

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21656

研究課題名（和文）体外精子産生を可能にする人工精細管の3次元構築

研究課題名（英文）Three-dimensional construction of artificial seminiferoustubules for in vitro spermatogenesis

研究代表者

山本 ゆき（Yamamoto, Yuki）

岡山大学・環境生命科学学域・准教授

研究者番号：20645345

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では3次元バイオフィンターによる精細管の構築を目指し、未成熟ウシ精巣から細胞の単離・培養条件とプリンティング条件の検討を行った。生殖細胞の精細管内への維持には10%ウシ胎子血清を含む培養液を用い、ホルモン添加またはレチノイン酸添加の影響を検討したところ、ホルモンは細胞の増殖や生殖細胞の局在に効果を発揮しなかったが、レチノイン酸添加では Ki67 を発現する生殖細胞の割合が増加した。またバイオフィンクとして市販のポリエチレングリコールジアクリレートとゼラチンメタクリロイルの混合割合を検討したが、細胞の定着・増殖する条件と3次元構造物の形態を維持する条件が一致せず、更なる検証が必要となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から得られた情報をもとに、バイオフィンターを用いた精細管の構築条件や培養条件をさらに改良し、人工的に3次元構造を作りそれを用いて精子形成を体外で再現できれば、男性不妊治療の発展に大きく貢献することが期待される。完全な体外精子形成の手法は未だマウス以外で確立されておらず、マウスの手法でも精巣組織の培養が必要であり完全な in vitro システムではない。生体組織を要しない精子形成システムを開発することで、ヒトのみならずさまざまな動物の生殖学研究・繁殖・保全に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the isolation and culture conditions of testicular cells of immature bovine testis and the printing conditions with the aim of constructing seminiferous tubules using a 3D bioprinter. The culture medium containing 10% fetal bovine serum was used to maintain germ cells in the ducts, and the effects of hormones or retinoic acid were examined. Hormones had no effect on cell proliferation or germ cell localization, while the addition of retinoic acid increased the percentage of germ cells expressing Ki67. The mixing ratio of commercially available polyethylene glycol diacrylate and gelatin methacrylate as bioink was also examined, but the conditions under which the cells settled and proliferated did not match those maintaining the morphology of the 3D structures, and further verification was required.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：精細管 器官培養 3次元バイオフィンター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不妊カップルの約半数は男性に原因があるとされており、そのおよそ 9 割が造精障害によるものである。つまり、もし健康な精子を体外で発生させることができれば、半数近くの不妊を解決できることになる。体外精子形成は古くから挑戦されており、2011 年にマウス精巣組織の器官培養による体外精子形成が報告されたものの (Sato et al., 2011)、現時点で精子形成を完全な *in vitro* で進行させる技術はない。一方、2016 年には体外で多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) から大量のマウス卵母細胞を作製したという成果が発表された。これは卵母細胞の作出と比較して、体外における精巣組織内環境の模倣が容易ではないことを意味している。

精子は精巣の精細管内で形成される。精細管は基底膜の内側を覆う「セルトリ細胞」とその間隙に存在する様々な分化段階の生殖細胞からなる。この生殖細胞集団は、分化段階の組み合わせによっていくつかのパターンに分類され、長い精細管の中で一定の順序で周期的に現れる(精上皮周期)。この特殊な空間的な細胞の配置や精上皮周期の再現が精子形成には必要であることが予想できる。

体外精子形成を達成するには特殊な精細管内構造の再現が必須であると考え、微細な管腔構造を作る方法として、近年利用が増加しつつある 3D バイオプリンターを用いる。これまでも血管や尿管を作製した報告があり、精細管を 3 次元構築するために有用なツールであると考えた。

2. 研究の目的

体外で精子形成を再現するシステムの開発を目指し、3D バイオプリンターを用いたプリンティングの条件並びに精巣細胞の培養条件を明らかにする。

3. 研究の方法

3 次元バイオプリンターのプリンティング条件の検討

3 次元バイオプリンターではバイオインクと呼ばれる基材を硬化させ立体構造を構築する。精細管を作製するためには、微細構造の構築に適したバイオインクの種類や硬化条件を決定し、さらにそこに細胞を生着させる必要がある。そこで、以下のようにプリンティングの条件を検討した。

