

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861281

研究課題名(和文) マイクロ流体システムにより生体内環境を再現した精巣組織培養法の開発

研究課題名(英文) Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device

研究代表者

古目谷 暢(KOMEYA, Mitsuru)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：60721082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：男性不妊はまだまだ病態が解明されておらず、治療法が確立していない疾患群である。診断・治療の進歩には、ヒトを含むin vitro精子形成研究が必要である。申請者らは、マウス精巣組織片を器官培養することで精子形成の全過程をin vitroで再現することに成功した。しかし、精子形成の効率は低く持続期間も短く、真の意味でin vivo精子形成を再現することはできていない。そこで、本研究では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、in vivo精子形成に匹敵するin vitro精巣組織培養法の開発を行った。その結果6ヶ月もの長期にわたり精子形成を安定的に維持することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The causes of male infertility are mostly attributed to the dysfunction of spermatogenesis. However, the mechanism and treatment of spermatogenetic failure are not well revealed. The achievement of human in vitro spermatogenesis will be a powerful tool to reveal the mechanism of male infertility. In 2011, we improved the air-liquid interphase method and achieved in vitro spermatogenesis in mice. The durability and efficiency of spermatogenesis were low in the culture system. Therefore, we imitated the in vivo micro-environment using the microfluidic technology which was derived from the technique manufacturing the semiconductor. The microfluidic device maintained the two major functions of the testis, spermatogenesis and hormone production, for more than 6 months. It will enable us to disclose the mechanism of spermatogenesis precisely mimicking in vivo condition.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：男性不妊 精子形成 マイクロ流体 組織培養

1. 研究開始当初の背景

男性不妊はいまだ病態が解明されておらず、治療法が確立していない疾患群である。診断・治療の進歩には、ヒトを含む *in vitro* 精子形成研究が必要である。申請者らは、マウス精巣組織片を器官培養することにより、精子幹細胞から精子まで精子形成の全過程を *in vitro* で再現することに成功した。しかし、精子形成の効率は低く持続期間も短く、真の意味で *in vivo* 精子形成を再現することはできていない。

2. 研究の目的

本研究では、 μm 単位で培養回路を設計できる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、*in vivo* 精子形成に匹敵する *in vitro* 精巣組織培養法の開発を行う。さらに精巣細胞の培養に応用し、体外で精巣組織を人工的に作製することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 生体内環境を再現した次世代型 *in vitro* 組織培養装置の開発

これまで報告されている細胞培養へのマイクロ流体システムの多種多様な応用結果を基に、生体内微小循環系を再現した次世代型培養装置を試作する。減数分裂特異的に GFP を発現するトランスジェニックマウスの精巣で精子形成の進行具合や持続期間などを従来の器官培養法と比較することによって、精子形成に最適な培養装置の条件を検討し、生体内環境を再現した *in vitro* 組織培養装置を開発する。

(2) 精子形成プロセスのリアルタイム観察

マイクロ流体システムは、軽量小型、薄型透明でサンプルの視認性が非常に高く、培養しながらリアルタイムで高倍率観察ができる。従来の培養では実現不可能なこの特徴を生かして、精子形成に関与する様々な因子の検討や精子形成プロセスのリアルタイム観察を行っていく。

(3) *in vitro* 精巣作製装置の開発

マイクロ流体システムで微小循環や支持構造を再現し、精巣細胞塊から *in vitro* での人工精巣の作製を試みる。

4. 研究成果

(1) 生体内環境を再現した次世代型 *in vitro* 組織培養装置の開発

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培養システムを開発することで(図 1)、マウス精巣を長期間安定して体外で維持することに成功した。組織の変性・壊死を防ぎ(図 2)、精子形成効率が従来より大幅に改善し、6 か月培養後の精巣から産仔を得ることに成功した(図 3)。また生殖能の他にホルモン産生能も維持することに成功した(図 4)。

