

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390371

研究課題名(和文) 器官培養法を用いたヒト in vitro 精子形成法の開発

研究課題名(英文) In vitro human spermatogenesis using an organ culture method

## 研究代表者

小川 毅彦 (OGAWA, Takehiko)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：50254222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは2011年にマウス精子形成を体外で進行させ、精子産生に成功した。本研究において、その培養法と培養条件をヒト精巣組織に応用したが、これまでヒト精子形成の進行は確認できていない。そこで培養法・培養条件の根本的な見直し作業を行った。それらの結果、現在ではマウス精子形成誘導に必要な多くの因子が明らかになってきた。またマイクロ流体システムを導入したことで、いままでは2か月が限界であったマウス精子形成を、6か月以上に亘って維持することに成功した。引き続き培養条件の改良を継続することにより、ヒト in vitro 精子形成を達成したい。

研究成果の概要(英文)：Using an organ culture method, we succeeded in producing sperm from spermatogonial stem cells in the mouse testis tissue ex vivo for the first time in the world. Based on this achievement, we tried to induce human spermatogenesis in the same manner. We found, however, that simple application of the method to human samples did not result in spermatogenic progression. Thus, we started to examine the culture conditions in detail for its improvement. For one thing, we tried to formulate chemically-defined medium which is sufficient for mouse spermatogenesis, which now become partially possible. In addition, we thought it is also important to mimic the in vivo condition by introducing microcirculatory system. Thus, we introduced microfluidic system into our culture method, which is also effective to improve the overall culture condition. These modifications are promising for future establishment of in vitro human spermatogenesis.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：精子形成 器官培養 男性不妊症

1. 研究開始当初の背景

2011年、私たちは新生仔マウスの精巣組織片を培養し、精子幹細胞から精子を産生することに成功した。この精子を用いて顕微授精し、健康な産仔を得ることに成功した。In vitro において精子幹細胞から妊孕能をもつ精子を産生した世界初めての成果であった。この成果を医学応用に発展させることを目的に、2012年に本研究はスタートした。すなわち、精巣組織の器官培養によりヒト精子形成を体外で再現する試みである。

2. 研究の目的

マウスで成功した精巣組織の器官培養法をヒト精巣に応用し、ヒト精子形成を in vitro において可能にすることを目的とした。それにより、ヒト精子形成の詳細と精子形成障害の病態を解明する手がかりを得られると考えた。

3. 研究の方法

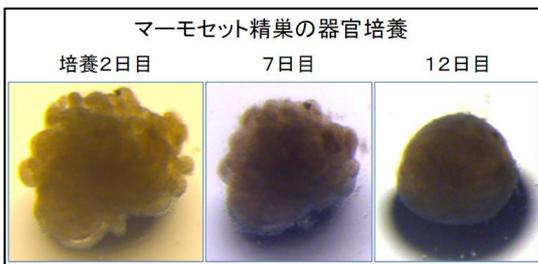
精巣組織片(約1mm<sup>3</sup>大)をアガロースゲル上に乗せて、培養液が組織片を薄く覆うようにしてインキュベーター内で34℃で培養した。培養液は1週間毎に交換した。ヒト精巣組織は、精巣内精子採取術の際の生検組織の一部、および精巣腫瘍の手術検体の一部を用いた。マーモセット精巣は、実験動物研究所の佐々木研究員から提供していただいた。精子形成減数分裂時にGFPが発現するGsg2-GFPトランスジェニックラットを作成し、培養実験に用いた。

実態顕微鏡で、継続的に観察を行い、組織標本を作製して、精子形成の進行度を評価した。

4. 研究成果

ヒト精巣組織を用いた in vitro 精子形成は未だ成功していない。いくつかの点で、これは非常に難易度が高い目標であることが明らかになってきた。しかし、本研究を遂行してきた中で、研究上の重要な発見と進展が得られた。以下のそのことを概説する。

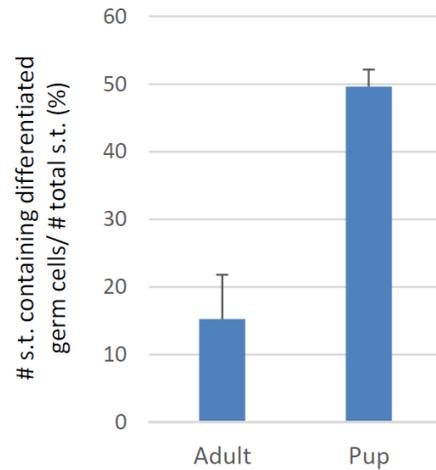
(1)ヒト臨床検体を用いた培養実験では、組織片は培養開始1~2週間の間に球状に変化し、組織学的には高度の線維化を生じていた。この現象は、ヒト精巣組織のみならず、マーモセット精巣を用いた際にも観察された(下図)。一方、マウスやラットの精巣組



