

総 説 (2020年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞研究)

広汎な哺乳動物に適応する体外精子形成系の開発に向けて

松 村 貴 史, 小 川 毅 彦

横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学

要 旨: 我々は2011年に新生仔マウスの精巣組織片を培養下で成熟させ、精子形成の誘導と精子産生に成功した。産生した精子から顕微授精にて次世代作出も行った。この手法はまだ謎の多い精子形成のメカニズムや、精子形成不全の病態解析への応用が期待できるが、現在の培養法は生体内に比べて精子産生効率が極めて低く、マウス以外の動物種では成功例がこれまで無かった。本総説では現在までに行われた培養手法の改良やオミクス解析などを交えた培地成分の検討から見出されてきた知見を概説する。さらに、その成果を基に改良した培養条件にて成功したラット *in vitro* 精子形成について解説する。また、ヒトを含むその他の哺乳類での近年の試みについても紹介する。本手法の今後の発展とヒトを含む様々な動物種への応用、基礎・臨床研究での活用が期待される。

Key words: *in vitro* 精子形成 (*in vitro* spermatogenesis), 精巣 (testis)

はじめに

精子形成とは、未分化な精原細胞が減数分裂を経て半数体細胞、精子へと分化していく過程のことを指す(図1)。半数体細胞では、精子先体の形成、核の凝縮、精子尾部の形成、細胞質の脱落といったダイナミックな構造変化が起こる。これらの過程は極めて複雑で、マウスで35日、ヒトでは74日という長期間を要する。この精子形

成を支えているのは、複数種の体細胞たちである。セルトリ細胞と筋様細胞は精細管という管状構造を作り、その内部は精子形成のための特有の場となっている。特にセルトリ細胞は精細管内ですべての生殖細胞(精子形成過程の種々の分化段階のすべての生殖細胞)と接触して生殖細胞のための微小環境を維持し、栄養供給を行っている。また、精細管外ではライディッヒ細胞がテストステロンを産生し、精子形成のための精巣内環境を形成している。このように精巣内体細胞と生殖細胞の間には緻密な相互作用が働いており、これらが精子形成の誘導と維持には必要不可欠である。しかしながら精子形成のメカニズムの詳細には謎が多く残されており、精子形成不全の不妊患者への効果的な治療法はまだ見つかっていない。

精子形成を体外で再現する試みには100年以上の歴史があり、信頼できる記述として最も古いものでは1920年の論文報告がある¹⁾。当時は哺乳類動物の精巣組織片を凝血塊や胎仔抽出物の上に乗せて培養していた。この方法の原理は1960年代に気相液相境界部培養法として確立され、酸素と栄養の供給の観点から非常に優れており、現在でも用いられている。1960年から1970年代初頭にかけて、Steinberger夫妻はこの方法を用いて新生仔ラットの精巣組織片を培養し、ビタミンA/C/E、グルタミンの重要性

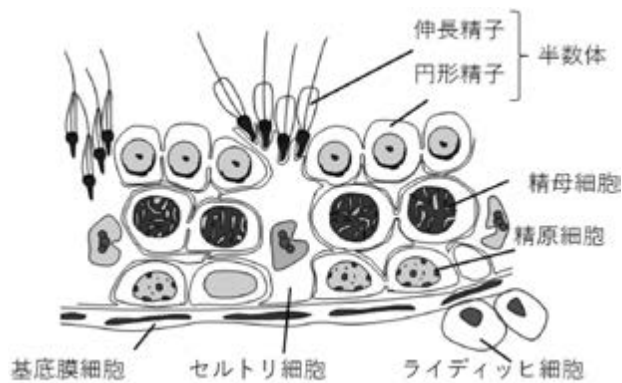


図1. マウス精細管の断面図 (一部)

