

ラットの精子形成を誘導する *in vitro* 精巣組織培養系の開発

松村 貴史, 小川 毅彦

横浜市立大学大学院医学研究科臓器再生医学

はじめに

男性が生涯を通して精子を作り出すことができるのは、緻密に制御された精巣内環境と精細管内に存在する精子幹細胞の働きによる。精子幹細胞は自己複製を行いながら、減数分裂やダイナミックな構造変化を経て精子へと分化する。このような精子形成のメカニズムは、主に固定したサンプルとしての精巣の組織学的観察により明らかにされてきた。近代では、CRISPR/Cas9システムなどのゲノム編集技術が発展し、さまざまな遺伝子改変マウスを用いた実験から精子形成に重要な遺伝子の同定も進められている。しかしながら、同様の手法でヒトを含む非モデル動物の精子形成を調べることは難しい。またヒトでは70日、マウスでは35日を超える生殖細胞分化の全過程を正確に理解するには、長時間にわたり特定の細胞の挙動を追える実験系が必要である。このような観点に基づき、われわれは数週間、数カ月にわたって精子形成を体外で観察することを目的とした精巣器官培養法の開発に注力してきた。

体外で精子形成を誘導する試みは1920年ごろから始まり、1960年代には液体培地に浸したアガロースゲル上での組織培養法が考案された。Steinberger 夫妻はビタミンA/C/E、グルタミンを添加した培養液により精原細胞を減数分裂パキテン期の精母細胞まで分化させることに成功したが、精子形成は減数分裂を終えることはなく、精巣組織培養の限界だと考えられた¹⁾。そのような状況で、2011年にわれわれがマウスの未成熟精巣を培養し、未分化な精原細胞を伸長精子細胞まで分化させることに成功したのは、分化した生殖細胞がGFP蛍光を発するトランスジェニックマウス (Haspin-EGFP/Acr-EGFPマウス) を用いた評価系と、最小必須培地 (Minimum Essential Medium α modified; MEM α) に加えた血清代

替物質 (knockout serum replacement; KSR) のおかげである。

その後、われわれはKSRの主成分であるウシアルブミン製剤 (AlbuMAX) に、マウスの精子形成を体外で誘導するために必要な生理活性物質がすべて含まれていることを見いだした。MEM α に10% (v/v) のKSR、もしくは40 mg/ml のAlbuMAXを加えた培地を用いて、未成熟なマウスの精巣をおよそ40日間培養することで円形精子細胞や伸長精子細胞を誘導することができ、顕微授精によって産仔を得ることに成功した²⁾。その後、酸素透過性の高いシリコン樹脂 (PDMS) 製のマイクロ流体デバイスやPDMS Ceiling (アガロースゲル上の組織にかぶせて平板的に培養することで、栄養と酸素をより一様に供給できる: PC) (図1)の開発も行い、培養可能期間の長期化や精子形成誘導効率の改善を行ってきた^{3,4)}。一方この培地・培養環境を基本として、複数の研究グループによる改良が続けられてはいるものの、マウス以外の哺乳類の伸長精子までの精子形成や次世代作出は現在まで達成されていない。われわれは、さらなる培養環境の改良を目指すべく、AlbuMAXに含まれる精子形成を誘導する物質の同定を進めてきた。本稿では、培養液改良に関する試行錯誤、改良培養液とマイクロデバイスを用いた培養環境の改良、そして、それらによるラット *in vitro* 精子形成の成果について概説する。

AlbuMAXの脂質解析を通じた精子形成に重要な生理活性物質の同定

アルブミンは血漿タンパク質の中で最も量が多いタンパク質であり、血液の浸透圧維持の他、脂肪酸やホルモンといったさまざまな物質と結合して、体中へ運搬する等の機能がある。AlbuMAXは、その精製手法の詳細は公にはなっていないが、クロマトグラフィー法で精製されており、lipid-rich albumin とうたわれ多くの脂質を含んでいると想定される。血清からアルブミンを精製する手法としては、クロマトグラフィー精製の他に、エタノール精製法、ヒートショック法がある。ヒートショック法はエタノール精製に加熱処理を加えた簡便法であ

