

— 総説 —

特集：卵子学会トピックス 2018

化学組成の明らかな培養液を用いた体外精巣組織培養法 *In vitro* spermatogenesis using chemically defined media

三條 博之¹・小川 毅彦^{2*}

Hiroyuki Sanjo¹ and Takehiko Ogawa^{2*}

¹横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学 〒236-0004 横浜市

²横浜市立大学生命医科学研究科 創薬再生科学 〒236-0004 横浜市

¹Department of Urology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004, Japan

²Laboratory of Biopharmaceutical and Regenerative Sciences, Institute of Molecular Medicine and Life Science, Yokohama City University Association of Medical Science, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004, Japan

要旨：我々は2011年に新生仔マウス精巣組織片をアガロースゲル上で培養（器官培養）し、牛血清由来アルブミン製剤であるAlbuMAXを培養液に加えることで精原細胞から妊孕能のある精子産生に成功した。しかし、AlbuMAX中の何がそのような効果を生むのかは不明のままである。我々は精子形成に必要な因子群を同定するために、基礎培養液に各種因子を添加して培養する実験を行った。その結果、レチノイン酸、4種類のホルモン（LH, FSH, T, T₃）、さらに脂質として遊離脂肪酸、コレステロール、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンを添加した培養液でマウス精子形成の誘導が可能であること示した。その研究結果ならびにこれまでの報告をもとに精子形成に関する化学物質について考察する。

キーワード：精子形成, 精巣, 器官培養, レチノイン酸, テストステロン

Abstract: We reported in 2011 the successful induction and completion of mouse spermatogenesis by culturing immature testis tissues using a culture medium comprising α -minimum essential medium (α -MEM) supplemented with 4% AlbuMAX, bovine serum albumin purified by chromatography. Sperm and spermatids obtained in that culture were used for micro-insemination, resulting in the production of healthy offspring. However, the ingredients in AlbuMAX which played a role in inducing spermatogenesis were not clear. In order to identify the important factors for spermatogenesis, chemically-defined media (CDM) were formulated. CDM containing retinoic acid, hormones (LH, FSH, T, T₃), and lipids including free fatty acids, cholesterol, phosphatidylcholine, and sphingomyelin, were competent in inducing spermatogenesis. In this short review, we discuss factors and substances necessary for spermatogenesis.

Key words: Spermatogenesis, Testis, Organ culture, Retinoic Acid, Testosterone

精子形成の研究を行うための実験系

現代社会において不妊症の診断基準を満たすカップルは6組に1組存在するといわれている。男性側に不妊の原因がある場合は約50%とされ、この問題の解決のためには基礎研究が重要であることはいうまでもない。しかし、男性不妊症の研究を基礎研究として行うことにはいくつかの困難が付きまとう。男性生殖機能の根幹は精子形成であるが、まず適切なモデル動物（精子形成障害動物）が少ない。マウス等

（受付 2020年1月10日／受理 2020年1月16日）

別刷請求先：〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦3-9

横浜市立大学生命医科学研究科 創薬再生科学

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: ogawa@yokohama-cu.ac.jp

の実験動物は基本的に繁殖力が旺盛であり、男性不妊患者のモデルにはなりがたい。遺伝子改変マウスのなかには精子形成不全を示すものは少なくないが、それらのほとんどすべてはヒト男性不妊のモデルにはなり難い。男性不妊症患者の原因はほとんど不明であり、単一遺伝子の原因というよりは、後天的・外的要因も含めて多因子によると考えられる。動物実験が成り立たない以上、ヒト精巣組織や精巣細胞を用いた *in vitro* 系が実験系として期待されるが、ヒト精子形成を体外で再現したという報告はない。そもそも実験動物を用いた研究においても精子形成の培養下での再現は難しく、部分的な再現に留まっていた。私たちは培養系において精子形成を再現することが精子形成不全の研究には必須であるとの認識から、マウスの精巣組織を用いた器官培養実験に取り組み、体外精子形成に成功した¹⁾。哺乳類の精子形成を体外で再現することは過去に成功例がなく、また体外で産生された精子(精子細胞)から産仔を得たことも始めてのことであった。