哺乳類精巣に折りたたまれる精細管内で、セルトリ細胞と基底膜に囲まれた精原細胞は管腔側へ移動しながら精母細胞、円形精子、伸長精子細胞の順に分化していく。

を見出した。そして精原細胞を第一減数分裂パキテン期の精母細胞まで分化させることに成功した²⁾。また、西宗らのグループは、未分化な精原細胞しか存在しないマウスの停留精巣組織を培養し、FSH/インスリン/トランスフェリンやウシ胎仔血清 (FBS) が精原細胞の増殖や分化を促すことを見出した³⁾。しかし彼らの研究を含めた報告の殆どで、生殖細胞はパキテン期精母細胞以降には分化しなかった⁴⁾。そのような中我々は、精巣組織の構造や体細胞と生殖細胞の相互作用を重視し、組織培養の検討を続けてきた。そして2011年、FBSではなく血清代替物 Knockout Serum Replacement (KSR) を加えた培養液で未成熟マウスの精巣組織を培養することで、未分化な精原細胞を伸長精子細胞まで分化させることに世界で初めて成功した。その後、KSRの主成分であるウシ血清アルブミン製剤 (AlbuMAX) にマウスの精子形成を体外で誘導するために必要な生理活性物質がすべて含まれていることが見出された⁵⁾。現在では複数の研究グループがKSR培地での組織培養を行い、精子細胞の分化誘導を再現している⁶⁻¹⁰⁾。ただし本手法の確立当初、精子形成は2か月ほどしか維持できず、産生される半数体細胞の割合は組織片全細胞の2%程であり、50%以上を半数体が占める生体内精巣に比べて極めて低い⁵⁾。正常な精子形成のメカニズム解析への応用を目指し、現在も培養環境の改良や培地成分の検討による培養効率の改善が行われている。

マウスにおける培養法の進展

I. PDMS 製のマイクロデバイスの利用

組織片をアガロースゲル上で培養する気相液相境界部培養法の最大の利点は、血液循環がない培養環境において十分な酸素を組織片に供給できることである。それでも組織片中心部では酸素や栄養が不足し変性・壊死が観察される。酸素や栄養をより満遍なく組織に供給するため、Komeyaらは酸素透過性が高いシリコン樹脂 (PDMS) を用いて精細管に隣接する毛細血管を模倣したような培養回路を持つマイクロ流体デバイスを作製し、新生仔マウスの精巣組織片を培養した^{11,12)}。この手法では組織片は高さの規定された空間で培養され、結果として精細管が1-3層に限定された平板状の組織片となるため、中心壊死が生じず、組織片全体で精子形成が誘導された。また、6か月間を越える長期的な培養が可能となり、精子形成誘導効率の改善が認められた¹⁰⁾。その後、より簡便な手法としてアガロース上の組織片に板状のPDMS (PDMS Ceiling法) を被せて培養するPC法 (図2) も開発された^{13,14)}。PC法は、上述のマイクロ流体デバイスの利点を幾つも取り込んでおり、中心部壊死の回避と精子形成効率の向上が認められている。また、PC法においては組織片が成長する際にアガロースゲル上を滑

るようにその体積が増し、その変化を板状組織の面積として培養継続しながら計測できる。すなわち体積変化を追跡できる利点がある。精巣組織における成長 (体積変化) と精子形成の進行の両方を経時的かつ簡便に評価できる点で非常に優れている^{12,14)}。

II. オミクス解析による培養液の改良

マウスの体外精子形成を成功させた鍵はAlbuMAXであった。AlbuMAXはLipid-rich albuminと紹介されており、実際多くの脂質を含んでいることが報告されていた¹⁵⁾。我々はメタボローム解析やリポドーム解析を用いて、FBSや他のアルブミン製剤とAlbuMAXの違いを調べ、AlbuMAXに多く含まれる生理活性物質の同定を進めてきた。そして同定した候補化合物を、精子形成誘導活性の無い活性炭処理BSAを用いて可溶化し、それらを添加した化学合成培地を作製し、培養下での精子形成における効果を確かめてきた。その結果、表に示す化合物に精子形成の誘導効果が見出された (表1)¹⁶⁾。この中で甲状腺ホルモンのトリヨードサイロニン (T3) はセルトリ細胞の成熟に重要¹⁷⁾であることが知られているが、実際AlbuMAXにもT3は十分量が含まれていた。出生直後 (1-3日齢) の新生仔マウス精巣組織の培養ではT3によってセルトリ細胞に成熟マーカーであるアンドロゲンレセプター (AR) が発現し、精子形成が誘導されることが確認された。一方、テストステロンやFSH, LHといったホルモンはAlbuMAXにはわずかに含まれているだけだった。化学合成培地への添加実験では、これらのホルモン単体の場合、パキテン期の精母細胞を誘導する活性は明らかではなかったが、T3とともに加えた場合では補助的な作用が示唆された。また、AlbuMAXに多く含まれるビタミンEはビタミンCやグルタチオンとともに、酸化脂質の還元剤として作用することが知られる。これら3種類の脂質抗酸化剤を培養液に添加することで顕著な精子形成促進効果が示され、AlbuMAXとほぼ同等の効率でパキテン期精母細胞への分化を誘導できるようになった^{16,18)}。精巣培養におけるビタミンE添加の有用性は、凍結保存したマウス精巣組織の培養時にも認められている¹⁰⁾。更にリポドーム解析からはリゾフォスファチジルコリン (LPC) やリゾフォスファチジルセリン