連絡先: 小川毅彦

横浜市立大学大学院医学研究科臓器再生医学
〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9 B142 (研究室)
B647 (教授室)

TEL: 045-787-2784 (研究室), 045-787-2790 (教授室)

FAX: 045-787-0000

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

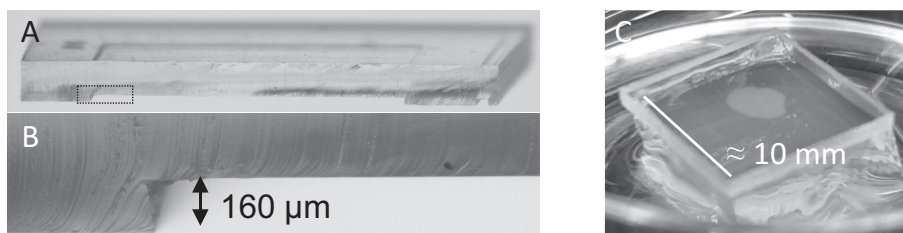


図1 A: PDMS製のマイクロデバイス
 B: A内の点線囲み部分の拡大写真
 C: 組織は底面のアガロースゲルと天井のPDMSに挟まれた160 μ m高の空間で平板状に培養される。

り、エタノールを用いる後者2法が汎用されている。これらのアルブミン製剤のなかで、未成熟なマウス精巣を培養して精子形成を誘導できるのはクロマトグラフィー精製アルブミンのみであり、なかでもAlbuMAXは優れていることが確認された。このことは、AlbuMAXには精子形成誘導に重要なさまざまな因子が含まれていること、そして、それらは主として脂溶性であることを示唆しているが、その実態は未解明であった。

そこでわれわれは、基礎培地MEM α にさまざまな候補因子を添加した合成培地(化学組成が規定された培地)を作製し、精子形成誘導効果を培養実験で確認する作業を繰り返した^{5,6}。同時にAlbuMAXに含まれる物質を質量分析によるオミックス解析手法で解析した。その結果、AlbuMAXに含まれる主な脂質として、脂肪酸、リン脂質、スフィンゴミエリン、コレステロール、リゾフォスファチジルコリン(LPC)やリゾフォスファチジルセリン(LysoPS)、リゾフォスファチジン酸(LPA)といったリゾリン脂質が同定され、これらが精子形成に重要な脂質であることを見いだした。また、いくつかのホルモンやビタミンは精子形成に重要であることが、すでに知られている。テストステロン、LH、FSHに関しては、これまで多くの研究・報告がなされてきた。レチノイン酸は、未分化な精原細胞が分化し減数分裂に入るために必要不可欠な因子であることが確立している⁷。またトリヨードサイロニン(T_3)はセルトリ細胞の成熟に必要である⁸。合成培地には、これらのホルモン・ビタミンを添加したが、なかでもレチノイン酸と T_3 は必須であり、 T_3 なしではセルトリ細胞はアンドロゲンレセプター(AR)タンパク質を発現せず、精子形成は誘導されなかった。培養液のメタボローム解析の結果から、脂質の抗酸化剤であるビタミンEがFBSや他の精製アルブミンと比べてAlbuMAXに多く含まれることが見いだされた。そこで前述の合成培地に、ビタミンEとその抗酸化作用を助けるビタミンCやグルタチオンをともに添加したところ、精子形成は顕著に亢進することが確認された。

未成熟ラット精巣の組織培養

ラットはマウスと同様、生後すぐに未熟な前精原細胞が増殖を始め、精子幹細胞の出現や生殖細胞の分化を伴い、50-60日で精子が出現する。ラットの精巣組織培養の試みは2011年にわれわれがマウスの体外精子形成系の確立に成功した後、数報が発表されている。2016年にRedaらは10v/v% KSR添加MEM α により5日齢のラット精巣を52日間培養し、わずかではあるが円形精子細胞までの生殖細胞の分化を誘導したと報告した⁹。しかしわれわれを含めた3グループによる研究ではKSR添加培地によりパキテン期精母細胞の分化誘導に成功した報告はあるが、いずれのグループでも円形精子細胞の分化は追試することができていない¹⁰⁻¹²。KSRのロット差や培養液以外の微小環境の違いなど、精子形成に影響を及ぼす因子はさまざま考えられるが、KSR添加培地がラット精巣組織培養に最適ではないことは明白である。

