

精巣器官培養とホルモン

横浜市立大学・生命医科学研究科 教授 小川毅彦

はじめに

精子形成を体外（培養下）で再現する試みの歴史は古いが、成功例は乏しい。その難しさの理由は幾つかある。精子幹細胞から精子産生まで、マウスでは35日間、ラットでは42日間、ヒトでは74日間という長期間を要すること。精原細胞の段階では増殖し、精母細胞では減数分裂を行い、精子細胞（半数体細胞）はダイナミックな形態変化を遂げ、核タンパクを置換して精子になる、というように異なる種類の細胞変化が連続的に、かつ近接した環境で行われること。さらに、それらの変化は生殖細胞のみでは完遂できず、支持細胞としての体細胞（特にセルトリ細胞）が必要であること、等である。そのような複雑な分化過程を支える微小環境を、人工的に構築することは容易ではない。それ故、今なお精子形成の体外での再現は限定的なものに留まっている。

私たちは器官培養法を用いてマウス精子形成の *in vitro* 再生に成功した。また化学組成の明らかな培養液を用いての研究により、精子形成に重要な因子の探究を行っている。その成果と課題を概説する。

Key words : 精子形成、器官培養、マイクロ流体システム

器官培養法の発展

精巣組織器官培養の研究は、約1世紀前にその起源があり、そこには紆余曲折の歴史がある¹⁾。器官培養法が大きく進展したのは1960年代であり、それを精子形成研究に応用した Steinberger 夫妻の功績は大きい。しかしながら、彼らの方法においても減数分裂パキテン期を越えて精子形成が進行することは無かった²⁾。1980年代以降は分子生物学的手法の発展・普及と相まって、遺伝子発現を頼りに精子形成を評価し、生殖細胞への遺伝子導入等の操作が試みられたが、これらの技術的革新の *in vitro* 精子形成への貢献は限定的であったと考えられる。

2007年、私たちは器官培養法に再注目し、マウス精巣器官培養の実験を開始した。1 mm³程度の精巣組織片を気相液相境界面で培養することで栄養と酸素供給のバランスを取り、組織の構造と機能を維持することを期待した(図1)。

