

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09584

研究課題名(和文)中空マイクロカプセルを用いた雄性生殖細胞の培養および精子先体反応誘導に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the culture of male germ cells and induction of sperm acrosome reaction using hollow microcapsules.

研究代表者

荒木 泰行 (Araki, Yasuyuki)

群馬パース大学・医療技術学部・講師

研究者番号：70833383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SV40 LargeT抗原遺伝子を導入して不死化させたマウス精巣由来細胞からセルトリ細胞1個を単離してクローニングした。また、これらの培養セルトリ細胞から極少数の細胞をマニピュレーターで正確にピックアップして培養し、その増殖率を調査したところ、培養前に静置時間を設けることで少数細胞からでも増殖可能であることを見出した。さらに、ゼラチンを結合させたアガロースゲル内に直径100～200μm程の円柱空間を作製してその内部にセルトリ細胞を閉じ込めることには成功したが、生体の精細管と同様な構造になるよう内部管壁の表面に細胞を接着させて培養するまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未熟な雄性生殖細胞である精原細胞を体外で精子にまで培養することに成功した報告は少ない。その原因の一つとして、生体で精子が生産されている精細管では中空管構造になっているにも関わらず、多くの報告は平面培養によるものであることがあげられる。したがって、本研究で実施した様な形状が精細管に類似した立体構造体であり、かつ内部に精子発生の支持細胞であるセルトリ細胞を接着させて培養する技術の開発は、精子の体外成熟培養を成功に導くものと考えている。精子を体外で培養することが可能になれば、精子発生に関するメカニズムの研究が発展するだけでなく、無精子症などで悩む男性不妊症患者を救う道が開ける。

研究成果の概要(英文)：One sertoli cell was isolated and cloned from mouse testis-derived cells that had been immortalized by introducing the SV40 LargeT antigen gene. We also investigated the growth rate of these cultured sertoli cells by precisely picking up a very small number of cells from these cultured sertoli cells with a manipulator, found they could be allowed to grow even from small numbers by allowing them to stand still for a short period of time before starting culture. Furthermore, they succeeded in creating a cylindrical space with a diameter of about 100 to 200 μm in a gelatin-bound agarose gel and confining sertoli cells inside it, but they did not succeed in culturing cells attached to the surface of the inner tube wall to create a structure similar to that of living organisms' seminiferous tubules.

研究分野：生殖医療技術

キーワード：雄性生殖細胞 培養セルトリ細胞 ゼラチン結合アガロース 精細管様構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子を体外で成熟培養する試みは古くから行われているが、精原細胞から成熟した精子までを体外で完全に培養することに成功した報告は少なく、再現性が確認されているのは、精細管を用いた器官培養での報告のみである(Sato et al. 2011)。その他、多くの不成功の報告は、ディッシュ底面を利用した平面培養がほとんどである。精細管の器官培養で成功例があることから、精細管のような立体構造が精子発生にとって非常に重要であると考えられる。これまでも、立体構造を維持させるためにアルギン酸ナトリウムのゲルに細胞や組織を埋包する報告(Lee et al. 2001)等があるが、精子形成の完成には至っていない。

また、現在は精子を卵子に直接注入する顕微授精が、臨床の治療でも多く実施されている。本来は透明帯を通過するまでに精子は先体反応を完了し、先体内部のアクロシンやヒアルロニダーゼといった酵素は排出された状態で卵細胞と融合するため、これらの酵素は卵細胞質内には持ち込まれない。しかし、顕微授精では先体反応を起こしていない精子を卵細胞質内に注入するため、自然な受精では入らないはずの先体内物質を全て持ち込んでいることになる。先体の注入は、胚発生に悪影響を及ぼすという報告もされている(Morozumi & Yanagimachi 2005)。

2. 研究の目的

未熟な精原細胞から尾部の生えた精子まで、体外で成熟させることを成功させるための方策の1つとして、成体で精子が製造されている精細管と同様の立体的かつ小さな中空構造体を作製し、その内部でセルトリ細胞などの精子発生を支持している細胞を培養する技術の開発を目的とした。