われわれのグループでは、前項で同定した4種類のホルモン:4Hs(テストステロン、 T_3 、LH、FSH)と3種類の脂質抗酸化剤:3As(ビタミンE、ビタミンC、グルタチオン)をAlbuMAXと組み合わせ、ラット精子形成の誘導を試みている。この際、PDMS製のマイクロデバイスの効果も検討した。減数分裂パキテン期以後の生殖細胞でVenus蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックラット(Haspin-Venusラット)を用いて、生後3-9日の精巣組織を培養したところ、AlbuMAXに4つのホルモン類と3つの脂質抗酸化剤を加えた培養液と、PDMS製のマイクロデバイスの使用を組み合わせただけVenus陽性細胞が出現した。つまり、精子形成が減数分裂パキテン期以降にまで進んだことが明らかとなった(図2)。3Asのみの添加では精子形成は全く誘導されず、一方4Hsのみの添加ではVenus陽性細胞は培養後4-5週目まで増加するが、その後は減少した。組織切片の観察では、培養4週後の4Hs添加群ではパキテン期精母細胞が観察されるが、それ以前の分化

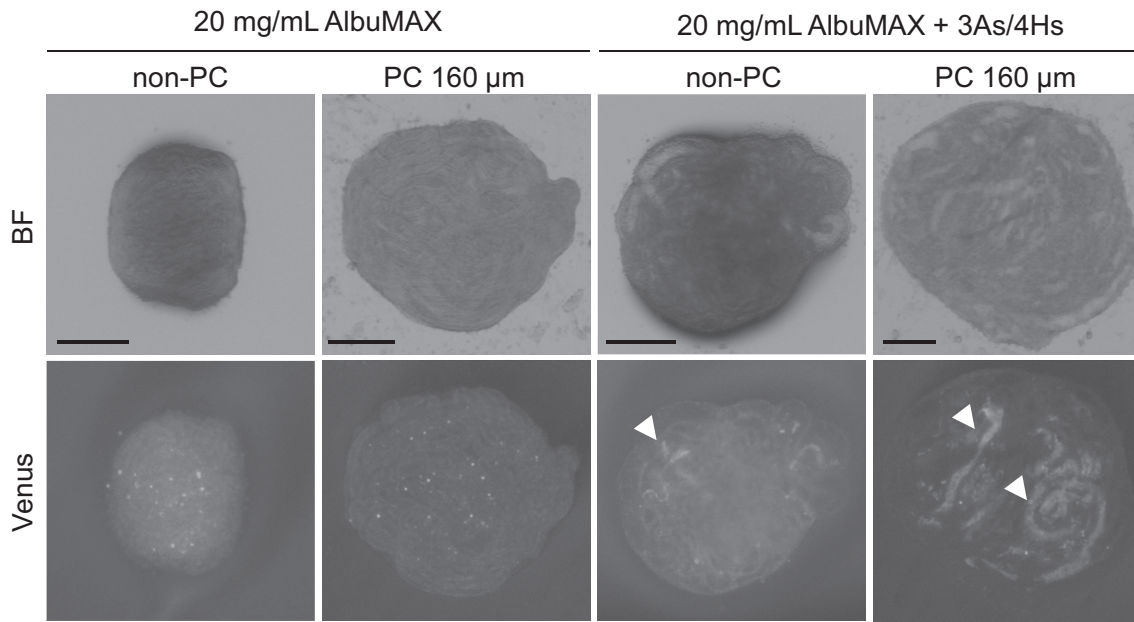


図2 さまざまな培養条件で6週間培養した精巣組織中のVenus発現。白矢頭はVenus発現領域を示す。培地に4Hs, 3Asを添加しPDMS Ceiling (PC)を使用した群ではVenus発現領域が大きく増加した。スケールバー=0.5 mm.