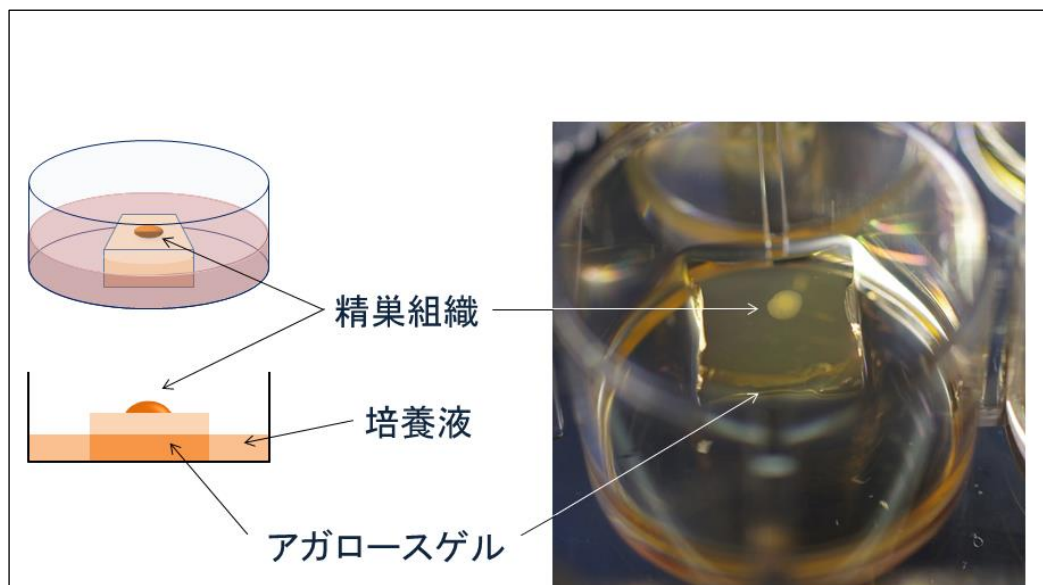


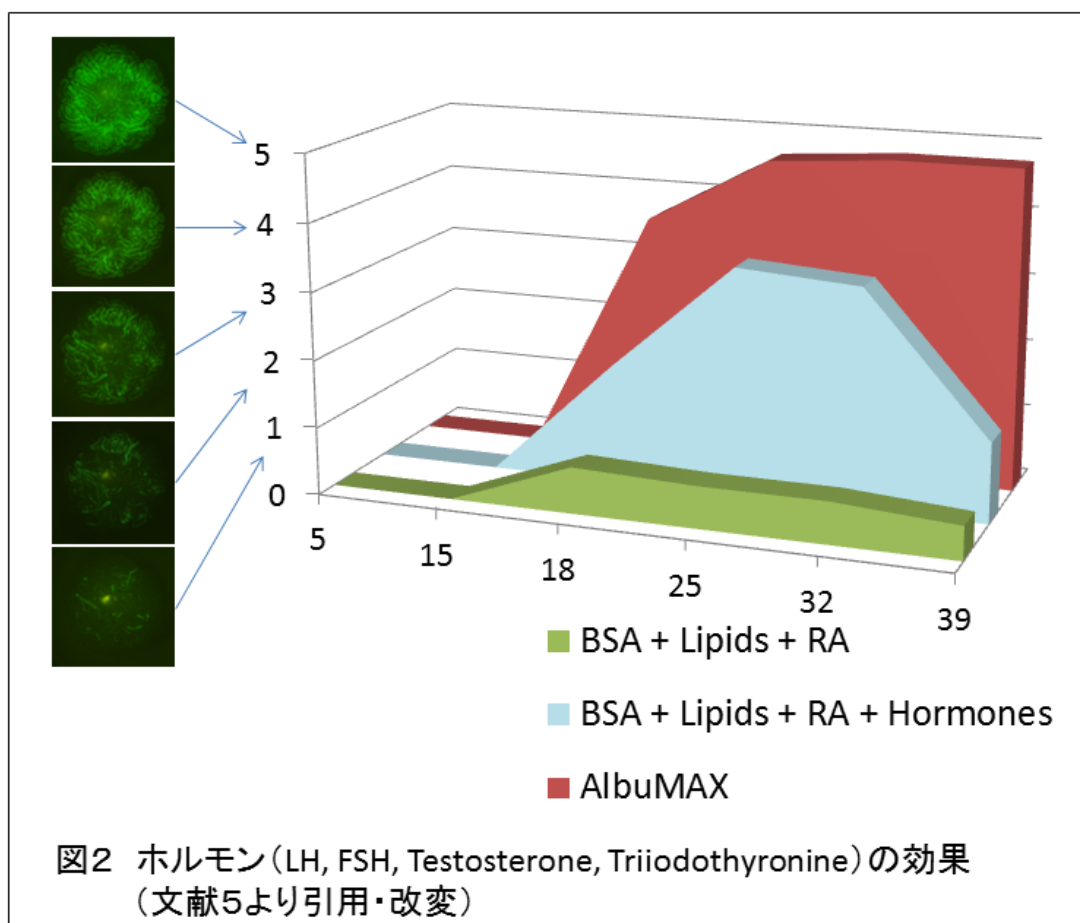
図1 気相液相境界面培養法(アガロースゲル培養法)

培養実験の主流である細胞培養法ではなく、古典的な器官培養法を用いることは、時代の先端とは言えないが、精子形成が生殖細胞だけで成り立つものではなく、セルトリ細胞、精細管周囲筋様細胞、ライディッヒ細胞等の支持細胞が重要な役割を果たしていることを考えれば、当然の選択であったとも思える。