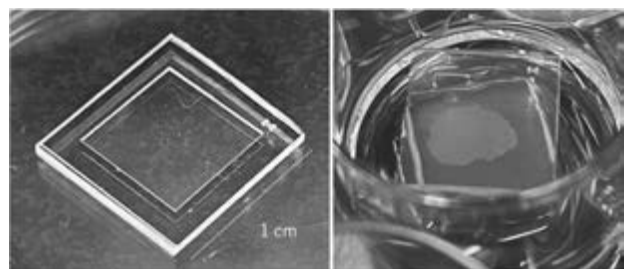


図2. PDMS Ceilingを用いた組織培養

表1. AlbuMAXを使わない化学合成培地の組成

化学合成培地の組成 (MEM α へ添加)	
ウシ血清アルブミン	Et-BSA
ビタミンAと誘導体	レチノイン酸
	レチノール
ホルモン	テストステロン
	LH
	FSH
	トリヨードサイロニン (T3)
遊離脂肪酸	ステアリン酸
	パルミチン酸
	オレイン酸
	リノール酸
	リノレン酸
その他の脂質	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
脂質抗酸化剤	ビタミンE
	ビタミンC
	グルタチオン
リゾリン脂質	LPC
	LPA or LysoPS

(LysoPS), リゾフォスファチジン酸 (LPA) といったリゾリン脂質が精子形成誘導・促進の活性を持つ可能性が示唆された。リゾリン脂質は膜構成脂質であるリン脂質から脂肪酸側鎖を1つ除いた構造をしており、近年その生理活性が注目されているが、その詳細には未解明の部分が多い。我々が見出したリゾリン脂質の精子形成への効果は新発見であり、今後その詳細を究明していきたい。これらの発見から、現在ではAlbuMAXを用いることなく、合成培地を用いて出生直後の新生仔マウス精巣組織から円形精子細胞までを分化誘導できるようになった。しかしながら、AlbuMAXとは異なり、化学合成培地で誘導される円形精子細胞の多くには形態的異常が認められ、伸長精子細胞への分化は認められていない。培養液の改良と精子形成に係る生理活性物質の同定は今後も重要な課題である。