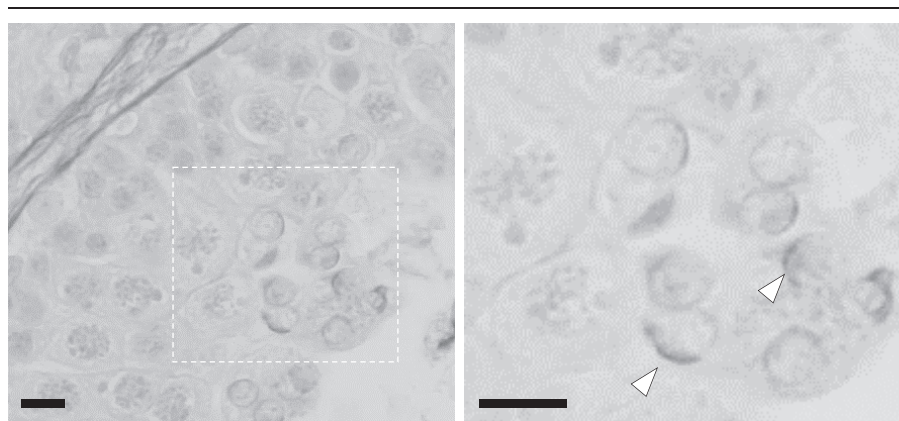


図3 培養10週目の精巣組織のPAS染色。左写真内の破線で囲まれた部分を右に拡大した。白矢頭は特徴的な三日月型の先端構造をもつ円形精子細胞。スケールバー=10 μm.

20 mg/mL AlbuMAX + 3As/4Hs/LPC/LysoPS ; PC 160 μm (10-week)

段階にある生殖細胞はほとんど見られず、培養6週後には減数分裂期の生殖細胞はほぼ認められなかった。4Hsと3Asの両方を添加した群では培養6週後にもパキテン期精母細胞やそれ以前の分化段階にある生殖細胞が観察されたことから、4Hsには精子形成を進める働きがあるのに対し、3Asには生殖細胞の生存を助ける働きがあると考えられる。

なお、培養液中のAlbuMAX添加量がマウスで用いられる40 mg/mLの条件下では4Hsと3As添加による精子形成誘導効率の向上は認められず、それより少ない添加量の時にのみ観察された。この理由は定かではないが、培地中の脂質量が増えたことにより脂質抗酸化剤が不足したか、AlbuMAXにラットの生殖細胞の分化を抑制す

るような生理活性物質が含まれている可能性がある。さらにリゾリン脂質の添加もVenus細胞数を増加させた。とくに10週間前後の長期培養時には、LPCやLysoPS添加によりVenus陽性細胞は有意に増加した。このような培養環境の改善により、われわれはラットの円形精子細胞を安定的に分化誘導することに成功した¹⁰⁾(図3, 4)。ただし伸長精子細胞の誘導には至っておらず、顕微授精による産仔作出も今後の課題である。