また、上記の様な小空間を作製する技術を応用して、そこに特定の精子を封じ込め、各種の試薬による先体反応の誘起率を調査することをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

まず、小空間内で少数の細胞を増殖させる試みを行った。精子成熟培養の支持細胞候補であるvero細胞を、内径35~50 μmで外径50~60 μmの中空アガロースカプセル(Araki et al. 2005)内に注入して、注入細胞数とその後の増殖成功率について調査した。

その後、研究期間中にSV40 LargeT 抗原遺伝子を導入して不死化させたマウス精巣由来細胞を譲渡して頂いたため、この細胞群からマニピュレーターを用いて正確に1個ずつ細胞をピックアップして個別に培養することでセルトリ細胞のクローニングを試みた。

続いて、クローニングしたセルトリ培養細胞の少数からの増殖成功率を調査するため、マニピュレーターを用いて正確に10~20個の細胞をピックアップし、マイクロドロップ内での増殖成功率を調査した。

最後に、細胞を接着させる目的でゼラチンを結合させたアガロースを作製し、これを材料に直径100~200 μmの中空管構造を作製して、その内部でセルトリ培養細胞を培養することを試みた。方法としては、アルギン酸ナトリウム溶液に細胞を懸濁し、細い管からカルシウム溶液内に押し出すことによって、アルギン酸ナトリウムゲルを作製し、次いでゼラチンを結合させたアガロース溶液に作製した細胞含有アルギン酸ナトリウムゲルを埋包した後、冷却することによってアガロースをゲル化させた。この状態で、アルギン酸ゲルを溶解させるためPBSおよびクエン酸ナトリウムの各濃度や処理時間を検討した。

4. 研究成果

極少数の vero 細胞をアガロースカプセル内で増殖させた検討では、注入した細胞数を1個、5個、10個、20個で実施した結果、それぞれの群での増殖成功率は、56.7% (17/30)、96.7% (29/30)、93.3% (28/30)、96.7% (29/30)であり、培養開始時点の細胞数が5個以上であれば、アガロースカプセル内でも vero 細胞を高率で増殖させられることが確認された(図1)。

SV40 LargeT 抗原遺伝子を導入して不死化させたマウス精巣由来細胞から、セルトリ細胞のクローニングを試みた結果、増殖成功率は4.2% (2/48)で非常に低かったものの、2系統の株を得ることに成功した。この細胞は、セルトリ細胞のマーカである SOX9 遺伝子が発現すると GFP が合成されるが、クローニングした細胞ラインはその GFP による発光が確認された(図2)。

セルトリ培養細胞 10 個から培養を開始し静置時間0分でインキュベーターに移動した群の増殖成功率は0% (0/40)であったのに対して、10個から開始して静置時間を15分間設けた群は33% (8/24)の成功率であった。また、細胞20個から開始し静置時間0分でインキュベーターに移動した群は44% (14/32)、20個から開始し静置時間15分の群は46% (11/24)の率で増殖に成功した(図3)。クローニングしたセルトリ細胞は vero 細胞と比較して非常に増殖しづらかったが、培養前に15分程度の静置時間を設けることで、増殖成功率が向上することを見出した。

最後に、培養セルトリ細胞を精細管に類似した中空管構造内で培養するための検討を行った。中空構造にするために、アガロースゲル内部に埋包した細胞含有アルギン酸を溶解させる条件としては、“PBS (-) 1hr”もしくは“PBS (-) 30 min + クエン酸 Na 200 mM 5 min”が、本研究では最適であった。しかしながら、当初目標としていた中空内壁にセルトリ細胞が十分接着して増殖したケース(図4-A,B)は少なく、多くは中空内で細胞塊を形成して(図4-C,D)、生体の精細管を模倣した形態を高率で作製するには至らなかった。

