

学位論文の要旨

**Culture-Space Control is Effective in Promoting  
Haploid Cell Formation and Spermiogenesis In Vitro in Neonatal Mice**

培養空間制御がもたらす新生児マウスの半数体形成と体外精子完成の促進効果

[学位取得年月：2024年3月]

**Kiyoshi Hashimoto**

橋本 雪司

**Urology**

**Yokohama City University Graduate School of Medicine**

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 泌尿器科学

( **Research Supervisor: Takehiko Ogawa, Professor** )

( 研究指導教員：小川 毅彦 教授 )

( **Doctoral Supervisor: Kazuhide Makiyama, Professor** )

( 指導教員：楨山 和秀 教授 )

## 要旨

### Culture-Space Control is Effective in Promoting Haploid Cell Formation and Spermiogenesis In Vitro in Neonatal Mice

培養空間制御がもたらす新生児マウスの半数体形成と体外精子完成の促進効果

[https://doi: 10.1038/s41598-023-39323-y](https://doi.org/10.1038/s41598-023-39323-y).

キーワード : Polydimethylsiloxane, 器官培養法, 培養空間制御, 半数体形成, 体外精子完成

#### 1. 序論

2018年,我々の研究グループは,ポリジメチルシロキサン(Polydimethylsiloxane:PDMS)というシリコーン樹脂を用いて作製したチップを培養組織に被覆する器官培養法を開発した(PDMS-ceiling method:PC法)(Kojima, 2018).PC法は,培養組織を平坦化させることで酸素・栄養素の供給を均一化し,精子形成効率の向上をもたらす(Komeya, 2019).また,培養空間の高さが規定されるため,培養組織の組織体積変化を正確に,かつ経時的に測定することが可能である.ここでは,このPC法を用いて培養空間の制御がもたらす精巣組織の体積変化と精子形成効率について調査した.そして,PC法を用いた体外培養系が生殖毒性試験として有用である可能性について検証した.

#### 2. 実験材料と方法

マウス精子形成の進行を2段階で評価可能な *Acrosine*-GFP/H3.3-cherry ダブルトランスジェニックマウスの新生仔(1.5日齢)を使用した.精巣を摘出,白膜を剥離した後,顕微鏡下に鑷子で細切した.その細切した組織片を,アガロースゲル上に置き,PCチップを被せて器官培養を行った.PCチップは,60 $\mu$ m,100 $\mu$ m,160 $\mu$ mの3種類の溝の深さを用意した(PC60,PC100,PC160).更に,培養2週目にPCチップの溝の深さを100 $\mu$ mから160 $\mu$ mに変更する培養法も設定した(PC-replacement:PC-r).培養には,基礎培地である $\alpha$ MEMに血清成分としてAlbuMAX®を40mg/mLで溶解した培地を使用した.実体顕微鏡で撮影した培養組織の水平投影面積を画像解析ソフトによって測定し,PCチップの溝の深さを乗じて組織体積を算出した.各培養群を比較するため,各実験における培養7日目を基点とし組織体積変化率を算出した.実体顕微鏡下にGFPの発現面積比を経時的に記録し,精子形成効率を評価した.培養終了後に,培養精巣組織の免疫化学組織蛍光染色を行い,核の形態変化と染色パターンにより精子形成の進行度を分類し,半数体形成効率を評価した.[酸素濃度実験]インキュベーターの酸素濃度を20%,15%,10%に設定し,PC-rで培養を行った.[毒性実験]Ethinyl Estradiol(EE)を0,0.01,0.1,1.0nMの濃度で溶解した培養液を用いてPC-rで培養を行い,その毒性評価について検証した.また,PC法を用いた培養系において,Cisplatinを0,0.4,1,4,12,40 $\mu$ g/mLの濃度で溶解した培養液を24時間暴露し,その毒

性評価について検証した。全ての動物実験は、横浜市立大学医学部等遺伝子組換え実験安全委員会および横浜市立大学動物実験委員会の審査・承認を得て行った(プロトコル番号 FA-20-038)。