他の哺乳類における精巣組織培養研究

精巣組織培養法が完成すれば、ヒトにおける精子形成メカニズムの解明や不妊治療への応用などの有用な技術

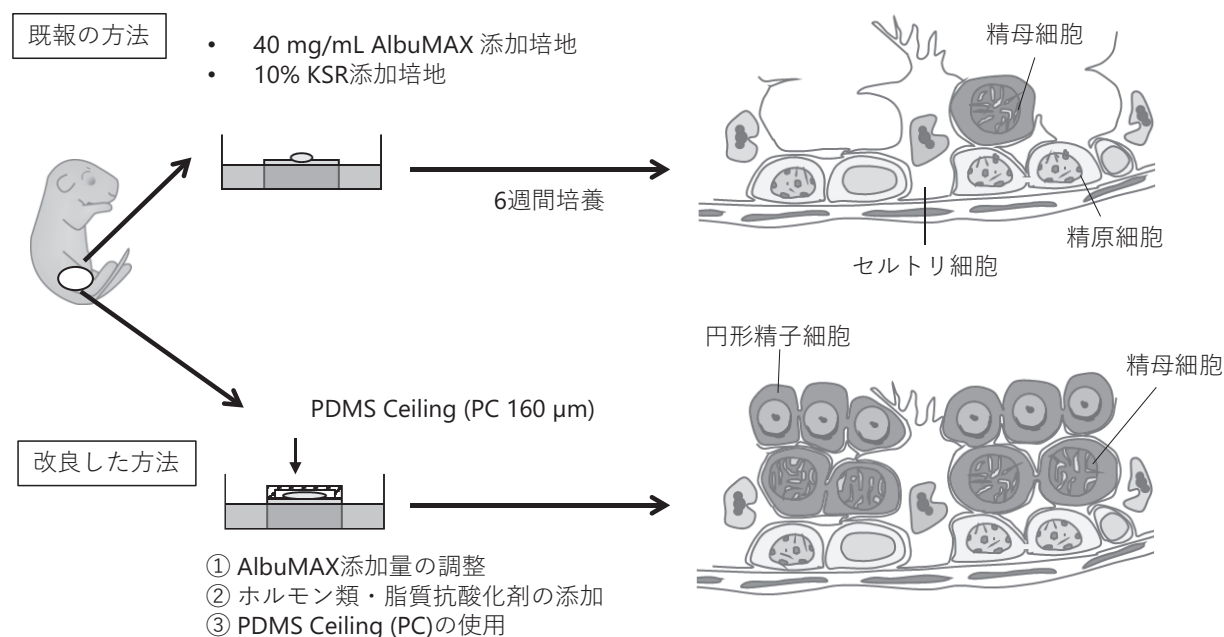


図4 ラット精巣培養系の改良。培養液の改良とPCの使用により円形精子細胞までの分化を安定的に誘導可能になった。

基盤になることが期待されている。がん患者に対する抗がん剤や放射線による治療は精子形成を障害し、がん治療から解放された後に不妊という問題が残る。日本では治療前の精子凍結が行われているが、精子形成が始まっていない思春期前の患者の妊孕性保存が問題となっている。欧米では若年がん患者精巣組織の凍結保存が進んでおり、それらの一部を用いた研究も行われているが、DMEMやMEM α などの基本培地にKSRやFBSを添加した培地では、減数分裂期の精母細胞への分化誘導すら困難な状況となっており、培養が進むにしたがった生殖細胞数の減少が観察されている。LHやFSHを添加した培養液も用いられているが、添加していない培養液と比べて大きな変化は見られていない¹³⁻¹⁵⁾。ヒト以外では、ネコやマーモセットでも同様の結果が報告されており、L-グルタミンやレチノイン酸、ビタミンA、ビタミンC、FSH、hCG、エストラジオールなどの添加も検討されているが、現状を打破するような違いを生み出す培養液の開発には至っていない^{16,17)}。KSRの添加によりパキテン期までの生殖細胞の分化が誘導できる、げっ歯類とはまた違ったアプローチが必要であるように思われる。

終わりに

マウスの精子形成は、AlbuMAXやKSRといった血清代替物を添加した培養液を用いると体外で誘導可能だが、他種の哺乳動物での体外精子形成系確立には、さら

なる培養液の最適化が必要である。詳細な分子メカニズムは未解明の部分もあるが、マウスの精子形成を体外で誘導する効果が見いだされてきたホルモン類、脂質抗酸化剤やリゾリン脂質はラットの精巣培養系でも有効であり、円形精子細胞までの分化を促進する効果を示した。1960年代にSteinberger夫妻がラットの未分化な精原細胞からパキテン期までの減数分裂期生殖細胞を分化させることに成功してから、ようやくラット伸長精子細胞の分化誘導まで後一步のところまで迫ってきた。今後もヒトを含めた広汎な哺乳動物の精巣培養系確立のための研究が望まれる。

引用文献

1. Steinberger A (1967) Factors affecting spermatogenesis in organ cultures of mammalian testes. *J Reprod Fertil Supplement*, 2, 117-124.
2. 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. (doi: 10.1038/nature09850. PubMed PMID: 21430778).
3. Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T, Ogawa T (2017) Pumpless Microfluidic System Driven by Hydrostatic Pressure Induces and Maintains Mouse Spermatogenesis in Vitro. *Scientific reports*, 7, 15459.
4. Komeya M, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Nakamura H, Kimura H, Fujii T, Sato T, Ogawa T (2019) In Vitro Spermatogenesis in Two-Dimensionally Spread Mouse Testis

