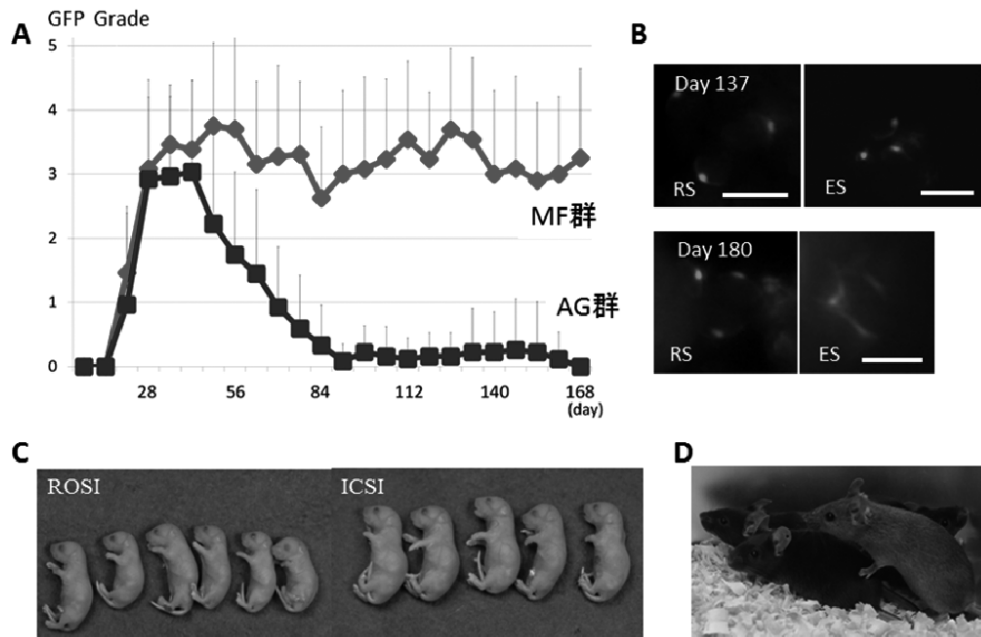


図6 長期培養下での精子形成の推移  
Scale bars: 10 $\mu$ m (B).

たが、AG群では10週時点で1以下に低下し、13週以降はほぼ0であった(図6A)。また、適宜高倍率観察を行い培養180日目時点まで半数体細胞が存在することが確認できた(図6B)。

### マイクロ流体デバイスによる生殖能の長期維持

ここまで形態学的手法により精子形成を評価していたが、長期培養後にも真に妊孕性という機能を維持できているか確認するため、培養した精巣由来の半数体細胞を

用いて顕微授精を行った。培養185日目の組織に多数存在した半数体細胞を用いて顕微授精を行ったところ、産仔が得られ（図6C）、正常に成熟し交配によって孫世代を得ることに成功した（図6D）。このことからマイクロ流体デバイスは精巣の最重要機能である産仔獲得能を6ヵ月もの長期にわたって維持することができた。

## おわりに

これまで多くの研究者が、組織の構造と機能を体外で長期にわたって維持する試みを行ってきた。精巣に関してはラット精巣組織片を8週間培養し精巣の構造を維持した報告があるが、精子形成を維持することはできなかった[2]。このような状況でわれわれは気相液相境界部培養法を用いてマウスでの *in vitro* 精子形成を実現した。これによって未熟な精巣を *in vitro* で成熟させ、主要な機能である忍容性を発現することに世界で初めて成功した。しかし、精子形成の維持は最長でも6~8週間であり、4~6週目をピークに急激に低下して最終的には消失し、精細管構造も変性してしまった。このことは組織培養のゴールデンスタンダードである気相液相境界部培養の限界を示唆するものであった。従来法は簡便で信頼性の高い実験手法ではあるが、生体内での物質供給を再現できていない。そこで、マイクロ流体システムを用いて生体内微小循環系を再現したところ、精巣全体での均一な精子形成が実現し、内部の変性・壊死を認めず、従来の気相液相境界部培養法よりも非常に効率的に精子形成を誘導することができた。さらに、6ヵ月にもわたって継続して精子形成を維持することができた。6ヵ月培養した精巣から得られた精子から健康な産仔が得られた。われわれの知る限り、組織の機能を体外でこれほど長期間安定して維持した報告は今まで認めない。

