

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21657

研究課題名（和文）高効率体外精子形成法の開発を目指したレトロトランスポゾン発現の制御

研究課題名（英文）Development of Retrotransposon Expression Control for High-Efficiency In Vitro Spermatogenesis

研究代表者

佐藤 卓也（SATO, Takuya）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：70599505

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）：新生仔マウス精巣を器官培養することで、精子幹細胞から精子へ分化誘導することが可能になっている。しかしながら、より幼弱な胎仔期精巣（胎齢12.5日）では体外で精子形成を誘導することはできていなかった。本研究において、逆転写酵素阻害剤を添加した培地で胎仔精巣を器官培養することで、半数体である円形精子細胞や伸長精子細胞まで分化誘導させることに初めて成功した。さらに、これらの精子細胞が正常な細胞かどうか確認するため、顕微授精実験を行った結果、健康な産仔を得ることに成功した。これらの結果は、胎仔精巣における体外精子形成が正常に進行したことを証明している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、逆転写酵素阻害剤が体外精子形成の誘導効率を改善することがあきらかとなり、新たに胎仔期精巣の培養法を確立することができた。これによって胎仔期精巣の発達から出生後の精子形成の開始、精子完成にいたる過程が体外で解析が可能になった。本研究において開発した胎仔精巣の培養は、胎仔期の精巣発生モデルとして、発生学的な観点から新たな情報を提供できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：By organ culturing neonatal mouse testes, it has become possible to induce differentiation of spermatogonial stem cells into sperm. However, inducing spermatogenesis in vitro from more immature fetal testes (Embryonic day 12.5) has been challenging. In this study, we achieved, for the first time, the induction of differentiation up to round spermatids and elongating spermatids by organ culturing fetal testes in a medium supplemented with a reverse transcriptase inhibitor. Furthermore, to confirm the normality of these spermatid cells, we conducted microinsemination experiments and successfully obtained healthy offspring. These results demonstrate the successful progression of in vitro spermatogenesis in fetal testes.

研究分野：発生生物学

キーワード：精子形成 精巣 レトロトランスポゾン 逆転写酵素阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生仔のマウス精巣を切り分けた組織片を器官培養する方法で、精子幹細胞を精子までの分化過程を *in vitro* において再現することが可能となっている。しかし、その精子形成効率は低く、器官培養した精巣において精子が産生される精細管は、全体のわずか数%に過ぎない。我々は培地添加物による精子形成効率の改善を検討してきた。その過程で、精子形成とは無関係に思える逆転写酵素阻害剤(RTI)を培地に添加し培養すると、*in vitro* での精子形成効率が向上することを発見した。RTI はレトロウイルスの増殖を抑制する治療薬として開発されたが、レトロトランスポゾンなどの転移因子は、通常はほとんど抑制され不活性化されているが、オスの生殖細胞におけるレトロトランスポゾンの脱抑制は精子形成不全を招き雄性不妊の原因となる。これらのことから、*in vitro* 精子形成を阻害している要因は培養中の精巣組織におけるレトロトランスポゾンの脱抑制にあると推測した。高効率精子形成誘導法を開発するために、精巣の器官培養における RTI の効果についてより詳細な調査とレトロトランスポゾンの関連性を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

(1) 精巣の器官培養における RTI の精子形成効率改善効果について、より詳細な解析を行う。これまでに新生仔マウス精巣において、RTI が有効であることが分かっている。本研究では、胎仔精巣や成熟精巣など様々な発生ステージの精巣を RTI 添加培地で器官培養し、逆転写酵素阻害の有効性について詳細に検証する。

(2) RTI により *in vitro* 精子形成効率が向上したことから、培養した精巣においてレトロトランスポゾンが活性化している可能性が考えられた。実際に培養下の精巣においてレトロトランスポゾンの発現が生じているかどうか明らかにする。

最終的には培養下精巣におけるレトロトランスポゾンの脱抑制メカニズムを解明し、高効率な体外精子形成誘導法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 胎仔マウス(E12.5~E14.5)精巣から中腎を除去し、Knockout Serum Replacement (KSR ; Thermo Fisher Scientific)と RTI を添加した aMEM 培地に下半分を浸したアガロースゲル上に置いて培養を行った。実体顕微鏡で週に一度培養組織を観察し、明視野像と GFP 蛍光像を撮影した。撮影した写真をもとに、画像解析ソフトを用いて GFP 発現面積を定量し、精子形成効率を算出した。培養終了後、組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、凍結切片を作製し免疫染色により、精子形成の進行を評価した。

(2) *in vitro* および *in vivo* の精巣を固定し凍結切片を作製し、抗 LINE1-ORF1p 抗体で免疫染色を行った。あるいは、それぞれの精巣から RNA を抽出し cDNA へ逆転写後、定量 PCR を行った。

