

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05098

研究課題名（和文）生体を模倣して精細管を構築し精子形成を実現する細胞培養システムの開発

研究課題名（英文）The development of three-dimensional cell culture system imitating in vivo niche and architecture during the formation of seminiferous tubules to generate functional testicular organoid

研究代表者

古目谷 暢 (Komeya, Mitsuru)

横浜市立大学・医学研究科・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） 19,700,000円

研究成果の概要（和文）：精細管を切り開いた層構造を再現した精細管シートデバイスによって、3か月の長期にわたりSOX9、ZO1、ARを発現したセルトリ細胞シートを維持でき、精子形成も減数分裂の初期まで進展した。精細管形成過程を再現した培養法によって、生体内と類似した立体構造をもつオルガノイドができ、精子形成が減数分裂まで進展した。トランスクリプトーム解析によりセルトリ細胞の成熟に必要な転写因子と成熟マーカーの候補遺伝子を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症の50～60%に關与する男性不妊の病態解明や治療法の開発をすすめるうえで、ヒトin vitro実験系の確立が重要である。特に細胞培養系によりiPS細胞を用いたin vitro精子形成が実現できれば研究推進が強く期待できる。本研究は、精細管の基本である層構造および精細管の管腔形成過程を再現することで精子形成を減数分裂初期まで進展させることができた。細胞培養下でのヒトin vitro精子形成の実現に向けた貴重な知見を得ることが出来た。

研究成果の概要（英文）：This study used two approaches to generate functional testicular organoid. First, the architecture of seminiferous tubule was imitated by the sheet device in which germ cells were incubated on Sertoli cell sheet. By the device, Sertoli cell sheet was maintained over 3months and germ cell were divided into the early meiotic stages. Second, testicular cells were incubated by the self-organization technique. Germ cells were arranged in a chain at the outer area of organoids and were divided into the early meiotic stages.

研究分野：生殖医学、アンドロロジー、結石症学、再生医学

キーワード：男性不妊 精子形成 オルガノイド マイクロ流体システム トランスクリプトーム 細胞培養

## 1. 研究開始当初の背景

現在、妊娠を希望する夫婦のうち、1年以内に子供を授かることができず不妊症と診断される割合は15%に達する。不妊症の20%は男性側のみに、30~40%は男性側にも原因があるとされている。男性不妊は不妊症の50~60%に関与しているにもかかわらず、原因の解明が十分には進展しておらず治療法も確立していないため、多くの患者が有効な治療を受けられずにいる。

生体外の培養環境で精子形成の実現を目指す *in vitro* 精子形成研究は、生体内で生じる臓器間の複雑なネットワークが精子形成に与える影響を無視できるため実験系をシンプルにでき、精子形成の状態を継続して観察することができる。さらに、ヒト検体での *in vitro* 精子形成が実現すれば男性不妊の病態解明や治療法の開発が期待できる。

そこで申請者らの研究室は長年 *in vitro* 精子形成システムの開発に取り組んできた。2011年にアガロースゲル上で精巣組織を培養する気相液相境界部培養法によって、マウスの精子幹細胞を精子まで分化させ、産仔を得ることに世界で初めて成功した(Nature 2011; 471: 504-507)。また、生体内の微小循環系を再現したマイクロ流体デバイスによって、精子形成効率は生体の60%まで飛躍的に改善し従来法の2~3倍以上の6ヶ月間にわたり維持することに成功した(Sci Rep. 2016; 6: 21472、Sci Rep. 2017; 7: 15459)。

しかし、組織培養での *in vitro* 精子形成をヒトに応用する際には、ヒト精巣組織片の入手に制限があり、生殖細胞が存在しない Sertoli cell only syndrome などの患者では精子形成を誘導することができないという課題がある。細胞培養であれば、理論上 iPS 細胞から精巣を構成する細胞を誘導し *in vitro* 精子形成を実現することが可能である。そこで、本研究は近い将来にヒト検体を用いて男性不妊の病態解明や治療法の確立を強力に推し進めるため、細胞培養下での *in vitro* 精子形成システムの開発を行う。

## 2. 研究の目的

これまで生殖細胞を単独あるいはフィーダー細胞と培養した報告が散見されるが、精子に類似した形態の細胞を認めたものの妊孕性は確認できていない。生体において生殖細胞が精子まで成熟するにはセルトリ細胞による細胞質の貪食を含む各種サポートを必須であり、生殖細胞とセルトリ細胞の生体内における立体構造を再現することが重要と考えた。そこで、本研究では  $\mu\text{m}$  単位の微小な培養回路により多様な生体内環境を模倣できるマイクロ流体システムを用いて精細管構造をより精巧に再現し、細胞培養下でのマウス *in vitro* 精子形成の実現を目指す。

(1) 精細管シートデバイスにより精細管の層構造を再現する、(2) 精細管誘導デバイスで管腔形成過程を制御し精細管構造を再現する、という2つのアプローチで細胞培養下での *in vitro* 精子形成を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 精細管シートデバイスにより精細管の層構造を再現し精子形成を実現する