器官培養での精子形成

In vitro 精子形成の研究には100年の歴史がある²⁾。この歴史のなかで、Steinberger夫妻によって成された1960代の研究の数々は際立っている。夫妻は当時開発されて間もない器官培養法を用いてラット精巣組織片を培養し、未熟な精原細胞から減数分裂前期パキテン期まで精子形成が進行することを示した。培養環境は、人工的であるが故に自由度が高いが、その反面、その環境設定には一つのミスも許されない。例えば、栄養素はバランスよく配合されなければならない。必須因子は一つも欠かしてはならない。pH、浸透圧、温度、酸素、二酸化炭素、等々も適切に管理されなければならない。こういった細々とした条件を夫妻は丁寧に調べ上げ、最適な培養液・培養環境の作成に取り組んだ。当時もホルモンが果たす役割が注目されており、FSHやHCGを培養液に添加して、その効果が調べられているが、精子形成を促進する効果は認められていない。その他、特別な栄養素として精子形成推進に効果があったものとしては、Vitamin A, E, C, glutamine を挙げており、減数分裂パキテン期までの分化は進んだと報告している³⁾。しかし、パキテン期以降の分化を誘導することはできず、減数分裂の壁、あるいはパキテン期の壁のようなものが存在し、人工的な培養条件下では越えがたいと考えられた。我々は夫妻の研究を追試する過程で基礎培地への添加物をFBSではなく、血清代替物であるKSR、もしくはKSRの構成要素であるAlbuMAXに代えたところ、マウス精子形成が格段に進行することを発見した。実際、 α MEMにAlbuMAX (40 mg/ml)を加えた培養液では、精子幹細胞から精子産生までを培養下で再現できることが分かった。得られた精子あるいは精子細胞を用いて顕微授精すると、健全な産仔が得られた¹⁾。この成果は、世界中の複数の研究者により追試されている。

AlbuMAXとは何か？

AlbuMAXは牛血清アルブミン(BSA)製剤であり、その純度は97%である。通常、BSAの精製にはコーン法と呼ばれる低温エタノール処理が用いられるが、AlbuMAXの作製にはコーン法ではなく、クロマトグラフィーが用いられている。エタノールを用いないことから、AlbuMAXには脂質を主として様々な血清由来の物質が混在していると考えられる。基礎培地の α MEMにAlbuMAXを添加しただけの培養液で精子形成誘導でき、しかも6か月にわたってその精子形成を維持できることから、AlbuMAXのなかには精子形成に必要なすべての因子が含まれていると考えられる。それらを同定することは非常に意味のあることであるが、困難な作業であることが予想された。例えば、現在のオミックス技術を用いればAlbuMAX中の物質群の多くを同定することができるだろう。しかし、それらは膨大な数に及ぶことが予想され、一つひとつ検定することは現実的ではない。そこで我々は、AlbuMAX中の物質群をしらみつぶしに同定することは先送りし、精子形成に重要なことがすでに知られている因子群を添加した合成培地を作ることにした。

合成培地での培養実験

精子形成に重要な役割をしている因子はいくつか知られている。下垂体の性腺刺激ホルモン(LH, FSH)、テストステロン、レチノイン酸、等である。実際、AlbuMAX中にもテストステロンとRAは検出され、これらの物質は必須因子である。さらに、AlbuMAXには多くの脂質が含まれていることが知られており、それを調べた論文もある。その情報をもとに、コレステロール、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、5種の脂肪酸(パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸)を選択した。それらの因子を含む培養液を作製し、器官培養実験を繰り返した。その結果、表1に示す組成の培養液は、マウス精子形成を誘導できることを明らかにした⁴⁾。