ラットの精巣組織片培養

in vitro 精子形成系はマウスにおいて確立され、改良が重ねられてきた。我々はこの培養法が他の哺乳動物にも応用可能であると期待し、ラット精巣組織片をKSRや

AlbuMAXを加えた基礎培地を用いて培養したが、意外にも減数分裂後の半数体細胞の分化誘導は極めて難しいことが分かった。Steinberger夫妻の研究では、血清を加えない培地でパキテン期精母細胞までの分化を認めていたが²⁾、我々の結果もそれを追認するに留まった。一方、Redaらは2016年に我々と同じKSR添加培地によりラットの半数体細胞が僅かながらも誘導できたと報告した¹⁹⁾。だが、Saulnierら²⁰⁾(2019年)とNakamuraら²¹⁾(2021年)もRedaらの成果を再現できないと報告している。我々は安定的に半数体を誘導できるラット精巣組織培養法の確立を目指し、今までに同定してきた生理活性物質(表1)をAlbuMAXと一緒に添加した培地を用い、さらにPC法も併用して検討を行った。そして、4種類ホルモン(テストステロン, T3, LH, FSH), 3種類の脂質抗酸化剤(ビタミンE, ビタミンC, グルタチオン)とAlbuMAXを組み合わせた培養液と、PC法を組み合わせることによりパキテン期精母細胞が安定的に出現することを見出した。AlbuMAXへ脂質抗酸化剤のみ添加した場合には精子形成は全く誘導されず、一方ホルモンのみの添加では、培養4週後ではパキテン期精母細胞が観察されるが、6週後には減数分裂期の生殖細胞はほぼ認められなくなった。ホルモンと脂質抗酸化剤の両方を添加した群では培養6週後にパキテン期精母細胞だけでなく、円形精子細胞が観察されたことから、ホルモンがセルトリ細胞やライディッヒ細胞へのシグナル伝達を介して生殖細胞の分化を促すのに対し、脂質抗酸化剤には生殖細胞の生存を助ける働きがあると考えられ、これらの相乗効果により精子形成を進めることができたと考えられる。一方リゾリン脂質は、長期培養時(約10週間)の精子形成の維持に効果的であることが示唆された。また興味深いことに、ラットの精子形成にはインキュベーター内酸素濃度を大気圧より低く(15% O₂)設定することが重要であることを見出した。低酸素環境下で培養した際には、PC法を用いなくても円形精子細胞が誘導された。このような培養環境の改善により、我々はラットの円形精子細胞を安定的に分化誘導することに成功した(図3)²²⁾。しかしなが

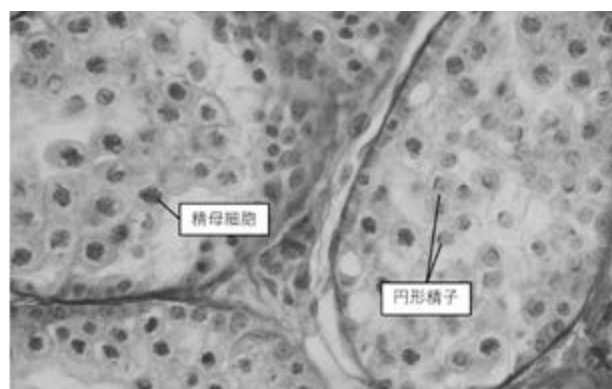


図3. 新生仔ラット精巣培養による円形精子の誘導

ら産生される円形精子細胞の数はわずかであり、伸長精子細胞の産生には至っていない。その産生効率を上げ、顕微授精による産仔作出が今後の重要課題である。

広汎な哺乳類での精巣培養の試み

本研究の目標の一つは、様々な動物種の精子形成研究のための基盤ツールを作ることである。それにより、哺乳類に共通する精子形成のメカニズムの解明や精子形成不全の病態解明に貢献することである。また、がん患者では放射線治療や薬物療法による一時的または永続的な精子形成への影響が報告されており、精子形成開始前の小児患者においてはその妊孕能の温存技術が確立されていない。In vitro 精子形成系にはそういった性未成熟患者の妊孕能保存や、希少な野生動物の種の保存への応用も期待されている。小児がん患者の精巣組織の凍結保存は欧米を中心に普及しつつあり、患者の中には成人年齢に達する人たちも現れ始めている。その意味でも凍結精巣組織を用いたヒト in vitro 精子形成法の開発は急務となっており、最近数年間に幾つかの報告がある。それらの報告では2~14歳の男児がん患者の凍結精巣組織が研究材料として用いられ、培養期間は長いもので139日間に及んでいる。KSRやヒト血清アルブミンを添加した基礎培地が用いられ、ビタミンA/C、テストステロン、T3、LH、FSH、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ピルビン酸やGlial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、グルタミンといった添加物が検討されているが、どの論文でも培養に伴い生殖細胞の顕著な減少が見られ、未分化な精原細胞が分化した確かな証拠は得られていない²³⁻²⁵⁾。ヒト以外ではSilvaらが若齢のネコ、Heckmannらが4か月もしくは8か月のマーモセットの精巣組織を培養した論文を発表しており、主にKSRやAlbuMAXとホルモンの添加によって精子形成の誘導を検討しているが、これらの動物種でも生殖細胞の分化は起こらず、精原細胞の経時的な減少が観察されている^{26, 27)}。また、いずれの動物種でも添加物の効果は認められていない。ヒトやマーモセットの培養においては培養に伴いテストステロン濃度の上昇が観察されており、ライディッヒ細胞のアンドロゲン産生能は機能しているように思われる。一方セルトリ細胞の成熟に伴うアンドロゲン受容体遺伝子の発現やanti-Müllerian hormone (AMH) 遺伝子の発現変化、精子形成細胞を血液から保護する役割があると言われる血液精巣関門 (blood testis barrier: BTB) の構造に関しては異常が観察されている報告も散見される^{24, 25, 27)}。今後も様々な角度から培養実験を続け、影響因子を一つずつ同定する必要がある。