### 3. Results/結果

①精巣組織の成長と精子形成に対する培養空間の高さの影響：PC60, PC100, PC160, すべてのグループで組織体積は増大傾向を示したが、グループ間での有意な差はなかった、精子形成効率においては、PC60 と PC100 では PC160 に比べて GFP 発現面積比が低く、PC60 では培養 35 日目以降に低下する傾向が認められた。一方、PC160 では培養期間を通じて高い GFP 発現面積比が維持された。②PC チップ交換の効果：PC-r を用いると、組織体積は交換後 7 日目にも増大し、その傾向は持続した。また、GFP 発現も PC160 と同様に培養 42 日目まで高い GFP 発現面積比が維持される結果であった。免疫組織化学染色では、図 1, 2 に示すように、PC160 よりも PC-r において後期の円形精子細胞以降の半数体細胞を有する精細管の割合が高いことが示された(PC-r : 37.4% vs. PC160 : 12.3%)。③至適酸素分圧の検討；PC-r における組織増大度は、15% O<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> では差を認めなかったが、10% O<sub>2</sub> では有意に低い結果であった。また、伸長精子細胞を含む精細管の比率は、15%O<sub>2</sub> が他 2 条件に比し有意に高い効率を示した。④EE 毒性実験：組織増大度は濃度依存性に低くなる傾向を認めた。特に、EE 各濃度における精細管径は、コントロール群とは対照的に狭小化する傾向を示した。PAS 染色像から、各培養組織の精細管当たりの半数体細胞数を測定したところ、濃度依存性に半数体形成が有意に低い結果であった。⑤Cisplatin 毒性実験：4 μg/mL 以上の高濃度暴露群では暴露後 14 日目まで組織増大度は低濃度暴露群に比し有意に低い結果であったが、cis-4, 12 では、その後、control 群まで改善する傾向を認めた。GFP 発現割合は、cis-1 以下の暴露群では control 群とほぼ同様に推移したのに対し、cis-4 では暴露後 14 日目に著しい低下を認め、3 週間かけて control 群と同等にまで改善を認めた。Cis-12 は GFP 発現が低い状況が遷延したが、暴露後 5 週目以降、緩徐に増大傾向を認めた。一方、cis-40 では観察期間中に組織の増大ならびに GFP の発現はほとんど認めなかった。PAS 染色像から、各培養組織の精細管当たりの半数体細胞数を測定したところ、他の評価項目において control 群と有意差を認めなかった cis-1 においても半減する結果が得られた。

### 4. 考察

PC 法において、培養空間の高さは重要なパラメータであり、PC チップ中心部の溝の深さによって決定される。これらの高さによって定義される培養空間は、培養後しばらくの間は、新生児組織に適応していたが、狭い培養空間では、組織の増大に伴い精子形成の促進を阻害する可能性が示唆された。PC-r という試みは、組織体積変化ならびに精子細胞の成熟を顕著に促進する効果を示した。これは、物理的な因子が精子形成の制御に関与している可能性を示唆している。PC-r に適した酸素濃度は 15% 近辺にあることが示されたが、興味深いことに低酸素状態は特に spermiogenesis を促進させることが明らかとなった。理論的には、生体内において毛細血管に囲まれた精細管内で

は、基底膜から管腔中心部にかけて酸素濃度勾配が形成されていると考えられ、これらを裏打ち所見として重要である。PC-r を用いた EE の毒性試験は、0.01nM という低濃度でも、その精巣毒性を実証することに成功した。培養組織体積と精細管直径の経時的な測定は、精巣毒性をモニタリングするための高感度な指標となり得ることが示唆され、生体実験における精巣重量測定の代替法として今後の応用が期待される。これは、使用する実験動物数の削減に大きく貢献し、遺伝子改変動物を必要としないという展望を期待させる。本研究は、PC-r という人為的な培養空間の操作を通じて、組織の成長と精子形成の両方において、培養空間制御の重要性を示した。今後、体外精子形成系研究において培養空間は重要なパラメータの一つとなることが予想され、培養空間の形状や容積、培養微小環境に応じた空間制御の自動化など新しい技術の応用が期待される。

## 引用文献

Kojima K, Nakamura H, Komeya M, Yamanaka H, Makino Y, Okada Y, Akiyama H, Torikai N, Sato T, Fujii T, Kimura H, Ogawa T. (2018), Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ spreading, *Biotechnol. Bioeng.* 115, 3030-3041.

Komeya M, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Nakamura H, Kimura H, Fujii T, Sato T, Ogawa T. (2019), In vitro spermatogenesis in two-dimensionally spread mouse testis tissues. *Reprod. Med. Biol.* 18(4):362-369.

## I. 主論文

Culture-Space Control is Effective in Promoting Haploid Cell Formation and Spermiogenesis In Vitro in Neonatal Mice

**Hashimoto K**, Odaka H, Ishikawa-Yamauchi Y, Nagata S, Nakamura H, Kimura H, Sato T, Makiyama K, Ogawa T: Scientific Reports Vol.13, No.1, 12354, 2023

## II. 副論文

A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system. **Hashimoto K**, Arakawa H, Imamura R, Nishimura T, Kitajima S, Sato T, Makiyama K, Ogawa T, Yokota S : Journal of Applied Toxicology

## III. 参考論文

1. In vitro spermatogenesis in isolated seminiferous tubules of immature mice. Feng X, Matsumura T, Yamashita Y, Sato T, **Hashimoto K**, Odaka H, Makino Y, Okada Y, Nakamura H, Kimura H, Fujii T, Ogawa T: PLoS One. Vol.18 No.4, e0283773, 2023
2. Generation of rat offspring using spermatids produced through in vitro spermatogenesis. Matsumura T, Katagiri K, Yao T, Ishikawa-Yamauchi Y, Nagata S, **Hashimoto K**, Sato T, Kimura H, Shinohara T, Sanbo M, Hirabayashi M, Ogawa T: Scientific Reports Vol.13, No.1, 12105, 2023