

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592080

研究課題名（和文）精子幹細胞からの精子形成培養法の開発

研究課題名（英文）In vitro system for spermatogenesis from spermatogonial stem cells

研究代表者

小川 毅彦（OGAWA TAKEHIKO）

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50254222

研究成果の概要（和文）：

精子形成を *in vitro* で再現することは非常に困難であり、長い間の課題であった。我々は、気層液層境界面培養法という古典的な器官培養法を用いてマウス精巣組織片を様々な条件下で培養した。その結果血清代替物（KSR）を培養液に加えて精巣組織を培養すると、完全な精子形成が *in vitro* で進行することを発見した。そこで得られた精子から産仔をとることも成功し、また凍結保存した組織でも解凍後に精子形成を誘導できることも見出した。

研究成果の概要（英文）：

In vitro reconstitution of spermatogenesis is a very difficult task and remained unsuccessful for a long time. We challenged that task using classical organ culture method, called air-liquid interphase. Through testing variety of culture conditions, we found that a serum replacement, KSR, is effective and induced complete spermatogenesis of mouse. Offspring were obtained with the sperm produced *in vitro*. We also showed that cryopreservation of testis tissue fragment is possible to preserve spermatogenic ability of the tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 泌尿器科学 アンドロロジー

キーワード：精子形成、精子幹細胞、培養

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精子形成は長期間（マウスでは

35日間、ヒトでは64日間)にわたる複雑な増殖・分化の過程であり、様々な環境因子が整った条件下でのみ精子は産生される。その精密な過程を *in vitro* で再現することはいまだ不可能であり、その微小環境因子の詳細も明らかではない。

そもそも、*in vitro* 精子形成の研究は20世紀初頭に始まった。イギリスのStrangeways研究所では、培養研究が盛んに行われ、Peter Martinovitchは、凝血塊の上にマウス新生仔や胎仔の精巣組織小片を乗せて、培養実験を行った。その結果、未成熟精巣にある未分化精原細胞が減数分裂パキテン期の精母細胞まで分化することを示した。1937年に報告されたこの成果は当時としては、驚くべき結果であり、その追試はされないまま時代は経過した。精巣の器官培養をもっとも精力的に行ったのは Emil Steinberger と Anna Steinberger の研究者夫妻であった。彼らは、1959年に開発された Air-liquid interphase 法 (気層液層境界部培養法) を用いて、様々な条件でマウス・ラットの精巣組織片を培養した。彼らの業績は、単に培養下での精子形成を目指すことのみならずテストステロンを初めとした性ホルモンの機能や分析の研究に及び、時代の先端をゆく成果を上げ続けた。しかしながら、*in vitro* 精子形成の完成という一つの大きな目標は、パキテン期精母細胞までという大きな壁を越えることは結局達成できなかった。Martinovitch が用いた凝血塊上での組織片の培養と、Steinberger 等が用いた glid steel 上での気層液層境界部培養法とは、原理的には同様と思われる。よって、器官培養法による *in vitro* 精子形成はパキテン期精母細胞までが限界であり、それ以上の精子細胞の分化はどうしてもかなわないものだと認識された。

1970年代以降、培養法は改良され、それに伴い、器官培養法は廃れ、細胞培養法が主流になっていった。細胞培養法には、器官培養法にない幾つかの利点があった。例えば、実験が定量的に行え、細胞株を樹立できれば、同様の実験が繰り返し行える。器官培養や初代培養のようにその都度サンプルを動物に求める必要がなくなり、細胞増殖により実験をスケールアップすることもできる。さらに、分子生物学の技術が導入され、遺伝子導入や遺伝子発現の定量等を行う上でも、細胞培養法は適していた。そのような時代的背景も絡み、*in vitro* 精子形成の研究も細胞培養法が用いられるようになった。そこでの試みは、主として3つに分類できる。1) 生殖細胞に不死化因子を導入し、細胞株として、それからの精子形成を目指す、2) 精巣体細胞 (セルトリ細胞) に不死化因子を導入し、フィーダー細胞としてその上で、生殖細胞を培養し、