下垂体ホルモン(LH, FSH)とテストステロン

精子形成の開始には、下垂体ホルモンが重要な役割を果たすことはよく知られている。血中LHの上昇は精巣のLeydig細胞に働き、テストステロンを産生・分泌させる。精巣内の高濃度なテストステロンは、セルトリ細胞に働き、精子形成を開始させると考えられてきた⁵⁾。Leydig細胞からはテストステロン以外の物質(例えばCSF-1等)も分泌されるが、LHの作用はテストステロンでほぼ代用できるとされている。GnRH欠損マウスにおける実験では、テストステロンを投与することで精子形成が誘導されるからである⁶⁾。テストステロンはセルトリ細胞内のアンドロゲン・レセプター(AR)に結合し、転写因子として様々な遺伝子の発現を誘導する。テストステロンの働きを調べるためにAR遺伝子を改変した実験が数多くなされてきた。全身の細胞でARを欠損したマウスは、全身が雌化するため陰嚢は発達せず、精巣は

表1 合成培地の化学組成

ウシ血清アルブミン	Et-BSA (A9418)	40 mg/ml
ビタミンA	Retinoic acid	1 μ M
	Retinol	1 μ M
ホルモン	LH	1 ng/ml
	FSH	1 ng/ml
	Testosterone	1 μ M
	Triiodothyronin	2 ng/ml
遊離脂肪酸	Stearic acid	600 μ M
	Palmitic acid	600 μ M
	Oleic acid	600 μ M
	Linoleic acid	100 μ M
	Linolenic acid	50 μ M
その他の脂質	Cholesterol	3.2 μ M/ml
	Phosphatidylcholine	20 μ M/ml
	Sphingomyelin	3.5 μ M/ml

基礎培地は α -MEM.

腹腔内に留まる。精子形成は生じないが、それはAR欠損の直接的な影響というよりも、腹腔内精巣故の結果であると考えられる。一方、セルトリ細胞特異的AR欠如では精子形成はDiplotene期で停止する⁷⁾。つまり、Diplotene期以降への分化にはテストステロンが必須であり、その作用はセルトリ細胞を介してしているということである。逆にいえば、精子形成の開始や減数分裂への導入にはテストステロン-ARの系は関与していないことが示唆される。筋様細胞特異的AR欠損マウスやLeydig細胞特異的AR欠損マウスでも精子形成は開始する。よってAR欠損マウス実験からは、テストステロンが精子形成開始に必須のホルモンであるとは結論づけられないことになる。テストステロンにはARを介さない他の作用があるのではないかと仮説があり、実際それを支持する実験データは少なくない。ただし、そのような作用機序により、精子形成が誘導されるというデータも未だ確認されていない。また、テストステロン-ARによりセルトリ細胞等の精巣体細胞で誘導される下流遺伝子の発現がどのように生殖細胞に働き、精子形成に関与しているのかも未解明の点が多いのである。

一方、もう一つの性腺刺激ホルモンであるFSHの作用もセルトリ細胞を介したものである。生殖細胞にFSH受容体の発現はなく、精巣においてはセルトリ細胞のみがFSH受容体を発現している。よって、精子形成に対するFSHの作用も主としてセルトリ細胞を介したものである。FSH刺激により、セルトリ細胞からはGDNFの分泌が促進されることが報告されている。GDNFは精原幹細胞の増殖に重要であるが、過剰産生は精子形成を阻害する⁹⁾。よってFSHに関してもセルトリ細胞がどのように生殖細胞に働きかけ、精子形成を開始させているかは明らかではない。また、FSHの効果は動物種によって大きく異なることが知られている。マウスでのFSH遺伝子欠損実験では、精子形成に定量的な異常

が生じるものの、精子産生も妊孕能も確認されている⁹⁾。他方、ハムスターにおいては事情が異なり、その精子形成の開始にはFSHが必須の働きをする。特にハムスターは季節性(日照時間の長さ)に依存して精巣の大きさは大きく伸縮し、精子形成も停止と再開を繰り返すが、その調整をしているのがFSHである¹⁰⁾。一方、ヒトにおけるFSHの役割は、げっ歯類同様に必須ではないが、それでも精子形成を促進する効果が知られており、重要であると考えられている¹¹⁾。