織片を用いた際には観察されなかった。このことから、ヒト精子形成を器官培養法を用いて達成するためには、この組織線維化を制御

することが重要であることが明らかとなった。

(2)ヒト精巣組織を用いた培養実験では、主として成人の精巣組織片を用いることになるが、in vitro 精子形成は成熟した精巣組織片を用いると非常に困難であることも明らかとなった。その点の詳細を明らかにするために、成熟マウスの精巣組織を用いた実験を行った。成熟マウス精巣ではすでに精子形成が十分に進行しているため、精巣内の精子形成細胞を除去し、培養実験に用いたところ、効率は劣るものの成熟精巣においても精子形成誘導が可能であることを確認できた(下図)(T. Sato, PLoS ONE, 2015)。



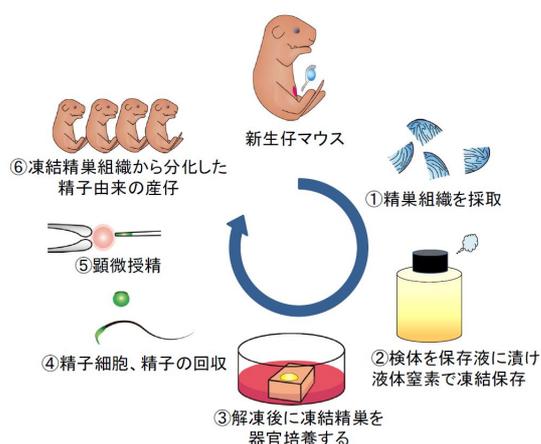
(3)マウス精子形成に成功した培養液は、MEMを基礎培地とし、KSRを10%、もしくはAlbMAXを40mg/mlの濃度で加えたものである。まったく同じ培養液を用いて、ヒト、マーモセット、ラットの精巣組織片を培養しても精子形成は期待されたようには進行しなかった。特に、ラットでさえも精子産生できないことが実験を繰り返して明らかになった。すなわち、マウス精巣には有効だった培養液組成はラットでは不適となった。そこで、KSRやAlbuMAXといった含有物が明らかでない市販品を使うことなく、化学組成の明らかな培養液でマウス精子形成の誘導を可能とし、その組成の改良を通じて、各種動物のそれぞれに最適な培養液を作ってゆくことを目標として実験を継続した。現在のところその試みは完成していないが、生後数日後の仔マウスの精巣組織片を用いた際には、化学組成の明らかな培養液での精子形成誘導に成功している(未発表)。今後もその検討を続けてゆく。

(4)精巣組織を器官培養して精子形成を誘導することは、将来的に男性不妊症の治療につながる可能性を秘めている。そのことを示すモデル実験を行った。Steelマウスはセルトリ細胞が細胞膜上に産生するKitL(KitL)が欠損している。私たちは、Steelマウスの精巣組織片を器官培養し、培養液中に多量のKitLを添加することで精子形成誘導と精子産生に成功した。産生された半数体を用いて顕微授精による産仔にも成功した。こ

れは、精巣組織の器官培養法で精子形成障害が治療できる可能性があること証明した例である ( T. Sato, *PNAS*, 2012 )



( 5 ) 精巣組織の器官培養は、精巣組織片を凍結保存できることで、その応用に大きな幅を得ることができる。マウス精巣組織片を凍結保存し、解凍後に in vitro 精子産生することによってそのことを証明することを行った ( T. Yokonishi, *Nat. Comm.* 2014 )



## 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 11 件 )

\*T. Sato, T. Sakuma, T. Yokonishi, K. Katagiri, S. Kamimura, N. Ogonuki, A. Ogura, T. Yamamoto, \*T. Ogawa. Genome editing in mouse spermatogonial stem cell lines using TALEN and double-nicking CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports* 査読有 accepted for publication 誌上発表予定日 July 18, 2015

T. Sato, K. Katagiri, K. Kojima, M. Komeya, M. Yao, \*T. Ogawa. In vitro spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues. *PLoS One* 査読有 vol.10, 2015, No.6, e0130171, doi: 10.1371/journal.pone.0130171.

M. Komeya, \*T. Ogawa. Spermatogonial stem cells: Progress and prospects. *Asian J Androl.* 査読有 May 18, 2015 doi: 10.4103/1008-682X.154995. [Epub ahead of print]

T. Yokonishi, T. Sato, M. Komeya, K. Katagiri, Y. Kubota, K. Nakabayashi, K. Hata, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, \*T. Ogawa. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nature Communications* 査読有

No.5, 2014, pp. 4320.

doi: 10.1038/ncomms5320.

T. Sato, K. Katagiri, Y. Kubota, \*T. Ogawa. In vitro sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. *Nature Protocol* 査読有 No.8, 2014, pp. 2098-2104

doi: 10.1038/nprot.2013.138.

古目谷 暢、小川毅彦 : 「精子幹細胞」 Hormone Frontier in Gynecology 査読無 vol.21, No.2, 2014, pp.131-136.