精巣培養における脂質酸化の重要性

マウス以外の動物種の精巣組織培養において精子形成進行を妨げる原因は、現段階では不明である。その中で我々は現在、培養中の酸素環境に注目している。上述したとおり、培養下における酸素環境は組織に大きな影響を与える。体内のような循環系のない培養下の組織片では、その全体に酸素を供給するために、生体より高濃度の酸素環境が要求される一方で、過剰に生成された活性酸素による組織へのダメージを抑えることも必要となる。これは精巣組織培養に限った話ではなく、様々な臓器・組織の培養やオルガノイド培養においても共通することである。例えば肝細胞の培養では細胞周囲の酸素環境を適切化し、活性酸素による酸化ストレスを低減することで、肝細胞を重層化できるという報告がある²⁸⁾。また膵臓オルガノイドの培養ではインスリン産生能の上昇が認められている²⁹⁾。活性酸素種は核酸の断片化やタンパク質の変性を引き起こし、細胞膜脂質の酸化は細胞機能に大きな障害を与える。生体の精巣内では、精子形成が進むにつれて生殖細胞の膜脂質構成が変化し、半数体細胞にはDocosahexaenoic acid やEicosapentaenoic acidのような化学的に不安定な長鎖不飽和脂肪酸側鎖をもつリン脂質が多く膜に局在することが示されている³⁰⁾。長鎖不飽和脂肪酸の合成³¹⁾や細胞膜への供給^{32, 33)}に関わるとされる酵素を欠損するマウスの中には後期精子形成の異常により雄性不妊を呈するものもあり、酸化ストレスの低減は半数体以後の精子形成完了にも大きく寄与する可能性が高い。実際にマウス、ラット未熟精巣の培養ではビタミンEやビタミンC、グルタチオンといった脂質の酸化防止剤が培養効率、精子形成の維持に重要であった。特にラットにおいてはインキュベーター内の酸素濃度を低減することが半数体誘導を促進した。これまでの培養実験では、精子形成に重要とされるホルモンを中心に培養液が調整されてきたが、今後は培養組織における酸化ストレス低減のための工夫が体外精子形成系を進展させる鍵となるかもしれない。

おわりに

精巣組織培養による精子形成の体外誘導はマウスにおいて確立されたが、効率や他動物種への応用を鑑みるとまだまだ未完成である。とはいえ、マウス精巣培養を通して積み上げられた知見はラットの培養系の改善に大きく寄与した。また、ラットの組織培養により酸素濃度の重要性がはっきり見出されてきたように、様々な動物種の精巣組織を培養すれば、未知の因子の同定につながる事が期待できる。今後もヒトを含めた広汎な哺乳類の体外精子形成誘導を目指したい。