マイクロ流体システムにより組織構造を精巧に再現し、細胞培養下で生体内の組織機能を発現

させた報告がある (Science 2010; 328: 1662-8)。そこで精細管構造を模倣した培養回路の中に精巣構成細胞を生体内と同様に配置して精細管を疑似的に再現する精細管シートデバイスを作製する。この際に精細管の管腔構造ではなく機能的に重要な層構造を再現する。精細管を構成する細胞を外側から順番にシート状に積層し、セルトリ細胞シートあるいは精細管シートを人工的に作製する。この中で生殖細胞を継続的に分化・増殖させつつ、*in vitro* 精子形成を実現する。

#### (2) 精細管誘導デバイスで精細管管腔形成過程を再現し精子形成を実現する

申請者らが以前行った精細管誘導法では精細管の再構成が不十分であったため (業績 11)、マイクロ流体システムを用いて生体内での精細管形成過程の再現性を向上させる。管腔臓器の発生には、構成細胞同士の接着、管腔誘導因子の濃度勾配や間質流が重要である。マイクロ流体システムを用いてこれらを制御することで、内腔の開通した毛細血管を誘導し意図した方向に伸長させ、*in vivo* での血管新生を再現した報告がある (Lab Chip 2013; 13: 1489-500)。精細管誘導デバイスを作製し、性分化に重要な FGF9、Dhh、AMH や、その他ホルモン、成長因子、サイトカインといった精細管誘導因子の濃度勾配や間質液の流れを制御することにより、生体内における精細管の発生過程を疑似的に再現する。これによって機能的な精細管を誘導し、*in vitro* 精子形成を実現する。

### 4. 研究成果

#### (1) 精細管シートデバイスにより精細管の層構造を再現し、精子形成を実現する

上層部分にセルトリ細胞を配列し、下層部分に培養液を流すことで、生体内の精細管を切り開いた層構造を再現したセルトリ細胞シートデバイスを設計した。セルトリ細胞はシート状に配列したが、4 週間以内にシートが剥がれてしまい層構造を維持することが出来なかった。そこで、市販のセルカルチャーインサートを用いた静置培養でシート構造を維持できる培地の組成や播種細胞密度などを詳細に検討し、3 か月の長期にわたってセルトリ細胞の指標である SOX9、成熟化の指標である ZO1 や AR を発現したままシート構造を維持できるようになった。続いてセルカルチャーインサートでつくったセルトリ細胞シートのうえに生殖細胞を播種したところ、減数分裂の初期まで精子形成が進展した。しかし、減数分裂の壁を越えて半数体細胞までは分化せず、また培養 2 週間を超えると生殖細胞は漸減し、最終的にはほとんど消失してしまった。そこで、セルトリ細胞単独シートでは生体内構造を十分に再現できていないと考え、セルトリ細胞以外の細胞も含めた層構造の再現を試みた。セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、筋様細胞などを含む精巣細胞懸濁液を播種したところ、SOX9 陽性細胞を主体としライディッヒ細胞散見されるなどシート構造が出来上がったが、生殖細胞を維持、分化させることはできなかった。引き続き厳密な層構造の再現が重要と考え、セルカルチャーインサートの上面、下面に精巣懸濁液やフィーダー細胞を播種して 2 層からなるシート構造を作製したが、同様の結果であった。一方、これまでの検討で判明した培養条件をセルトリ細胞シートデバイスに応用したがシート

構造を維持することが出来なかったため、シート構造を維持できるデザインへの再設計を開始している。

今後は、精細管を切り開いた層構造の模倣に加えて、精細管の外側から内腔にかけて酸素濃度が低下し、血液精巣閉門によって血液成分が直接内腔まで拡散せずセルトリ細胞が内腔液を分泌して極性をつくっている点などをマイクロ流体デバイスで再現していく。

### (2)精細管誘導デバイスで精細管管腔形成過程を再現し精子形成を実現する

自己組織化アプローチに基づく臓器発生研究で用いられる培養液、添加因子、細胞外基質などが精巣誘導や精子形成に及ぼす効果を検討した。細胞を凝集させる際に、我々が以前報告した精巣構成細胞の懸濁液だけを用いる手法(Biol Reprod. 2013; 89: 15)、構成細胞と細胞外基質を混合する手法を比較した。培養方法も精細管誘導デバイスを用いる前に、ウェルプレート、Vボトムプレート、セルカルチャーインサート、アガロースゲルなどを用いた静置培養法、Hanging drop法で比較した。これらの結果、精巣細胞と細胞外基質を混合してウェルプレートで静置培養する手法が、簡便かつ安定して生殖細胞を維持しつつ、精子形成を減数分裂まで進展させることができた。また、嚢胞状スフェロイドの外縁部分に生殖細胞が鎖状に並んでおり、生体内での生殖細胞の分布と類似した立体構造を構築することが出来た。