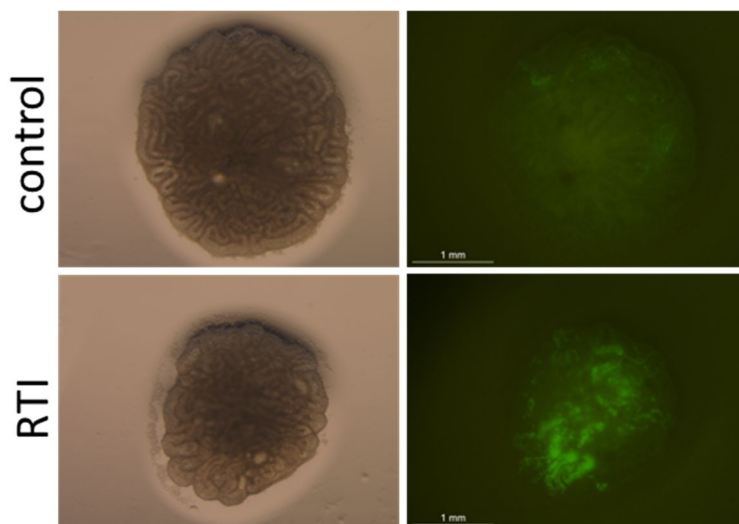


図 1. 器官培養を行った E14.5 の胎仔精巣。明視野像(左)と GFP 蛍光像(右)。RTI 添加群において広範囲の GFP 発現を認めた。

4. 研究成果

(1) 小島らによる報告(Kojima et al., 2016)では、新生仔に比べ胎仔マウスの精巣培養では幼弱なステージほど精子形成効率が低くなり、*in vitro* で精子形成誘導に成功したのは E14.5 以降の精巣であった。E14.5 の胎仔精巣を 74 日間培養し、観察時に明視野像と GFP 蛍光像を撮影した(図 1)。Control では培養 32 日目に、RTI 添加群では培養 21 日目に GFP の発現が観察できた。培養 7 週目には、Control での GFP 発現はわずかであったが、RTI 添加群では GFP がより広範囲に発現していることが確認できた。RTI 添加による精子形成効率の改善効果が確認できた。次に培養終了後の精巣組織を免疫染色し、減数分裂中期以降から発現する GFP 陽性細胞と、精子

細胞マーカーPNA が陽性となる細胞を確認することで精子形成の進行度を評価した。56 日間培養した精巣を用いて免疫染色を行った。Control では GFP 陽性細胞は観察できたものの、PNA 陽性細胞である精子細胞は観察できなかった。一方で、RTI ありの条件では PNA 陽性細胞が確認できた。

続いて、精巣へと分化して間もない E12.5 の胎仔精巣を用いて培養を行った。小島らによる報告(Kojima et al., 2016)では、in vitro 精子形成が誘導できなかったステージである。まず、E12.5 の胎仔精巣を 51 日間培養し、観察時に明視野像と GFP 蛍光像を撮影した。Control でもわずかながら GFP 発現が確認できたが、RTI 添加群ではより広範囲に確認できた。さらに、E12.5 日齢の胎仔精巣を 51 日間培養した精巣を用いて免疫染色を行った。一方、RTI 添加群では GFP 発現細胞と、精子細胞が形成されていることが確認できた。このことから、E12.5 の胎仔精巣でも、RTI により in vitro で精子形成を誘導出来ることが明らかになった。

そこで顕微授精を行い、in vitro で産生されたこれらの精子細胞および精子が妊孕性を有しているか検討した。顕微授精には、51 日間培養した胎生 12.5 日の精巣組織から採取された円形精子細胞を用いた。その結果、健康な産仔を得ることができた。これらの結果から、E12.5 精巣から、in vitro で妊孕性のある完全な精子形成を誘導できたことが示された。

(2)培養下でレトロトランスポゾンが発現しているかを調べるため、in vitro および in vivo におけるレトロトランスポゾン的一种 LINE1 の発現を比較した。まず LINE1-ORF1p に対する抗体で in vitro と in vivo の新生仔精巣を免疫染色した。その結果、培養 1 週から 2 週目にかけて LINE1 陽性細胞を含む精細管の割合は増加していた。また、胎仔精巣においても in vitro 精巣において、LINE1 の発現上昇と、LINE1 抑制遺伝子である piwi 経路構成遺伝子群の発現減少が定量 PCR によって観察された。この結果から培養下の精巣組織では、レトロトランスポゾン抑制の働きが減弱してしまい精子形成が阻害されていることが示唆された。そして RTI による in vitro 精子形成改善効果は、その脱抑制したレトロトランスポゾンの働きを抑制していることによると推察された。この仮説を証明するために、培養組織に対しレトロトランスポゾンのノックダウンを行った。ノックダウンのための shRNA 導入法だが、十分な導入効率を得られず、その方法については未だ検討中である。