当初、われわれはマイクロ流体デバイスによって組織に接する培養液の流れによって物質交換が改善することを期待した[7-9]。しかし、アガロースゲル上での培養結果を改めて注意深く観察してみると、最外周の精巣組織ではなく外周部よりやや内側で精子形成が維持されていることに気付いた。物質交換に関しては最外周がもっとも有利なはずであり、予想に反していた。このことからマイクロ流体システムには精巣組織への物質供給を改善する以外にもメリットがあると考えた。マイクロ流体デバイスでの培養はアガロースゲルと異なりPDMSを介して酸素が供給される。このため直接酸素に暴露されるよりも酸素毒性が軽減され[16]、組織が長期間維持できると考えた。また、密閉された培養スペースで培養

するため、組織が周囲の壁や膜と接触しており白膜により覆われた生体内環境を従来の培養法よりも忠実に再現できている。さらに、物質供給能が高まるため精巣局所で産生される Paracrine, Autocrine 物質が増加し、間質環境が改善すると考えられる。マイクロ流体デバイスでは物質供給能が改善しているため間質成分の漏出も従来法よりも早くなるが、直接流束の中で培養すると精子形成効率が減弱するが (unpublished data), 多孔膜により流路と精巣を隔てて直接流束に晒さず拡散による物質供給を行う多孔膜型デバイスでは精子形成が維持される。このことから、膜型デバイスは毛細血管と組織間質の関係を再現することで、間質成分の急激な漏出を防いでいると考えられる。そして、間質成分の産生増大に対して、間質成分の漏出は相対的に低く抑え、生体内の間質環境を再現している。従来の培養法では物質供給の増大と間質成分の漏出を調整するのは困難だが、マイクロ流体システムはこれらパラメーターの調整がしやすく、最良のバランスで釣り合わせることが可能と考えられる。そして、われわれのマイクロ流体デバイスはこれらのバランスを従来法よりも最適化し生体内の間質環境を疑似的に再現したため、長期間にわたって *in vivo* 精子形成を匹敵する *in vitro* 精子形成を維持できたと思われる。

われわれの開発したマイクロ流体デバイスはマウス精巣での精子形成を長期間維持できたことから、精子形成研究の進展に貢献でき、将来的にはヒトを含む他動物種の精子形成研究への応用が期待される。また、精巣以外の組織培養への応用が期待でき、再生医療や創薬分野への波及効果が期待される。さらなる改良によって、器官培養全般の性能向上、ひいては“organs-on-chips”技術の発展へ貢献できると考えている[17]。

## 謝 辞

本稿は平成28年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究をまとめたものである。本稿を執筆する機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事長 苛原 稔教授、第20回日本生殖内分泌学会学術集会会長 藤澤正人教授に感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Martinovitch PN (1938) The Development *in vitro* of the Mammalian Gonad. Ovary and Ovogenesis. Proc R Soc Lond B Biol Sci 125, 232-249.
2. Trowell OA (1959) The culture of mature organs in a synthetic medium. Exp Cell Res 16, 118-147.
3. Steinberger A, Steinberger E (1970) The Testis. eds Johnson

- AD, Gomes WR, Van Dermark NL, The Testis. Academic Press, pp. 363-388.
4. Sato T, et al (2011) In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504-507.
  5. Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Ogawa T (2013) In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. *Methods Mol Biol* 927, 479-488.
  6. Berthier E, Young EWK, Beebe D (2012) Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab Chip* 12, 1224-1237.
  7. Tehranirokh M, Kouzani AZ, Francis PS, Kanwar JR (2013) Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. *Biomicrofluidics* 7, 1-32.
  8. Mehling M, Tay S (2014) Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 25, 95-102.
  9. Halldorsson S, Lucumi E, Gómez-Sjöberg R, Fleming RMT (2015) Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens Bioelectron* 63, 218-231.
  10. Kimura H, Yamamoto T, Sakai H, Sakai Y, Fujii T (2008) An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models. *Lab Chip* 8, 741-746.
  11. Kimura H, et al (2009) On-chip single embryo coculture with microporous-membrane-supported endometrial cells. *IEEE Trans Nanobioscience* 8, 318-324.
  12. Kawada J, Kimura H, Akutsu H, Sakai Y, Fujii T (2012) Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation. *Lab Chip* 12, 4508-4515.
  13. Kimura H, Ikeda T, Nakayama H, Sakai Y, Fujii T (2015) An On-Chip Small Intestine-Liver Model for Pharmacokinetic Studies. *J Lab Autom* 20, 265-273.
  14. Nakanishi T, et al (1999) Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett* 449, 277-283.
  15. Ventelä S, et al (2000) Regulation of acrosome formation in mice expressing green fluorescent protein as a marker. *Tissue Cell* 32, 501-507.
  16. Charati SG, Stern SA (1998) Diffusion of Gases in Silicone Polymers: Molecular Dynamics Simulations. *Macromolecules* 31, 5529-5535.
  17. Komeya M, et al (2016) Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep* 6, 21472.