また、当初計画していた精子先体反応誘起に関する研究開始には至らなかった。

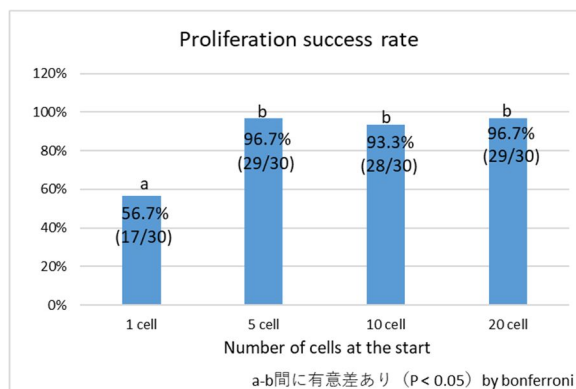


図1.カプセル内における vero 細胞の増殖成功率

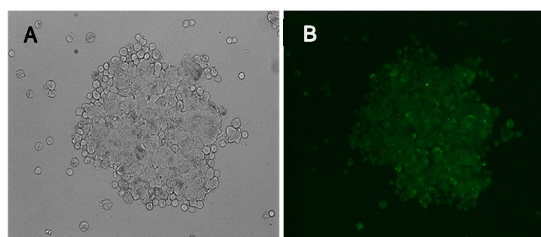


図2. クローニングによって得られたセルトリ細胞塊。A) 光学顕微鏡像, B) 蛍光顕微鏡像

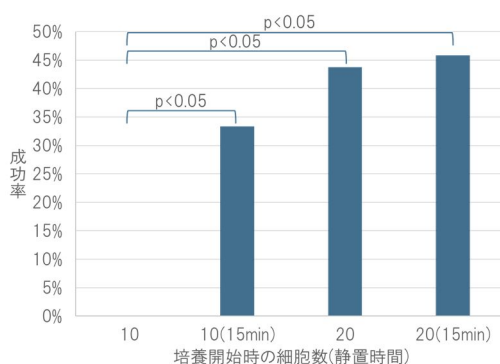


図3. セルトリ培養細胞の少数からの増殖成功率と培養前静置時間の関係

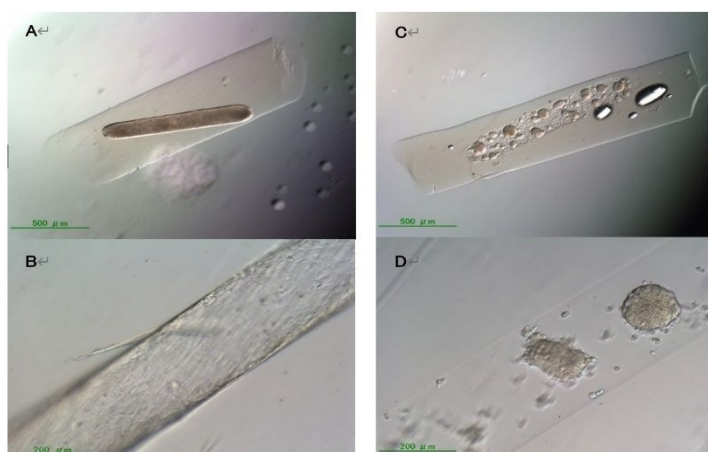


図4. ゼラチン結合アガロースゲル内に作製した中空管構造内でのセルトリ培養細胞の増殖の様子。A,B) 内壁に細胞が接着した状態で増殖、C,D)細胞が内壁に接着せずに細胞塊を形成した状態。

参考文献

- Araki, Y. et al., A single human sperm cryopreservation method using hollow-core agarose capsules. *Fertility and sterility*, 104(4), pp.1004-1009. 2015.
- Sato, T. et al., In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 471(7339), pp.504-7. 2011.
- Lee, D.R., Kaproth, M.T. & Parks, J.E., In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. *Biology of reproduction*, 65(3), pp.873-8. 2001.
- Morozumi, K. & Yanagimachi, R., Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(40), pp.14209-14214. 2005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------