精子形成を誘導する、3) 3次元培養法等により、精巣内環境を模倣した培養条件を作成して、精子形成を誘導する、である。しかし、これらの試みは、部分的な成功にとどまり、*in vitro* 精子形成は困難な課題のまま残り続けた。

2. 研究の目的

本研究は、*in vitro* において精原幹細胞から精子形成を進行させる条件を検討し、その可能性を探求することを目的とした。特に、[1] 精巣組織を用いた器官培養実験、[2] 精細管再構成実験、[3] GS細胞を精細管に組み込む実験、の3つの実験により、*in vitro* 精子形成の可能性を追求した。ただし、研究成果が主として[1]において得られるようになった経緯から、徐々に実験の主体はそちらに集中させた。

3. 研究の方法

未成熟マウスの精巣組織片をアガロースゲル上に置き、培養液をアガロースゲルの途中の高さまで浸すことで、古典的な器官培養法 (気層液層境界部培養法) をより簡便な方法に改良した。またマウスの精子形成の進行を簡便かつ正確に判定するために、減数分裂時および減数分裂終了時に GFP を発現する2系統のトランスジェニックマウス (Acr-GFP、Gsg2-GFP) を実験に用いた。様々な培養条件、温度、酸素濃度、培養液組成、等々を検討した。

4. 研究成果

本研究の開始に先立つ2007年から、我々は本格的に *in vitro* 精子形成の実験に取り組むことになった。そして、その手始めとして、Steinberger 達の器官培養法を再検討することから開始した。

器官培養法を再評価にあたり、まずは方法の簡便化を図った。そこで、上述のごとく減数分裂の中期および終末期に特異的に GFP を発現する2系統のトランスジェニックマウス (Tg) を用いた。Acr-GFP Tg では GFP 蛋白質がアクロソームキャップに集積して発光するため円形精子細胞の同定にも有用である。生後 7.5~11.5 日齢の Acrosin-GFP Tg および Gsg2-GFP Tg の精巣組織片を器官培養法で培養すると、*in vivo* とほぼ同様のタイミングで GFP が発現することがわかった。この実験系で培養条件を検討した結果、培養温度は 34°C、培地は α MEM 培地 (または RPMI 培地) + 10% ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum, FBS) が最適な条件であることが明らかになった。だが、この至適条件をもってしても、精子形成が完了できるわけではなかった。減数分裂への進行は認められたが、半数体である円形精子細胞はごく低頻度で

しか認められず、伸長精子細胞や精子はまったく出現しなかった。実験を繰り返してわかったことの一つは、この培養系においてはFBSが必須であるということだった。FBSを入れない培地では減数分裂が誘導されないばかりか、精細管の発達さえも認められなかった。そこで、その時点での基本培地である α MEM培地+10%FBSに何らかの有効な因子を一つ（あるいはごく少数）でも加えれば、減数分裂pachyteneの壁を越えられるのではないかという期待のもとに実験を続けた。そのような因子の候補として、テストステロン、卵胞刺激ホルモン、アクチビン、肝細胞増殖因子、BMP-4、BMP-7などのホルモンや成長因子を培養液に添加して実験をくり返した。しかし、それらのいずれも精子形成を促進することはなかった。