今後はより生理的な環境を再現できるデバイスに上記培養条件を流用し、安定した半数体の産生を目指していく。

### (3)その他

本研究は精巣構成細胞を生体内と同じ構造に配列すれば細胞自身が本来持っている機能を発揮し精子形成が進展するという仮説に基づいている。しかし、酵素処理により分解され生体外環境に暴露されるため、構造を再現しても本来の機能を発揮できない可能性がある。そのため生体内における成熟したセルトリ細胞の遺伝子発現情報を遺伝子導入によって再現するアプローチにも取り組んだ。7日齢、14日齢、21日齢マウスのセルトリ細胞と、7日齢に精製したセルトリ細胞をウェルプレートで1週間培養したセルトリ細胞のトランスクリプトーム解析を行い、細胞培養下で減少する転写因子を探索し、表現型や遺伝子発現量に基づき遺伝子に絞り込んだ。今後、qPCR、ウェスタンブロットで発現を確認したうえで遺伝子導入して強制的にセルトリ細胞の成熟誘導を行っていく。

また、既知のセルトリ成熟マーカーであるARやZO1は精子形成を実現できるレベルの成熟を意味しない。真のセルトリ細胞成熟マーカーを用いて培養下で簡便にセルトリ細胞の成熟を評価できるようになれば、本研究の遂行を迅速にすすめられるようになる。そのため、上記トランスクリプトーム解析を日齢毎に比較し、セルトリ細胞が成熟すると発現してくる遺伝子を探索した。さらに、9日齢、14日齢マウス精巣を用いたsingle cell RNAseqを実施し、精巣内においてセルトリ細胞で特異的に発現する遺伝子を絞り込んだ。今後、qPCR、ウェスタンブロット、免疫染色で発現を確認し、セルトリ細胞成熟マーカーの同定およびトランスジェニックマウスの

作製を行っていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 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.	4. 巻 online ahead
2. 論文標題 Antioxidant Vitamins and Lysophospholipids Are Critical for Inducing Mouse Spermatogenesis Under Organ Culture Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 online ahead
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202000245R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komeya Mitsuru, Yamanaka Hiroyuki, Sanjo Hiroyuki, Yao Masahiro, Nakamura Hiroko, Kimura Hiroshi, Fujii Teruo, Sato Takuya, Ogawa Takehiko	4. 巻 18
2. 論文標題 In vitro spermatogenesis in two dimensionally spread mouse testis tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 362 ~ 369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Kazuaki, Nakamura Hiroko, Komeya Mitsuru, Yamanaka Hiroyuki, Makino Yoshinori, Okada Yuki, Akiyama Haruhiko, Torikai Nobuhito, Sato Takuya, Fujii Teruo, Kimura Hiroshi, Ogawa Takehiko	4. 巻 115
2. 論文標題 Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ spreading	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 3030 ~ 3041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.26822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Komeya Mitsuru, Sato Takuya, Ogawa Takehiko	4. 巻 17
2. 論文標題 In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 407 ~ 420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12225	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamanaka Hiroyuki, Komeya Mitsuru, Nakamura Hiroko, Sanjo Hiroyuki, Sato Takuya, Yao Masahiro, Kimura Hiroshi, Fujii Teruo, Ogawa Takehiko	4. 巻 500
2. 論文標題 A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 885 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanjo Hiroyuki, Komeya Mitsuru, Sato Takuya, Abe Takeru, Katagiri Kumiko, Yamanaka Hiroyuki, Ino Yoko, Arakawa Noriaki, Hirano Hisashi, Yao Tatsuma, Asayama Yuta, Matsuhisa Akio, Yao Masahiro, Ogawa Takehiko	4. 巻 13
2. 論文標題 In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0192884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0192884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komeya Mitsuru, Hayashi Kazuaki, Nakamura Hiroko, Yamanaka Hiroyuki, Sanjo Hiroyuki, Kojima Kazuaki, Sato Takuya, Yao Masahiro, Kimura Hiroshi, Fujii Teruo, Ogawa Takehiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-15799-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古目谷 暢、小川 毅彦
2. 発表標題 静水圧を用いて血流を再現した精巣組織培養システムの開発
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古目谷 暢
2. 発表標題 in vitro精子形成システムの開発
3. 学会等名 日本泌尿器科学会東部総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古目谷 暢
2. 発表標題 シリコン樹脂カバーを併用した精巣組織培養法による精子形成効率の向上
3. 学会等名 第106回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 美樹、古目谷 暢、小島 一晃、加藤 佐樹子、林 功晃、山中 弘行、佐藤 卓也、三條 博之、矢尾 正祐、中村 寛子、木村 啓志、藤井 輝夫、小川 毅彦
2. 発表標題 シリコン樹脂カバーによる精巣組織培養法の改良
3. 学会等名 第36回日本アンドロロジー学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公立大学法人 横浜市立大学生命医科学研究科創薬再生科学小川グループ（生殖再生医学）  
<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/proteome/ogawa/index.html>



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