横西哲弘、小川毅彦 : 「精巣組織の凍結保存」臨床産婦人科 査読無 vol.68, No. 1, 2014, pp54-63

佐藤卓也、横西哲弘、小川毅彦 : 「精子幹細胞と精子形成 : ex vivo culture の可能性」実験医学 査読無 vol.32, No.6, 2014, pp. 859-864

T. Yokonishi, T. Sato, K. Katagiri, M. Komeya, Y. Kubota, \*T. Ogawa. In Vitro Reconstruction of Mouse Seminiferous Tubules Supporting Germ Cell Differentiation. *Biol Reprod.* 査読有 No.89, 2013, pp.1-6

<http://www.biolreprod.org/content/89/1/15.long>

T. Yokonishi, T. Sato, K. Katagiri, \*T. Ogawa. In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. *Methods Mol Biol.* 査読無 No. 927, 2013, pp. 479-488

[http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-038-0\\_41](http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-038-0_41)

T. Sato, T. Yokonishi, M. Komeya, K. Katagiri, Y. Kubota, S. Matoba, N. Ogonuki, A. Ogura, S. Yoshida, T. Ogawa. Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有 No.109, 2012, pp. 16934-16938

doi: 10.1073/pnas.1211845109.

[ 学会発表 ] ( 計 13 件 )

T. Ogawa: "In Vitro Spermatogenesis using Organ Culture Systems" Keynote Lecture IFFS/JSRM, 29th Apr., 2015, Pacifico Yokohama ( 神奈川県 ) Japan. Invited Speaker

小川毅彦 : 「 ex vivo culture による体外精子形成 」記念講演 第 10 回日本生殖再生医学会 2015 年 3 月 22 日 メルパルク京都 ( 京都府 )

T. Ogawa, T. Sato, K. Katagiri, K. Kojima: "in vitro spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues" Gordon Research Conference, Mammalian Reproduction" Aug. 10-16, 2014, Colby Sawyer College, New Hampshire (USA)

T. Ogawa: "In vitro spermatogenesis using an organ culture system" The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and

Sterility, Nov. 13, 2013, 神戸国際会議場 (兵庫県), Japan. Invited Speaker  
T. Ogawa: “*In vitro* maturation of sperm”, 59th Annual meeting of Canadian Fertility and Andrology Society, 28th Sep., 2013, Victoria (Canada). Invited Speaker  
T. Ogawa: “*In vitro* spermatogenesis using an organ culture method”. 10th International Congress of Andrology 10th International Congress of Andrology, 25 February 2013, Melbourne (Australia). Invited Speaker  
小川毅彦: 「Induction of spermatogenesis in testis of c-Kit ligand mutant spermatogenic failure mice using Organ Culture method」韓国生殖医学会 63rd Congress of Korean Society for Reproductive Medicine December 1st, 2012、Seoul Women’s University (韓国)  
小川毅彦: 精巢組織培養法は無精子症を治療できるか シンポジウム 2 「無精子症の取り扱いに関する問題と展望」平成 24 年 11 月 8 日 (木) 日本生殖医学会学術講演会 長崎ブリックホール (長崎)  
T. Ogawa: *In vitro* spermatogenesis using an organ culture method. Meeting GDRI “Mammalian Meiosis Network” October 11-12th, 2012, La Maison du Séminaire, Nice (France).  
小川毅彦: 「精子幹細胞からの培養下精子形成」日本受精着床学会シンポジウム 「基礎 ( 1 ) 精子幹細胞のバイオロジーとその応用」2012 年 8 月 30 日 大阪国際会議場 (大阪)  
T. Ogawa: *In vitro* spermatogenesis using an organ culture method. The 58/60<sup>th</sup> NIBB symposium, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県) Japan, 21<sup>st</sup> July, 2012  
T. Ogawa, State-of-the-Art Lecture 1 “Testicular tissue culturing inducing complete spermatogenesis” The 7<sup>th</sup> AUA/JUA international affiliate society meeting, May 20, 2012, Georgia World Congress Center, Atlanta (USA)  
小川毅彦: 「*In vitro* 精子形成法の開発と不妊症診療への応用の可能性」第 100 回 日本泌尿器科学会総会 SY2-5 「男性不妊症に対する新たな挑戦」2012 年 4 月 22 日パシフィコ横浜 (神奈川県)

〔図書〕(計 1 件)

T. Ogawa: *In vitro* production of functional sperm from neonatal mouse testes, Chapter 4 in “Stem Cells in Reproductive Medicine, 3<sup>rd</sup> edition” edited by Carlos Simon, Antonio Pellicer, & Renee Reijo Pera. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 2013, pp. 46-51.

〔その他〕

研究室のホームページ:

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/pr>

[oteome/ogawa/index.html](http://oteome/ogawa/index.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小川 毅彦 (OGAWA, Takehiko)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授  
研究者番号: 50254222

(2) 連携研究者

佐藤 卓也 (SATO, Takuya)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教  
研究者番号: 70599505