マウス精巣組織片を用いた *in vitro* 精子形成において、培養液に加える添加物として最も重要なものは、血清であった。私たちは基礎培地 (α MEM) にウシ胎仔血清 (FBS) を 10% 加えた培養液で仔マウス精巣組織片を培養し、円形精子細胞の出現を確認することができた³⁾。更なる進展を目指して、その培養液に LH、FSH、テストステロン、等のホルモンを添加し、実験を繰り返した。しかし、成績の向上には繋がらなかった³⁾。すなわち、*in vitro* 精子形成において、それらのホルモンには精子形成を促進する効果は確認できなかった。実は、過去の報告においてもホルモンが精子形成に及ぼす影響に関しては、効果ありとする報告と無いとする報告があり、結論は

得られていない。コントロールに用いる培養液に血清等が含まれている場合は、すでにホルモンの混入があると考えられるので、追加するホルモンの効果を評価することが困難になる。また、使用する動物種やその日齢等によってもホルモンの効果は影響を受けると考えられる。さらに、*in vitro* 精子形成が完成していない以上、ホルモンの効果をどのように評価するかという根本的な課題がある。そのような事情から、培養環境下におけるホルモンの精子形成に及ぼす影響には、一定の結論が得られていないということになる。

α MEM+10%FBS という当時のベスト培地を超える成果を挙げる事ができず、実験は停滞したが、最終的に辿り着いた重要な添加物は、AlbuMAX という血清アルブミン製剤であった。AlbuMAX を加えた培養液 (α MEM +AlbuMAX 40mg/ml) を用いた場合は、精子幹細胞が精子まで分化し、顕微授精により健康な産仔が得られた⁴⁾。基礎培地である α MEM に AlbuMAX 以外のものは加えてないので、AlbuMAX の中には、精子形成を開始させ、精子産生まで誘導する重要な因子がすべて含まれているということになる。ところで、ウシ血清アルブミン (BSA) には3つの精製法がある。低温エタノール法、熱処理法、クロマトグラフィー抽出法である。AlbuMAX はクロマトグラフィー抽出法で精製された BSA である。その後の検討から、BSA の中で精子形成誘導能を持つのは、クロマトグラフィー抽出法で精製された BSA のみであり、低温エタノール法と熱処理法で精製された BSA には精子形成誘導能は無いことが分かった。このことから、アルブミン自体に精子形成誘導活性があるのではなく、精製過程でアルブミンと一緒に抽出される分子 (群) に活性の本体があると推測される。残念ながら、そのような分子の詳細は未だ明らかではない。一方で私たちは、AlbuMAX に頼らずに、化学組成の明らかな物質を加算して新しい培養液 (Chemically-Defined Medium; CDM) を作製し、その精子形成誘導効率を調べる実験も行っている。CDM での培養実験の結果、ビタミン A が精子形成の開始に必須であることを確認し、脂質が重要であることを見出した⁵⁾。また、4種類のホルモン (LH、FSH、テストステロン、T3) を加える実験を行ったところ、精子形成効率が有意に向上することを見出した (図 2)。その効果は劇的であり、あらためてホルモンの力を思い知った。勿論、それらのホルモンはいずれも精子形成に関与することが報告されており、新しい発見ではない。しかしながら、*in vitro* 精子形成を CDM で行う系を開発したことで、*in vitro* においてそれらの効果を確認することができた。