- Tissues. *Reproductive medicine and biology*, 18, 362-369. (doi: 10.1002/rmb.2.12291. PubMed PMID: 31607796).
5. Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, Ino Y, Arakawa N, Hirano H, Yao T, Asayama Y, Matsuhisa A, Yao M, Ogawa T (2018) In Vitro Mouse Spermatogenesis With an Organ Culture Method in Chemically Defined Medium. *PLoS One*, 13, e0192884. (doi: 10.1371/journal.pone.0192884. PubMed PMID: 29432471).
 6. Sanjo H, Yao T, Katagiri K, Sato T, Matsumura T, Komeya M, Yamanaka H, Yao M, Matsuhisa A, Asayama Y, Ikeda K, Kano K, Aoki J, Arita M, Ogawa T (2020) Antioxidant Vitamins and Lysophospholipids Are Critical for Inducing Mouse Spermatogenesis Under Organ Culture Conditions. *FASEB journal*, 34, 9480-9497. (doi: 10.1096/fj.202000245R. PubMed PMID: 32474967).
 7. Endo T, Makedis MM, Nicholls PK, Page DC, de Rooij DG (2019) Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules*, 9, 775. (doi: 10.3390/biom9120775).
 8. Smith LB, Walker WH (2015) Chapter 16 - Hormone Signaling in the Testis. In: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp.637-690.
 9. Reda A, Hou M, Winton TR, Chapin RE, Soder O, Stukenborg JB (2016) In vitro differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. *Mol Hum Reprod*, 22, 601-612.
 10. Matsumura T, Sato T, Abe T, Sanjo H, Katagiri K, Kimura H, Fujii T, Tanaka H, Hirabayashi M, Ogawa T (2021) Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Scientific Reports*, 11, 3458. (doi: 10.1038/s41598-021-82792-2).
 11. Saulnier J, Oblette A, Delessard M, Dumont L, Rives A, Rives N, Rondanino C (2021) Improving Freezing Protocols and Organotypic Culture: A Histological Study on Rat Prepubertal Testicular Tissue. *Annals of Biomedical Engineering*, 49, 203-218.
 12. Nakamura N, Sloper DT (2021) Comparison of germ cell differentiation of rat testis fragments cultured in knockout serum replacement versus Albumax™ I. *Birth Defects Res*, 113, 359-370. (doi: 10.1002/bdr.2.1859. PubMed PMID: 33348473).
 13. de Michele F, Poels J, Weerens L, Petit C, Evrard Z, Ambroise J, Gruson D, Wyns C (2017) Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue. *Hum Reprod*, 32, 32-45.
 14. Medrano JV, Vilanova-Pérez T, Fornés-Ferrer V, Navarro-Gomezlechón A, Martínez-Triguero ML, García S, Gómez-Chacón J, Povo I, Pellicer A, Andrés MM, Novella-Maestre E (2018) Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue. *Fertil Steril*, 110, 1045-1057. (doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.07.018. PubMed PMID: 30396549).
 15. Portela JMD, de Winter-Korver CM, van Daalen SKM, Meißner A, de Melker AA, Repping S, van Pelt AMM (2019) Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre) pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis. *Hum Reprod*, 34, 2443-2455.
 16. Silva AF, Escada-Rebello S, Amaral S, Tavares RS, Schlatt S, Ramalho-Santos J, Mota PC (2018) Can we induce spermatogenesis in the domestic cat using an in vitro tissue culture approach? *PLoS One*, 13, e0191912. (doi: 10.1371/journal.pone.0191912).
 17. Heckmann L, Langenstroth-Röwer D, Wistuba J, Portela JMD, van Pelt AMM, Redmann K, Stukenborg JB, Schlatt S, Neuhaus N (2020) The initial maturation status of marmoset testicular tissues has an impact on germ cell maintenance and somatic cell response in tissue fragment culture. *Molecular Human Reproduction*, 26, 374-388. (doi: 10.1093/molehr/gaaa024).