文 献

1. Champy C. H : De la méthode de culture des tissus. VI. Le testicule. *Arch Zool Exptl Gen*, **60**: 461–500, 1920.
2. Steinberger A: Factors affecting spermatogenesis in organ cultures of mammalian testes. *J Reprod Fertil Supplement*, **2**: 117–124, 1967.
3. Haneji T, Maekawa M & Nishimune Y: Vitamin A and follicle-stimulating hormone synergistically induce differentiation of type A spermatogonia in adult mouse cryptorchid testes in vitro. *Endocrinology*, **114**: 801–805, doi: 10.1210/endo-114-3-801, 1984.
4. Komeya M, Sato T & Ogawa T: In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. *Reproductive medicine and biology*, **17**: 407–420, 2018.
5. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, *et al.*: In Vitro Production of Functional Sperm in Cultured Neonatal Mouse Testes. *Nature*, **471**: doi: 10.1038/nature09850, 2011.
6. Nakamura N, Merry G. E, Inselman A. L, *et al.*: Evaluation of Culture Time and Media in an In Vitro Testis Organ Culture System. *Birth Defects Res*, **109**: 465–474, doi: 10.1002/bdr2.1002, 2017.
7. Portela J. M. D, Mulder C. L, van Daalen S. K. M, *et al.*: Strains matter: Success of murine in vitro spermatogenesis is dependent on genetic background. *Dev Biol*, **456**: 25–30, doi: 10.1016/j.ydbio.2019.08.007, 2019.
8. Dumont L, Oblette A, Rondanino C, *et al.*: Vitamin A prevents round spermatid nuclear damage and promotes the production of motile sperm during in vitro maturation of vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. *Mol Hum Reprod*, **22**: 819–832, doi: 10.1093/molehr/gaw063, 2016.
9. Isoler-Alcaraz J, Fernández-Pérez D, Larriba E, *et al.*: Cellular and molecular characterization of gametogenic progression in ex vivo cultured prepubertal mouse testes. *Reprod Biol Endocrinol*, **15**: 85, doi: 10.1186/s12958-017-0305-y, 2017.
10. Arkoun B, Galas L, Dumont L, *et al.*: Vitamin E but Not GSH Decreases Reactive Oxygen Species Accumulation and Enhances Sperm Production during In Vitro Maturation of Frozen-Thawed Prepubertal Mouse Testicular Tissue. *Int J Mol Sci*, **20**: doi:10.3390/ijms20215380, 2019.
11. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, *et al.*: Long-term Ex Vivo Maintenance of Testis Tissues Producing Fertile Sperm in a Microfluidic Device. *Scientific reports*, **6**: doi: 10.1038/srep21472, 2016.
12. Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, *et al.*: Pumpless Microfluidic System Driven by Hydrostatic Pressure Induces and Maintains Mouse Spermatogenesis in Vitro. *Scientific reports*, **7**: doi: 10.1038/s41598-017-15799-3, 2017.
13. Kojima K, Nakamura H, Komeya M, *et al.*: Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ spreading. *Biotechnol Bioeng*, **115**: 3030–3041, doi: 10.1002/bit.26822, 2018.
14. Komeya M, Yamanaka H, Sanjo H, *et al.*: In Vitro Spermatogenesis in Two-Dimensionally Spread Mouse Testis Tissues. *Reproductive medicine and biology*, **18**: doi: 10.1002/rmb2.12291, 2019.
15. Garcia-Gonzalo, F. R & Izpisua Belmonte, J. C: Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal. *PLoS One*, **3**: e1384, doi: 10.1371/journal.pone.0001384, 2008.
16. Sanjo H, Komeya M, Sato T, *et al.*: In Vitro Mouse Spermatogenesis With an Organ Culture Method in Chemically Defined Medium. *PloS one*, **13**: doi: 10.1371/journal.pone.0192884, 2018.
17. Smith, L. B & Walker, W. H. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (eds Tony M. Plant & Anthony J. Zeleznik) 637–690 (Academic Press, 2015).
18. Sanjo H, Yao T, Katagiri K, *et al.*: Antioxidant Vitamins and Lysophospholipids Are Critical for Inducing Mouse Spermatogenesis Under Organ Culture Conditions. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, doi: 10.1096/fj.202000245R, 2020.
19. Reda A, Hou M, Winton T. R, *et al.*: In vitro differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. *Mol Hum Reprod*, **22**: 601–612, doi: 10.1093/molehr/gaw047, 2016.
20. Saulnier J, Oblette A, Delessard M. *et al.*: Improving Freezing Protocols and Organotypic Culture: A Histological Study on Rat Prepubertal Testicular Tissue. *Annals of Biomedical Engineering*, 1–16, 2020.
21. Nakamura N & Sloper D. T: Comparison of germ cell differentiation of rat testis fragments cultured in knockout serum replacement versus Albumax™ I. *Birth Defects Res*, **113**: 359–370, doi: 10.1002/bdr2.1859, 2021.
22. Matsumura T, Sato T, Abe T, *et al.*: Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Scientific Reports*, **11**: 3458, doi: 10.1038/s41598-021-82792-2, 2021.
23. de Michele F, Poels J, Weerens L, *et al.*: Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial

- survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue. *Hum Reprod*, **32**: 32–45, doi: 10.1093/humrep/dew300, 2017.
24. Medrano J. V, Vilanova-Pérez T, Fornés-Ferrer V: *et al.*: Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue. *Fertil Steril*, **110**: 1045–1057, e1043, doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.07.018, 2018.
 25. Portela J. M. D, de Winter-Korver C. M, van Daalen S. K. M, *et al.*: Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis. *Hum Reprod*, **34**: 2443–2455, doi: 10.1093/humrep/dez180, 2019.
 26. Silva A. F, Escada-Rebello S, Amaral S, *et al.*: Can we induce spermatogenesis in the domestic cat using an in vitro tissue culture approach? *PLoS one*, **13**: e0191912–e0191912, doi: 10.1371/journal.pone.0191912, 2018.
 27. Heckmann L, Langenstroth-Röwer D, Wistuba J, *et al.*: The initial maturation status of marmoset testicular tissues has an impact on germ cell maintenance and somatic cell response in tissue fragment culture. *Molecular Human Reproduction*, **26**: 374–388, doi: 10.1093/molehr/gaaa024, 2020.
 28. Hamon M, Hanada S, Fujii T, *et al.*: Direct oxygen supply with polydimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells in vitro. *Cell Transplant*, **21**: 401–410, doi: 10.3727/096368911x605303, 2012.
 29. Myasnikova D, Osaki T, Onishi K, *et al.*: Synergic effects of oxygen supply and antioxidants on pancreatic β -cell spheroids. *Scientific Reports*, **9**: 1802, doi: 10.1038/s41598-018-38011-6, 2019.
 30. Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, *et al.*: Imaging mass spectrometry reveals changes of metabolites distribution in mouse testis during testicular maturation. *Surface and Interface Analysis*, **44**: 749–754, doi: https://doi.org/10.1002/sia.3869, 2012.
 31. Stoffel W, Holz B, Jenke B, *et al.*: Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *Embo j*, **27**: 2281–2292, doi: 10.1038/emboj.2008.15, 2008.
 32. Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, *et al.*: Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J Biol Chem*, **292**: 12065–12076, doi: 10.1074/jbc.M117.791277, 2017.
 33. Shishikura K, Kuroha S, Matsueda S, *et al.*: 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, doi: 10.1096/fj.201901074R, 2019.

Abstract

TOWARD THE DEVELOPMENT OF AN IN VITRO PERMATOGENESIS
SYSTEM APPLICABLE TO A WIDE RANGE OF MAMMALS

Takafumi MATSUMURA, Takehiko OGAWA

*Department of Regenerative Medicine,
Yokohama City University Graduate School of Medicine*

In 2011, we succeeded in producing sperm from spermatogonial stem cells in vitro by culturing testicular tissue fragments of neonatal mice. Offspring were obtained with these in vitro-produced sperm by micro-insemination. This method was expected to be applied to elucidate the mechanism of spermatogenesis and to analyze spermatogenic defects. However, the current culture method is extremely inefficient compared to in vivo spermatogenesis. It was also not applicable to animals other than mice. In this review, we present our efforts to improve spermatogenesis in vitro, focusing on microfluidic culture methods and omics analysis of culture media. We also describe a new culture system that has been successfully used for in vitro spermatogenesis in rats. In addition, recent worldwide attempts to culture non-mouse mammalian, including human, testicular tissues are described. It is hoped that in vitro spermatogenesis technology will be further improved and applied to many mammals, including humans, for basic and clinical research in the future.