本研究の当初の目標は、in vitro 精子形成においてレトロトランスポゾンの発現制御を行い、大精子形成誘導効率の大幅な改善を目指すというものであった。残念ながら、その目標までは到達することができなかったが、その過程において胎仔精巣からの in vitro 精子形成法の開発に成功することができ、一定の成果が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|------------------------------|
| 1. 著者名 Higuchi Kazusa, Matsumura Takafumi, Akiyama Haruhiko, Kanai Yoshiakira, Ogawa Takehiko, Sato Takuya | 4. 巻 105 |
| 2. 論文標題 Sertoli cell replacement in explanted mouse testis tissue supporting host spermatogenesis† | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biology of Reproduction | 6. 最初と最後の頁 934 ~ 943 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab104 | 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 Ishikura Yukiko, Ohta Hiroshi, Sato Takuya, Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Kojima Yoji, Yamashiro Chika, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Ogawa Takehiko, Saitou Mitinori | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 In?vitro reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Stem Cell | 6. 最初と最後の頁 2167 ~ 2179.e9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2021.08.005 | 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 Matsumura Takafumi, Sato Takuya, Abe Takeru, Sanjo Hiroyuki, Katagiri Kumiko, Kimura Hiroshi, Fujii Teruo, Tanaka Hiromitsu, Hirabayashi Masumi, Ogawa Takehiko | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82792-2 | 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 Matsumura Takafumi, Sato Takuya, Abe Takeru, Sanjo Hiroyuki, Katagiri Kumiko, Kimura Hiroshi, Fujii Teruo, Tanaka Hiromitsu, Hirabayashi Masumi, Ogawa Takehiko | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 3458 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82792-2 | 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 Fukunaga Hisanori, Kaminaga Kiichi, Sato Takuya, Butterworth Karl T., Watanabe Ritsuko, Usami Noriko, Ogawa Takehiko, Yokoya Akinari, Prise Kevin M. | 4. 巻 194 |
| 2. 論文標題 Spatially Fractionated Microbeam Analysis of Tissue-sparing Effect for Spermatogenesis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Radiation Research | 6. 最初と最後の頁 698-706 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-19-00018.1 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Abe Takeru, Nishimura Hajime, Sato Takuya, Suzuki Harukazu, Ogawa Takehiko, Suzuki Takahiro | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Time-course microarray transcriptome data of in vitro cultured testes and age-matched in vivo testes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Data in Brief | 6. 最初と最後の頁 106482 ~ 106482 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2020.106482 | 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 Abe Takeru, Nishimura Hajime, Sato Takuya, Suzuki Harukazu, Ogawa Takehiko, Suzuki Takahiro | 4. 巻 530 |
| 2. 論文標題 Transcriptome analysis reveals inadequate spermatogenesis and immediate radical immune reactions during organ culture in vitro spermatogenesis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 732 ~ 738 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.161 | 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, Yao Tatsuma, Katagiri Kumiko, Sato Takuya, Matsumura Takafumi, Komeya Mitsuru, Yamanaka Hiroyuki, Yao Masahiro, Matsuhisa Akio, Asayama Yuta, Ikeda Kazutaka, Kano Kuniyuki, Aoki Junken, Arita Makoto, Ogawa Takehiko | 4. 巻 34 |
| 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 9480 ~ 9497 |
| 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 Fukunaga Hisanori, Kaminaga Kiichi, Sato Takuya, Watanabe Ritsuko, Ogawa Takehiko, Yokoya Akinari, Prise Kevin M. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 The Tissue-Sparing Effect of Spatially Fractionated X-rays for Maintaining Spermatogenesis: A Radiobiological Approach for the Preservation of Male Fertility after Radiotherapy | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine | 6. 最初と最後の頁 1089 ~ 1089 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9041089 | 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 該当する |

〔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 西田麻由香、佐藤卓也、小川毅彦 |
| 2. 発表標題 胎仔マウス精巢を用いたin vitro精子形成 |
| 3. 学会等名 第27回日本生殖内分泌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>雄性生殖細胞の全分化過程の試験管内再構成に成功 https://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/202109ogawa_stem.html</p> |
|---|

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 | 古目谷 暢 (Komeya Mitsuru) (60721082) | 横浜市立大学・医学部・助教 (22701) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|--|---------------------------------|----|
| 研究協力者 | 小倉 淳郎 (Ogura Atsuo) (20194524) | 国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・室長 | |

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 |
|---------|---------|
| | |