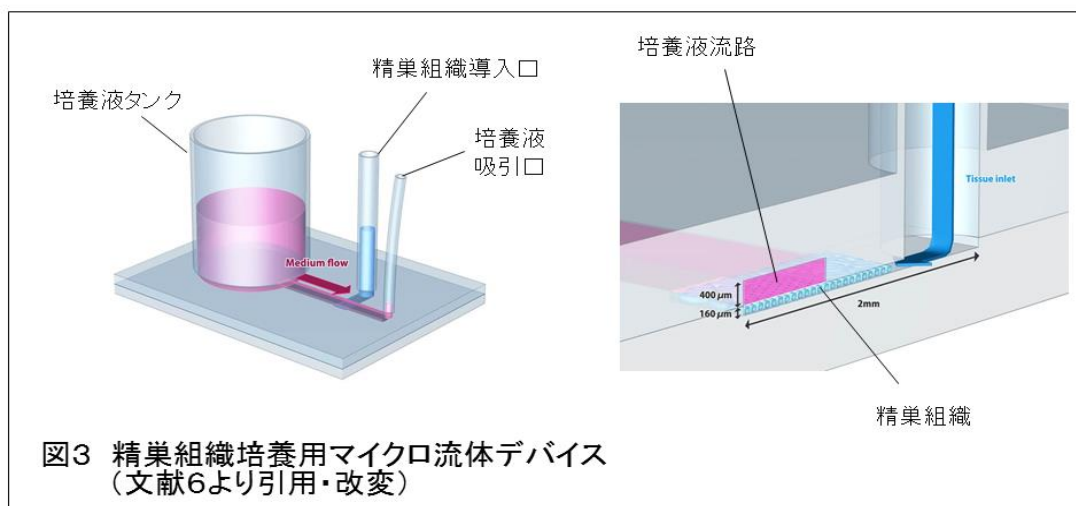


このように CDM を用いて *in vitro* 精子形成を進行させることはできたが、その効率や持続期間は、AlbuMAX 培地と比較すると格段に劣っている。特に、日齢の若いマウスの未熟な精巣を用いた場合には、CDM では精子形成は誘導できない。AlbuMAX の中に在る精子形成を強く誘導し、且つ維持する未知の因子（群）を同定することが今後の重要な課題であり、それらとホルモンの関係も興味深い。

新しい培養システムの開発

培養液の改良により *in vitro* 精子形成の進展を目指す一方、私たちは培養法そのものの見直しも行っている。器官培養法のゴールドスタンダードは、気相液相境界面培養法であり、私たちの培養法もそれに則っている。しかし、その微小環境は、生体内の精巣の状況と大きく異なっているのも事実だ。精巣において毛細血管は間質を網目状に張り巡らされており、精細管に