バイオプリンター: LumenX (Cellink 社)

バイオインク: ポリエチレングリコールジアクリレート (PEGDA)
ゼラチンメタクリロイル (GelMA)

硬化条件: Power Percentage 50%、Exposure times 18 second、Layer height 100 μm

0%、1%、10%、50%の GelMA を含む PEGDA をバイオインクとして使い、10 x 10 x 5 mm のブロックを作製した。その上にウシ精巣組織から単離した間質細胞を播種して培養液内で 1 週間培養し、細胞の生着性および増殖性を確認した。

精巣組織の器官培養による体外培養条件の検討

精子形成を体外で進行させるためには、精細管内細胞が体外で再現できる生理的条件を決定する必要がある。未成熟のウシ精巣組織片 1 mm³ を、マウス精巣の器官培養法 (Sato, 2011) を参考に 1.5% アガロースゲル上の気相液相界面培養法で培養し、精細管内細胞の増殖能と生殖細胞の精細管内局在を検討した。

培養条件: 1) 10% Knockout Serum Replacement (KSR) または 10% Fetal Bovine Serum (FBS)

2) Follicle Stimulating Hormone (FSH: 0.003 AU/ml)、human chorionic gonadotropin (hCG: 0.03 IU/ml)、テストステロン (5 ng/ml)、トリヨードチロニン (T3: 2 ng/ml)

3) レチノイン酸 (RA: 1 μM)

検討方法: 上記条件で組織片を培養後、0, 1, 2, 3, 4, 6 週間後に 4% 中性緩衝ホルマリン液内で固定した。パラフィンに包埋後薄切し、VASA (生殖細胞マーカー) および Ki67 (増殖細胞マーカー) の免疫組織化学を実施した。

評価項目:

精細管内の全細胞に対する VASA 陽性細胞割合、Ki67 陽性細胞割合、VASA および Ki67 性細胞の割合

精細管内の全細胞に対する、Free (精細管内腔に局在) の VASA 陽性細胞、Migrating (セルトリ細胞に接着) の VASA 陽性細胞、Home (基底膜に接着) の VASA 陽性細胞の割合 (図 1)

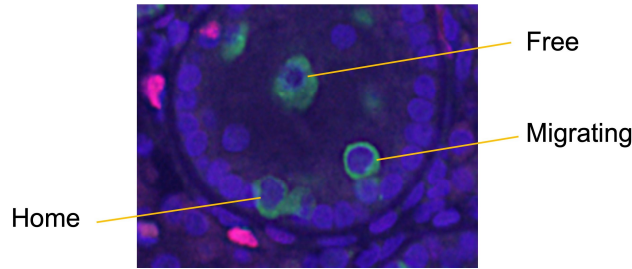


図1. 精細管における生殖細胞 (Green) の局在の分類

Free: 精細管内腔、Migrating: セルトリ細胞に接着、Home: 基底膜に接着

4. 研究成果

3次元バイオプリンターのプリンティング条件の検討

GelMA0% では細胞の接着が認められず、1%では接着はしたものの細胞の伸展・増殖は認められなかった。10%および50%ではブロック状の形態が維持できなかったが細胞は伸展・増殖した。

精巣組織の器官培養による体外培養条件の検討

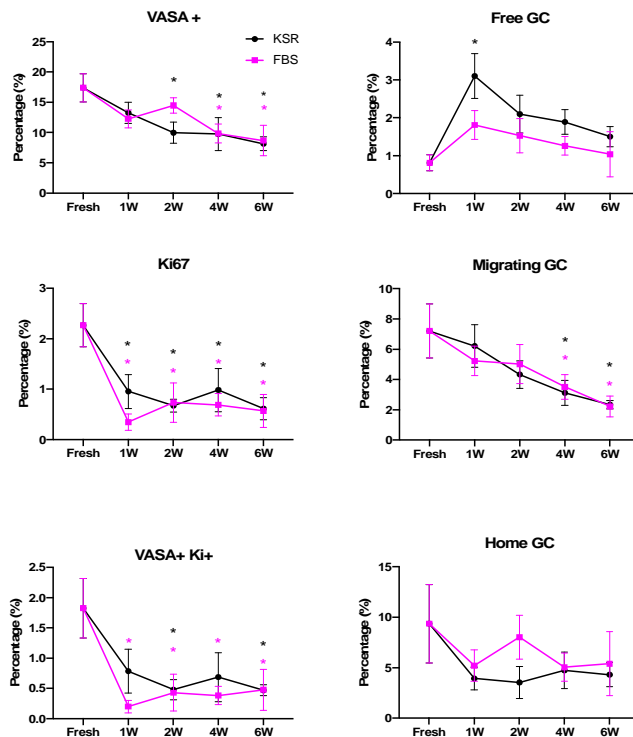
精巣組織培養前の各細胞割合については、 VASA 陽性細胞 $15.5 \pm 1.3\%$ 、Ki67 陽性細胞 $2.3 \pm 0.3\%$ 、VASA および Ki67 陽性細胞 $1.5 \pm 0.3\%$ であった。また局在に関しては、Free $1.3 \pm 0.2\%$ 、Migrating $7.9 \pm 0.9\%$ 、Home $6.3 \pm 2.1\%$ となった (n=10, 表 1)。

表 1. 精細管内におけるVASA陽性細胞、Ki67 陽性細胞、VASA および Ki67 陽性、ならびに各所における VASA 陽性細胞の割合 (%; means \pm SEM, n=10)

VASA +	Ki+	VASA+ Ki +	Position of VASA+ cells		
			Free	Migrating	Home
15.5 ± 1.3	2.3 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.2	7.9 ± 0.9	6.3 ± 2.1

また全ての場合で、培養期間内に精子形成は認められなかった。

- 10% KSR または FBS を含有した培養液で培養した場合 (図 2)、VASA 陽性細胞、Ki67 陽性細胞および Migrating の割合は培養前に比べ有意に減少した ($p < 0.05$)。Free 割合は KSR で 1 週間後に上昇した一方 ($p < 0.05$)、FBS では変化しなかった。よって KSR では内腔への生殖細胞の離脱が増加すると判断し、以降は FBS を用いた。



- ホルモンの有無にかかわらず、VASA 陽性細胞、Ki67 陽性細胞および Migrating の割合は培養後に減少した ($p < 0.05$)。ホルモンを添加した区では、培養 6 週間後に Home の割合が有意に減少した ($p < 0.05$)。以上より、体外培養におけるホルモンの有効性は見いだせなかった。

- RA 添加によって、Ki 67 陽性細胞の割合が培養経過に伴い上昇した ($p < 0.05$)。Free の割合はコントロール区では 4 週間

図 2. 10%KSR (黒線) および FBS (桃線) で培養した際の各細胞割合。*は各添加区内で培養前 (Fresh) に対して有意であることを示す。

後、RA 添加区では6週間後に上昇した ($p < 0.05$)。VASA 陽性細胞割合、Migrating、Home に有意な変化はなかった。以上より RA は、Free の細胞増殖を促進する可能性が示された。

<まとめ>

本研究の結果から、3D バイオプリンターのバイオインクにはゼラチン等の細胞外マトリックスを含む必要があることを確認した。しかし形態を維持させるためには、インクを硬化させる光照射の条件 (力・時間) を詳細に検討する必要がある。今後、細胞を含有した状態でのプリントも予定しており、今回用いたインクに限らずバイオインクの選定と混合条件、硬化条件等を検討し細胞の活動に最適な条件を決定する。

一方精巣組織の器官培養では、体外培養に有効な条件を検討したものの精子形成には至らなかった。体外静止形成に成功しているマウスの器官培養と同様の方法を使ったがウシでは異なる結果が得られたため、動物ごとに必要条件が異なることが示唆された。最終的にヒトや家畜などの動物で体外精子形成を成功させるために、それぞれで詳細な条件の検討が必須であると考えられた。

今後、得られた情報をさらに深く検証し、精子形成に最適な生理的・物理的環境を明らかにすることで体外精子形成を可能にするシステムの構築を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本ゆき、木村康二
2. 発表標題 ウシ未成熟精巢組織の器官培養における細胞増殖能と生殖細胞の精細管内局在
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	木村 康二 (Kimura Koji) (50355070)	岡山大学・環境生命科学研究科・教授 (15301)	

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
---------	---------