レチノイン酸

レチノイン酸が精子形成に重要な因子であることは、レチノイン酸欠乏食をラットに与えた実験から明らかになっている。レチノイン酸欠乏食を長期間与えると、精子形成は完全に消失し、精巣内には未分化型精原細胞のみが残る状態になる¹²⁾。これら未分化型精原細胞が分化型精原細胞に分化するためにはレチノイン酸のシグナルが必要である。また、レチノイン酸は分化型精原細胞が減数分裂に入るときにも必要であり、さらに精子完成(半数体細胞の精子への成熟)においても重要であることが分かっている¹³⁾。これらの作用は、レチノイン酸が生殖細胞に直接働きかける結果であり、セルトリ細胞を介したものではない。生殖細胞にはレチノイン酸の受容体であるRXRとXR α が発現しており、レチノイン酸はこれらの核内受容体を介して下流遺伝子群の発現を誘導し、精細胞の分化を進めている。一方、精巣内においてレチノイン酸を産生しているのはセルトリ細胞と生殖細胞(精母細胞)である。レチノイン酸はレチノールから産生されるが、それにはその合成酵素であるRetinaldehydrogenaseが必要であり、セルトリ細胞も生殖細胞もそれを発現している。逆に、RAは思春期前から血中に存在していることから、RAによる精子形成開始を阻害している機序があると考えられる。その一つは、RA分解酵素であるCyp26b1である。Cyp26b1はセルトリ細胞や筋様細胞で発現しており、RAを分解して精巣内RA濃度を低く抑えることにより、減数分裂への導入が抑制されていると考えられている^{14, 15)}。Cyp26b1以外にもいくつかの減数分裂導入への抑止機構が想定されている¹⁶⁾。胎児期～思春期前の精巣ではそれらが総合的に働いて精子形成の開始は留められていると考えられる。

甲状腺ホルモン

甲状腺ホルモン(トリヨードサイロニン, T₃)は、両生類において変態を誘導するホルモンとして知られている¹⁷⁾。マウスやラットにおいて、甲状腺ホルモンの低下はセルトリ細胞の成熟遅延を招き、その結果、セルトリ細胞は未熟なまま分裂増殖を続けることになり、精巣は通常よりも小さくなる。逆に、甲状腺機能亢進状態にするとセルトリ細胞の成熟は早まり、早めに増殖を停止するため精巣は小さくなる¹⁸⁾。すなわち、T₃にはセルトリ細胞の成熟を誘導する機能があり、両生類の変態に相当する変化が哺乳類においてはセルトリ細胞の成熟という形でみられるとも考えられる。

我々の合成培地では、LH、FSH、テストステロン、 T_3 の4つのホルモンを添加したが、上述した如くLHとFSHは必須のホルモンとは考えにくい。それに対し T_3 は、精子形成の開始(精母細胞の出現)に必須であることがわかった。 T_3 無しの培養液では、セルトリ細胞は成熟せず、成熟のマーカーであるアンドロゲンレセプター(AR)の発現が認められなかった。一方、 T_3 を加えた培養液では他のホルモンがなくてもARの発現が認められ、精子形成が開始した。このことから、 T_3 は精子形成の誘導に重要なホルモンであることが確認できた⁴⁾。

脂質の役割

精子形成において、脂質が重要な役割をしているという報告が最近多くみられる。それらのほとんどは長鎖不飽和脂肪酸に関するものであり、長鎖不飽和脂肪酸が不足すると、精子の完成やセルトリ細胞からの遊離に障害がでることが報告されている^{19, 20)}。AlbuMAXはウシ血清由来のアルブミン製剤であり、特に脂質に富んでいるといわれている。実際、その脂質構成を調べた研究では、遊離脂肪酸、リゾリン脂質、リン脂質、コレステロール、スフィンゴミエリン、等の脂質がその主体であることが明らかになっている。我々の合成培地にはこれらの脂質の多くが含まれており、脂質が精子形成に及ぼす影響を検討した。基礎培養液 α MEMにレチノイン酸を加えると減数分裂期の細胞がわずかに観察されたが、そこに脂質(脂肪酸・コレステロール・ホスファチジルコリン・スフィンゴミエリン)を加えると減数分裂への誘導が強化された。このように、減数分裂の前、あるいは減数分裂初期～中期という精子形成の前半期において脂質が働いているというデータは新しく、興味深い⁴⁾。ただし、どの脂質がどのようにその効果を発揮するのか、詳細は今後の研究を待たねばならない。

まとめ(合成培地の限界)