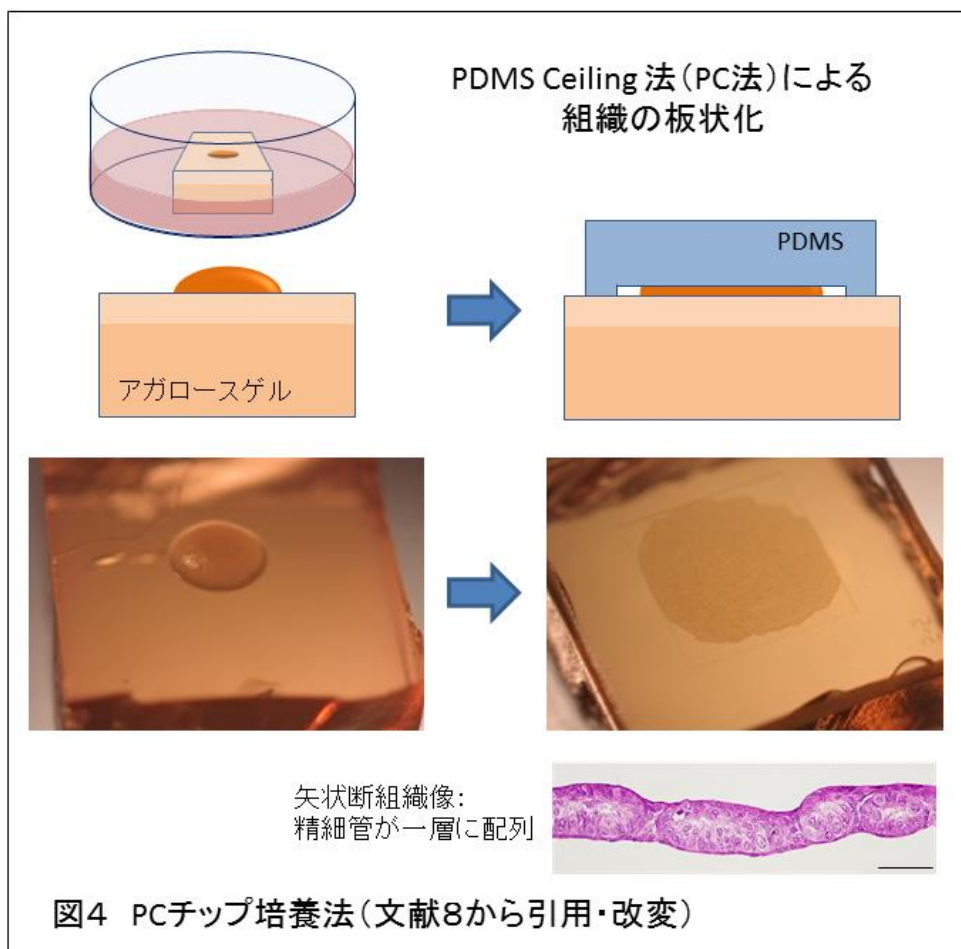
はその網の目のような毛細血管が巻き付いている。それ故、毛細血管が運ぶ血液から酸素と栄養成分が拡散して精細管に届く距離はせいぜい数十 μm という至近距離である。また、酸素はヘモグロビンが運んできて、過不足なく供給される。この理想状態に少しでも近づけるために、私たちはマイクロ流体システムを導入し、精巣組織培養に応用した^{6,7)}。精巣の被膜である白膜を剥離すると、精細管を障害することなく2次元に広げることが可能である。マイクロ流体デバイスの試料スペースに精細管を1~3層に広げて充填することにより、栄養の供給を組織全体に届けることが可能であった(図3)。また、マイクロ流体デバイスの素材は、シリコーン樹脂(Polydimethylsiloxane; PDMS)であり、PDMSは培養液よりも酸素の透過性が約20倍高い。この利点からデバイス内の組織は直接外気に触れなくても、PDMS越しに酸素を得ることができる。