以上のことから、血清中には精子形成に必要な因子が含まれることは間違いないが、同時に半数体形成を阻害するような因子が含まれている可能性も示唆された。そこで我々は、FBSの使用をあきらめ、無血清培地での培養実験を開始した。その手始めとして、血清代替物であるKSR (Knockout Serum Replacement) とB27、そして血清不含培地であるTKM培地を用いて実験を行った。そこで予想外の結果に遭遇した。KSR (10%)を培地に添加したときにAcr-GFP TgおよびGsg2-GFP Tgの両者においてGFPの発現が大幅に亢進された。FBSよりもKSRの方がGFP発現を強く広範囲に誘導した。また、FBSを添加した培地では培養期間が30日を越えるとGFPの発現は低下して消失するが、KSRを添加した培地では60日間以上にわたりGFPの発現が維持されることもわかった。さらに、より未分化な前精原細胞だけが含まれる生後0.5~2.5日齢の新生仔マウスの精巣を器官培養した場合、FBSを添加した培地ではGFPの発現は得られなかったが、KSRを添加した培地では高率にGFPが発現した。本来KSRはES細胞の未分化状態を維持しつつ増殖させるために使用される血清代替物である。我々の実験では、精子形成（分化）を促進するような結果が得られたことになり、その意味では予想外の正反対の効果であった。

GFPの発現が、精子形成の進行を正しく反映していることを確認するために、免疫染色を行った。減数分裂マーカータンパク質であるSYCP1やSYCP3に対する抗体を用いて染色すると、パキテン期特有の染色体構造に陽性所見が認められ、確かに減分裂が進行していることを示す所見であった。また、培養23~50日のAcr-GFP Tgの組織を調べると精子完成過程に特有のアクロソームキャップ (GFP発現) が認められた。さらに、鞭毛をもつ精子も多数観察された。組織学的にも精子形成像が散見された。一方、精

子形成に重要な役割をしているセルトリ細胞も、器官培養中に成熟している所見が認められた。通常、セルトリ細胞ではアンドロゲン受容体が生後4~6日齢で発現し始めるが、器官培養したセルトリ細胞においてもアンドロゲン受容体の発現が観察された。すなわち、培養期間中にセルトリ細胞が成熟し、それが*in vitro*での精子形成をサポートしていることを示唆していた。

最後に、器官培養法によって造られた精子細胞や精子の妊孕能を調べる顕微授精実験を行った。23個の円形精子細胞を、それぞれ卵に顕微授精したところ最終的に7匹の健康な産仔を得た。また35個の精子を顕微授精したところ、5匹の産仔を得ることに成功した。得られた産仔はすべて順調に発育した。それらの生殖能をテストするために、兄妹交配を行ったところ、孫世代が誕生し、雄雌すべてのマウスが妊孕能をもつことが確認された。これらの顕微授精実験の成功率は*in vivo*に由来する精子細胞や精子を使った結果と比較しても劣らないものであった。以上の結果から、*in vitro*において正常な精子形成が進行し、精子幹細胞から妊孕性のある精子が形成されたことが示された。

げっ歯類においては、精子幹細胞を培養下に増殖させることができる。そのような精子幹細胞は凍結保存もできるので、特定の雄個体の生殖細胞をほぼ無限に保存できることを意味する。将来、ヒトの精子幹細胞が培養できるようになれば、精子凍結保存に代わって、精子幹細胞の凍結保存が、例えば小児がん患者の生殖能維持に役立つことが期待されている。そこで、我々は、培養細胞ではなく、精巣から採取した組織片をそのまま凍結保存できないかと考えた。それが可能なら、組織片のまま凍結保存し、解凍後にそのまま組織培養して精子産生することが可能かもしれないと考え、次の実験を行った。細胞凍結保護液

(TC-Protector)に精巣組織片を浸漬し、-70℃に一晚、その後液体窒素へと移して凍結保存した。液体窒素内の保存期間は4~25日間で、それら凍結組織を室温で解凍し、培養を開始した。その結果、Acr-GFP、Gsg2-GFPともに発現がみられ、円形精子細胞や伸長精子細胞が観察された。すなわち、凍結した組織片からでも精子形成の再開が可能であることが明らかになった。このことは、本来個体が持つ生殖能力を精巣組織片という形で、半永久的に保存できることを意味している。現在、精子の凍結保存は癌患者の妊孕能を保存するために、抗がん剤治療や放射線治療の前に、一般的に行われている。しかし、男児小児がん患者の場合、精子形成は開始しておらず、精子の保

存はできない。従って、精巣組織片を保存できるなら、それは精子保存に代わる手法として、臨床的にも大きな意義があると思われる。

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 5 件)

①Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T. *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat. Commun.* 2, 472, 2011

②Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504-507, 2011.