上述したように、私たちは合成培地を作り、マウス精巣組織片において精子形成を誘導することに成功した⁴⁾。文献的考察から、合成培地中の物質のうちで重要と考えられるものは、RA(Re)、テストステロン、 T_3 であり、実際にこれらは必須であった。しかしながら、その合成培地にはいくつかの点でAlbuMAX培地に及ばない限界がある。1) 新生仔マウスからの精子形成は誘導できない。2) 半数体産生は非常に乏しい。3) 精巣組織の辺縁部では生殖細胞が消失し、セルトリ細胞だけの精細管になってしまう。これらの限界の原因の詳細は不明であるが、AlbuMAX培地との比較から、AlbuMAX内にはまだ知られていない重要な因子が存在していることが強く示唆される。それらの詳細を明らかにすることは精子形成をより深く理解することに繋がり、精子形成不全に起因する男性不妊症の治療にも貢献すると期待される。

文献

- 1) Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y. and Ogawa, T. (2011): In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 471, 504–507.
- 2) Komeya, M., Sato, T. and Ogawa, T. (2018): In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. *Reprod. Med. Biol.*, 17, 407–420.
- 3) Steinberger, A. and Steinberger, E. (1970): In vitro growth and development of mammalian testes. *The Testis vol. II* (Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandemark N.L., eds.), pp. 363–392, Academic Press, New York and London.
- 4) 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. and Ogawa, T. (2018): In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS One*, 13, e0192884.
- 5) Steinberger, E., Root, A., Ficher, M. and Smith, K.D. (1973): The Role of Androgens in the Initiation of Spermatogenesis in Man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 37, 746–751.
- 6) Spaliviero, J.A., Jimenez, M., Allan, C.M. and Handelsman, D.J. (2004): Luteinizing hormone receptor-mediated effects on initiation of spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice are replicated by testosterone. *Biol. Reprod.*, 70, 32–38.
- 7) Wang, R.S., Yeh, S., Tzeng, C.R. and Chang, C. (2009): Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr. Rev.*, 30, 119–132.
- 8) Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M. and Sariola, H. (2000): Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 287, 1489–1493.
- 9) Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M. and Sassone-Corsi, P. (1998): Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95, 13612–13617.
- 10) Milette, J.J., Schwartz, N.B. and Turek, F.W. (1988): The importance of follicle-stimulating hormone in the initiation of testicular growth in photostimulated Djungarian hamsters. *Endocrinology*, 122, 1060–1066.
- 11) Huhtaniemi, I. (2015): A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis. *Hormones (Athens)*, 14, 468–478.
- 12) Morales, C. and Griswold, M.D. (1987): Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology*, 121, 432–434.
- 13) Huang, H.F.S. and Marshall, G.R. (1983): Failure of

- spermatid release under various vitamin A states-an indication of delayed spermiation. *Biol. Reprod.*, 28, 1163–1172.
- 14) Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H. and Koopman, P. (2006): Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, 312, 596–600.
 - 15) Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D. and Page, D.C. (2006): Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 2474–2479.
 - 16) Feng, C.W., Bowles, J. and Koopman, P. (2014): Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 382, 488–497.
 - 17) Dickhoff, W.W. and Darling, D.S. (1983): Evolution of thyroid function and its control in lower vertebrates. *American zoologist*, 23, 697–707.
 - 18) Wagner, M.S., Wajner, S.M. and Maia, A.L. (2008): The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J. Endocrinol.*, 199, 351–365.
 - 19) Iizuka-Hishikawa, Y., Hishikawa, D., Sasaki, J., Takubo, K., Goto, M., Nagata, K., Nakanishi, H., Shindou, H., Okamura, T., Ito, C., Toshimori, K., Sasaki, T. and Shimizu, T. (2017): Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.*, 292, 12065–12076.
 - 20) Shishikura, K., Kuroha, S., Matsueda, S., Iseki, H., Matsui, T., Inoue, A. and Arita, M. (2019): Acyl-CoA synthetase 6 regulates long-chain polyunsaturated fatty acid composition of membrane phospholipids in spermatids and supports normal spermatogenic processes in mice. *FASEB J.*, 33, 14194–14203.