このようにして、私たちは、精巣組織用のマイクロ流体デバイスを作製し、その中でマウス精巣組織を培養する実験を行った。その結果、精子形成が効率良く誘導されたばかりでなく、アガロースゲル上の培養よりも長期間に亘って精子形成は維持できることが明らかとなった⁶⁾。さらに培養液を流して培養していることを活かし、組織が産生するテストステロンを測定すると、通常の前立腺組織同様にテストステロンは産生されており、かつLH刺激に反応してその産生は上昇した。これらの結果は、マイクロ流体デバイス内の環境は生体内環境により近似したものになっていることを示している。

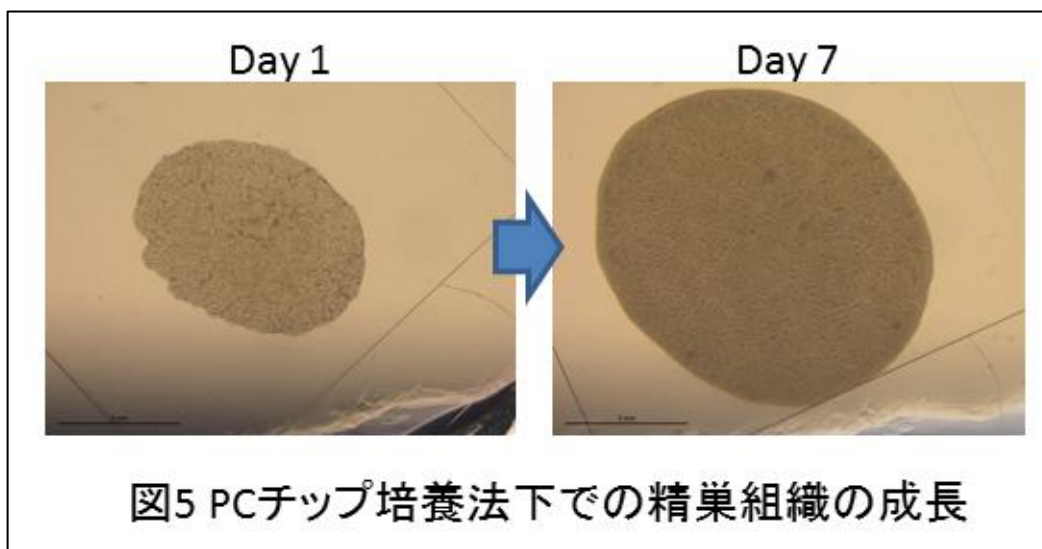
PDMS Ceiling (PC) チップ法

マイクロ流体デバイスを器官培養法に応用した経験から、組織片を平板状にして培養することの意義を実感した。そこで、より簡便な培養法として PDMS Ceiling 法を思いついた (図 4)。



上述した如く PDMS は酸素の透過性がよい。この PDMS を板状にし、片面に 60~180 μm の窪みを施したチップを作製した。アガロースゲル上の組織片に PC チップを被せると、窪みの中で組織片は平板状に広がり、底面のアガロースゲルから栄養分を、上面の PDMS から酸素を得ることができると分かった。そのように培養した新生仔マウス由来の精巣組織片は日毎に成長し、その円盤状形態の厚さはそのままに、面積のみが顕著に拡大した (図 5)。さらに、その成長は培養液の成分に大きく依存した。これまで調べた結果から、FSH とインスリンという二つのホルモンは PC チップ培養

下で精巣を優位に増大させた⁸⁾。いずれのホルモンもこれまでの研究から *in vivo* において精巣の成長を促進する効果があることが報告されている。



しかし、同様の効果を *in vitro* で確認した報告はない。その意味で、PCチップ法は精巣組織の成長を *in vitro* で再現し、ホルモンの効果も再現できたことになる。通常の3次元培養において組織が球状に成長した場合、直径1mmを超えると中心部には栄養や酸素が届かないことから、成長・増大には限界がある。PCチップ法はその限界を超えた大きさまで組織片を成長させることが可能であり、発生学や組織再生の研究に貢献できると思われる。

おわりに — 理想的な培養液を目指して

精子形成におけるホルモンの重要性とその意義は、これまで数多くの研究がなされており、生殖内分泌学は確立された学問としての位置づけがなされている。しかしながら、精子形成の複雑さ故に、その分子メカニズムは未解明の部分が多く残されている。

α MEM に AlbuMAX を加えただけの培養液で、マウス精子形成を器官培養下に再現できることは、精子形成に必要な因子がこの培養液内にすべて含まれていることを意味する。しかしながら、この培地が完璧ではないことも確かである。実際、 α MEM + AlbuMAX の培養液では、マウス精子形成は完遂できるものの、ラット精子形成は完遂できない。CDM を用いて、重要因子をひとつひとつ同定することで *in vitro* 精子形成は今後も発展してゆく

ことが期待される。精子形成におけるホルモンの効果・影響の詳細も明らかになってゆくと思われる。

【参考文献】

- 1) Komeya M, Sato T, Ogawa T. In vitro spermatogenesis: a century-long research journey, still half way around. *Reprod Med Biol.* 2018; 00: 1–14. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12225>
- 2) Steinberger A & Steinberger E. Tissue culture of male mammalian gonads. *In Vitro*, 1970; 5: 17-27.
- 3) Gohbara A, Katagiri K, Sato T, Kubota Y, Kagechika H, Araki Y, et al. In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system. *Biol Reprod.* 2010;83:261–7.
- 4) Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011;471:504–7.
- 5) Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, Ino Y, Arakawa N, Hirano H, Yao T, Asayama Y, Matsuhisa A, Yao M, Ogawa T. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS One.* 2018;13:e0192884.
- 6) Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci. Rep.* 2016;6:21472.
- 7) Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, et al. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Sci Rep.* 2017;7:15459.
- 8) Kojima K, Nakamura H, Komeya M, Yamanaka H, Makino Y, Okada Y, Akiyama H, Torikai N, Sato T, Fujii T, Kimura H, Ogawa T. Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ-spreading. *Biotechnol Bioeng.* 2018 Aug 25. doi: 10.1002/bit.26822. [Epub ahead of print]