③Araki Y, Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Araki Y, Ogawa T. Proliferation of mouse spermatogonial stem cells in microdrop culture. *Biology of Reproduction*, 83, 951-957, 2010.

④Gohbara A, Katagiri K, Sato T, Kubota Y, Kagechika H, Araki Y, Araki Y, Ogawa T. *In vitro* murine spermatogenesis in an organ culture system. *Biology of Reproduction* 83, 261-267, 2010.

⑤Yumura Y, Iwasaki A, Saito K, Ogawa T, Hirokawa M. Effect of Reactive Oxygen Species in Semen on the Pregnancy of Infertile Couples. *Int. J. Urology*, 16, 202-207, 2009.

[学会発表] (計 11 件)

①小川毅彦：器官培養法を用いた *in vitro* 精子形成法の開発 第 20 回平成不妊研究会 (招待講演) 平成 24 年 3 月 15 日 六本木・アカデミーヒルズ (東京都)

②小川毅彦：器官培養法を用いた *in vitro* 精子形成法の開発 第 26 回動物生殖工学研究会 (招待講演) 平成 23 年 12 月 4 日 北里大学・北里本館 2F 大会議室 (東京都)

③小川毅彦：器官培養法を用いた精子形成法の開発と臨床応用の可能性 第 2 回生殖医療研究会 (招待講演) 平成 23 年 11 月 6 日 国際医療福祉大学 青山キャンパス (東京都)

④小川毅彦：器官培養法を用いた *in vitro* 精子形成法の開発と発展 第 89 回発生工学・疾患モデル研究会 (招待講演) 2011 年 10 月 26 日 順天堂大学 (東京都)

⑤小川毅彦：器官培養法による *in vitro* 精子形成と臨床応用の可能性、第 76 回日本泌尿器科学会東部総会 2011 年 10 月 22 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑥Ogawa T: *In vitro* spermatogenesis. 57th Annual meeting of Canadian Fertility and Andrology Society (Invited) 21st, Sept, 2011, Toronto, Canada.

⑦小川毅彦：マウス精巣の器官培養による *in vitro* 精子形成 シンポジウム「精原幹細胞：基礎から応用まで」第 104 回日本繁殖学会 (招待講演) 2011 年 9 月 17 日 いわて県民情報交流センター・アイーナ (岩手県)

⑧Ogawa T: *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. 16th World Congress on *In vitro* Fertilization & 5th World Congress on *In vitro* Maturation. (Invited) Sep. 13th, 2011, Keio Plaza, Tokyo, Japan

⑨小川毅彦、佐藤卓也、横西哲広、郷原絢子、河路かおる、窪田吉信：器官培養法を用いた新生仔マウス精巣での *in vitro* 精子産生 第 99 回日本泌尿器科学会総会 2011 年 4 月 22 日 名古屋国際会議場

⑩小川毅彦：*in vitro* 精子形成の進展、第 6 回日本生殖再生医学会 2011 年 3 月 13 日 東京、シェーンパッハ・サボー

⑪小川毅彦：精子幹細胞の培養と *in vitro* 精子形成の進展/シンポジウム「精子形成研究の新たなフロンティア：幹細胞から精子の品質まで」第 55 回日本生殖医学会総会 2010 年 11 月 12 日 徳島市あわぎんホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 毅彦 (OGAWA TAKEHIKO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：50254222

(2) 研究分担者

湯村 寧 (YUMURA YASUSHI)
横浜市立大学・市民総合医療センター・講師
研究者番号：30522023

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