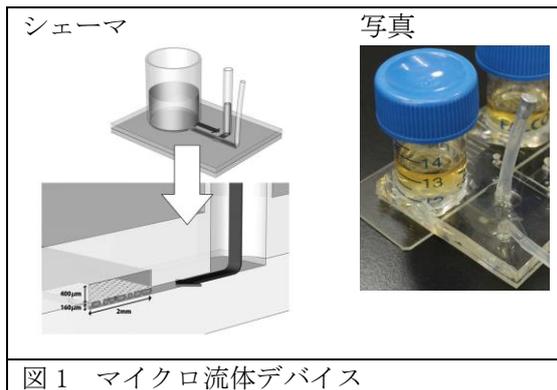


図1 マイクロ流体デバイス

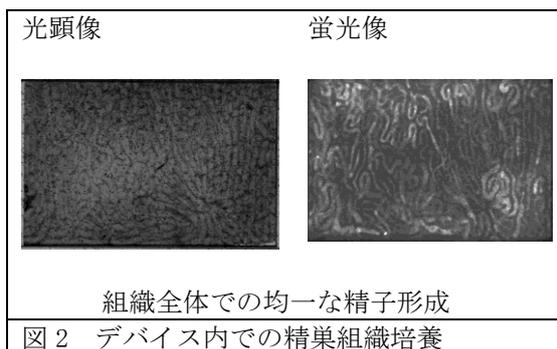


図2 デバイス内での精巣組織培養

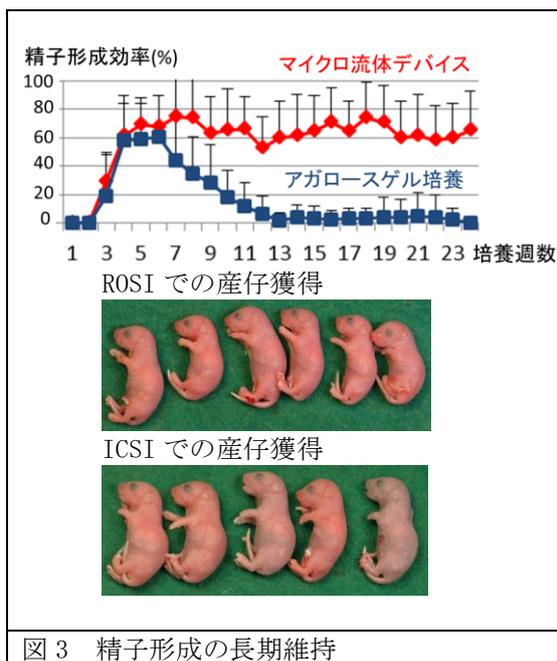


図3 精子形成の長期維持

テストステロン濃度測定スケジュール
(LH 刺激前 24 時間と LH 刺激後 24 時間)

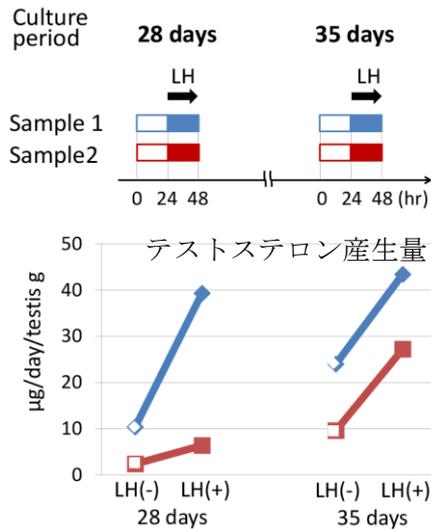


図4 ホルモン産生の維持

(2) 精子形成プロセスのリアルタイム観察

(1)で作製したマイクロ流体デバイスにより組織培養下で生殖細胞の動態を観察した。生殖細胞が減数分裂を開始すると GFP を発現し、分化・成熟するにつれて GFP 発現部位の形態が変化するアクロシン GFP トランスジェニックマウスの精巣を培養したところ、生殖細胞の分化・成熟をタイムラプス撮影で確認することができた。

(3) in vitro 精巣作製装置の開発

(1)で作製したマイクロ流体デバイスの中で精巣構成細胞を再凝集させた細胞塊の培養を行った。精細管の再構成および精子形成過程の部分的な進展がみられたが、従来法を凌駕する結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, Ogawa T. Sci Rep. (査読あり) 19:21472, 2016, doi: 10.1038/srep21472.

②Spermatogonial stem cells: Progress and

prospects. Komeya M, Ogawa T. Asian J Androl. (総説、査読なし) 17: 771-5, 2015, doi: 10.4103/1008-682X.154995.

③In Vitro Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. Sato T, Katagiri K, Kojima K, Komeya M, Yao M, Ogawa T. PlosONE. (査読あり) 10: e0130171, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130171.

④酸化ストレスと精巣. 古目谷 暢, 小川毅彦. 腎臓内科・泌尿器科 (総説、査読なし) 2 巻 : 27-33, 2015, <http://www.kahyo.com/item/N201507-021>

⑤Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T. Nat Commun. (査読あり) 1: 4320, 2014, doi: 10.1038/ncomms5320.

⑥精子幹細胞. 古目谷 暢, 小川毅彦. Hormone Frontier in Gynecology (総説、査読なし) 21 巻 : 131-136, 2014, http://med.m-review.co.jp/magazine/detail/J15_21_2_35-40.html

[学会発表] (計 7 件)

①古目谷 暢, マイクロ流体システムを用いて生体内循環系を疑似的に再現した精巣培養法の開発、第 15 回日本再生医療学会総会、2016. 3. 19、大阪国際会議場 (大阪府)

②Komeya M, Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device、第 31 回欧州泌尿器科学会総会、2016. 3. 14、ミュンヘン(ドイツ)

③古目谷 暢, 精子形成を長期間維持できる in vivo 精巣組織培養システムの開発、第 20 回日本生殖内分泌学会学術集会、2016. 1. 9、神戸国際会議場 (兵庫県)

④古目谷 暢, 生体内における物質供給を疑似的に再現した in vitro 精子形成システムの開発、第 34 回日本アンドロロジー学会総会、2015. 6. 27、福岡大学病院メディカルホール(福岡県)

⑤古目谷 暢, フロンティアシンポジウム Andrology 研究の最前線 精巣組織培養法、第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015. 4. 20、石川県立音楽堂 (石川県)

⑥古目谷 暢, 生体内環境を疑似的に再現した次世代型 in vitro 精子形成システムの開

発、第 103 回日本泌尿器科学会総会、
2015. 4. 18、ANA クラウンプラザホテル金沢
(石川県)

⑦Komeya M、In vitro spermatogenesis with
a novel organ culture system using
microfluidic technology、第 30 回欧州泌尿
器科学会総会、2015. 3. 21、マドリッド(スぺ
イン)

〔図書〕(計 1 件)

①新版今日の不妊診療 精子形成研究の将来.
古目谷 暢、小川毅彦. 医歯薬出版株式
会社: 315, 303-306, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 組織片の機能を発現・維持する方法お
よび組織片培養デバイス

発明者: 藤井 輝夫、木村 啓志、小川 毅
彦、古目谷 暢

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-119858

出願年月日: 2014. 6. 10

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/pr
oteome/ogawa/index.html](http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/pr
oteome/ogawa/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古目谷 暢 (KOMEYA, Mitsuru)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究
院)・客員研究員

研究者番号: 60721082

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし