

## 試験管内精子形成の現状と可能性

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：**生殖細胞の基礎研究は過去30年間に飛躍的に進歩・発展してきた。また、生殖細胞を培養する技術、精子形成を誘導する培養方法などの技術面での進展も目覚ましい。マウスにおいては精巣組織片を培養して精子幹細胞から精子産生も可能となった。さらには、ES/iPS細胞から培養下において精子を作ることさえ可能になっている。しかしながら、これらの技術のヒトへの応用はこれからの課題である。本章では、試験管内精子形成という実験技術の進歩とこれからの展開についての展望を記す。

**Key words:** 試験管内精子形成 (in vitro spermatogenesis)

### 1. 試験管内精子形成の現状

試験管内ヒト精子形成が可能になれば、そこで得られた精子を用いて体外受精（顕微授精）が可能となり、拳児が得られる可能性は大きい。では、現時点において試験管内精子形成の技術はどの程度進んでいるのだろうか。マウスにおける試験管内精子形成には、精子幹細胞から精子細胞までの分化を効率よく誘導することができる<sup>1)</sup>。その方法は、古典的な気相液相境界部培養法を基盤としたシンプルなものである。筆者たちは、アガロースゲルを台座にしてその上に精巣組織片を乗せている。培養液を台座ゲルの高さの半分程まで入れることで組織片には培養液が染み渡り、かつ十分な酸素も得られる（図1）。通常は、新生仔～未成熟マウスの精巣の組織片（約1 mm<sup>3</sup>程度）を用いて培養を行い、精子形成の進行を特異的なマーカー遺伝子の発現で確認している（図2）。マウスでは、生後7日前後で減数分裂が始まり、21日前後で半数体が現れる。42日頃には精子ができる。培養下でもほぼ同じスケジュールで精子形成が進むが、精子まで到達するのはごく少数である。その効率をin vivoとの比較で考えてみる。新生仔マウスの精巣は、1 mm<sup>3</sup>強の大きさであるが、成長するとその体積は100 mm<sup>3</sup>ほどになる。その中で精子形成は最高の効率で進行している。しかし、1 mm<sup>3</sup>の新生仔マウス精巣を培養した場合、その体積増大はせいぜい3倍程度である。その3 mm<sup>3</sup>の精巣組

織の中で精子形成が半数体産生にまで到達する精細管の比率もせいぜい3割程度であり、各々の精細管内に生じる半数体の数は最高でも生体内の場合の1/10程度だろう。これらを合計すると、in vitroでの半数体の形成効率は、最大でも生体内の1/1000 (0.1%)に過ぎないことになる。ただし、これは主として精巣の成長を比較していることになり、必ずしも精子形成の効率の純粋比較にはなっていないとも言える。それでは成熟した精巣を培養して比較すればよいとも考えられる。だが、成熟マウス精巣組織を用いた際のin vitro精子形成は極めて低効率である。成熟マウス精巣の各々の精細管には、精子幹細胞から精子に至るまでの様々な分化段階の精細胞が含まれている。その精細管直径は200 μmを超える。このような精子形成が完成した精細管を培養条件下に晒すと、精細管は潰れ、精細管内部の精細胞は変性し、精細管断端から漏出してしまふ。漏出しないで精細管内に残った精細胞の多くも変性・壊死に陥る。本来ならそれらの変性・壊死細胞はセルトリ細胞の貪食機能により除去されるのだが、大量の壊死細胞やその残骸を培養条件下のセルトリ細胞は除去しきれない。すなわち、成熟精巣を培養した際には、変性・壊死細胞が充満した惨状となり、精子形成は頓挫しその再生はおぼつかない。残存した精子幹細胞から精子形成の再生が部分的に生じる像は散見される場合もあるが、それは極めて貧弱である。その効率を定量化することは難しいが、上述の0.1%よりもさらに低

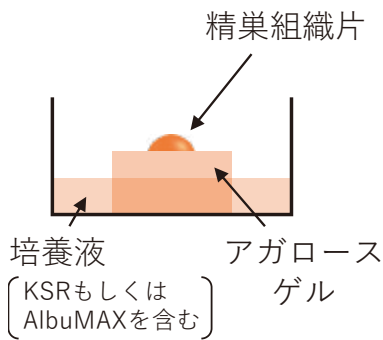


図1 アガロースゲルに乗せられた精巣組織片は、下から栄養を上から酸素を供給される。

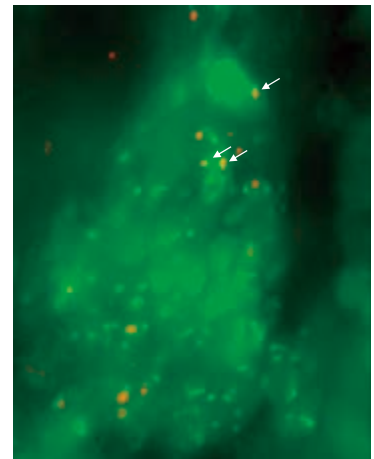
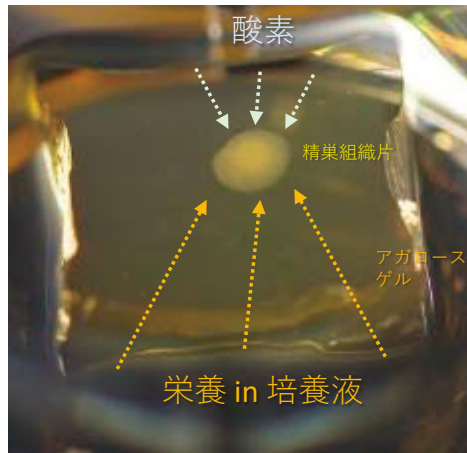


図2 Acr-GFP (緑)とmCherry (赤) 蛍光発色により、減数分裂期と伸長精子細胞への分化を簡便にモニターできる。矢印:伸長精子細胞

い程度だと思われる。大量の精細胞の変性・壊死がもたらす精細管内環境の悪化を回避するために、我々は精細管内の精細胞をあらかじめ除去しておく実験も行った。ビタミンA欠乏食(VAD)でマウスを飼育することにより、精細管内精細胞を未分化型精原細胞のみにし、その精巣組織を培養する実験である。その際は、精子形成が減数分裂中期に到達する効率はVADマウスにおいて対照群の2.5倍に上昇した<sup>2)</sup>。だが、それでも2.5倍程度の改善である。桁違いに低いin vitro精子形成の効率の向上には、焼け石に水の感がある。すなわち、原因は不明であるが、試験管内精子形成においては成熟した精巣組織を培養して精子形成を誘導することは、未成熟精巣の場合よりも難易度が格段に高くなるという現実がある。このことは、後述するヒト精子形成実験におけるの大きな課題となっている。

まとめると、現時点におけるin vitro精子形成(半数体産生)の効率は鼠目に見積もっても生体の0.1%程度だと考えられる。また、半数体(円形精子細胞)産生後の精子完成(spermiogenesis)やセルトリ細胞からの精子の遊離(spermiation)が完全な形で再現されることは現状では極めて困難である。培養下の精細管には出口がなく、精細管内の液流を作ることもしないことがその主原因になっている。当然、運動能を持つような完全な精子の産生は、in vitroにおいては望めない。

このように精巣組織の器官培養によるin vitro精子形成にはこのシステム特有の問題点と限界がある。だが、マウスにおけるin vitro精子形成実験では、伸長精子細胞の産生は少数とは言え高頻度に観察でき、確立された技術であると言える。それらを用いて顕微授精することも十分に可能である。ヒトにおいても円形精子細胞での顕微授精が成功している状況を考えるとin vitroでの精子完成(半数体細胞の精子への成熟)は必須ではなく、実用を考えると円形精子細胞までの分化で十分とも考えられる。その意味では基本的な試験管内精子形成の技術は完成していると

考えても良いだろう。残された課題は、マウスでの技術をヒトに適用できるように最適化することである。

## 2. 試験管内精子形成における培養液の検討

マウスでの試験管内精子形成が成功したのは、培養液にAlbuMAXを添加したことが最も重要な要因である。しかし、AlbuMAXがFBSなど他の生物由来添加物と何が違うのかは長い間不明であった。AlbuMAXはウシ血清由来のアルブミンだが、血清に由来する様々な物質が含まれていることが報告されている<sup>3)</sup>。しかも基礎培地(MEM- $\alpha$ )にAlbuMAXを加えただけの培養液で、マウスの精子形成を誘導・維持することができるということから、AlbuMAX内には精子形成に必要な全ての物質・因子が含まれていると考えられる。その後の研究から、AlbuMAXにはレチノイン酸、LH、FSH、テストステロン、トリヨードサイロニン(T3)などの重要因子が含まれていることが確認された<sup>4)</sup>。これらはすべて精子形成に必須、もしくは重要であることが過去の研究から明らかになっている。また、上記の重要物質のほかに、AlbuMAXには、培養細胞の増殖に有利な脂質成分が含まれていることが報告されている<sup>3)</sup>。それらは、遊離脂肪酸、リン脂質、リゾリン脂質、コレステロール、スフィンゴミエリン、などである。これらの中で特にリゾリン脂質は、精巣組織の維持や精子形成に重要であることを我々は確認した<sup>5)</sup>。さらに、AlbuMAXを含んだ培地は高い抗酸化作用を示すことから、AlbuMAX内の重要物質として抗酸化剤の存在が推定された。実際、AlbuMAXにはビタミンEが含まれている。ビタミンE欠乏症は、様々な病態を呈するが、動物実験では精子形成不全も報告されている<sup>6)</sup>。AlbuMAXや血清を含まない合成培地での実験において

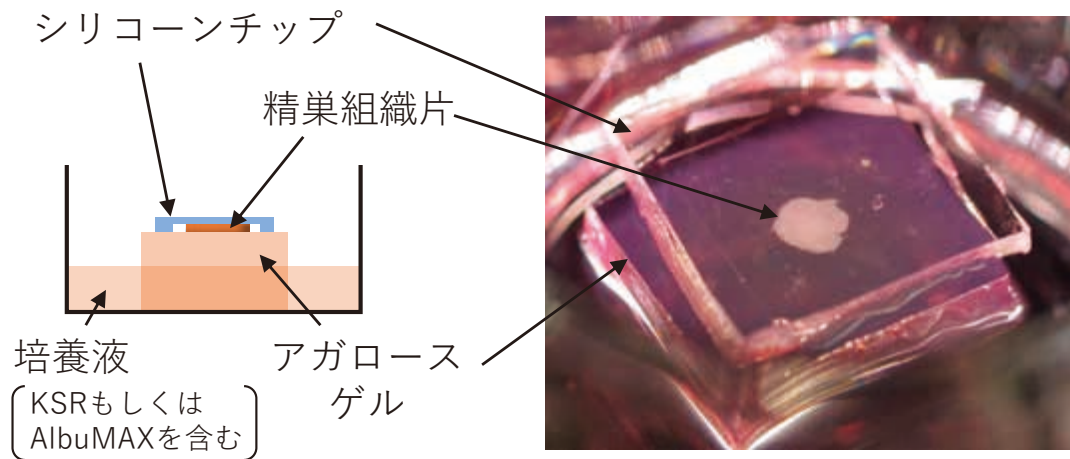


図3 シリコン・チップを精巣組織に被せて組織を薄く円盤化することで、栄養と酸素の供給を組織全体に均一化できる。

は、ビタミンEにビタミンCとグルタチオンを加えて抗酸化作用を強化することで、精子形成効率が劇的に改善することを我々は見いだした<sup>5)</sup>。現在、AlbuMAXを使用せずに、上記した重要物質を含んだ化学的合成培地を用いてマウス精子形成を誘導することが可能となった。すなわち、マウス精子形成に必要な因子がほぼ全て特定されたと言える。今後は、マウス以外の動物種においてそれぞれの精子形成に最適な培養液を調整することが重要な課題である。

### 3. 他種動物への応用

マウスで成功した試験管内精子形成を他の動物種に応用する試みを我々はこれまで続けてきた。しかし、それは非常に困難であることが徐々に明らかになった。特に落胆したのは、同じげっ歯類であるラットにおいても試験管内精子形成は困難を極めた点である。マウス精子形成に用いた方法をそのままラット精巣組織片に適用しても、精子形成の進行は極めて限定的であり、減数分裂途中までの進行を認めるのみであった。これは1960年代に米国のSteinberger夫妻が残した実験データと大差はなく、非常に残念な結果であった。我々はマウス精巣組織を使った実験を繰り返し、その精子形成効率の向上を目指してきた。特に培養液の重要性は明らかであり、試験管内精子形成に重要な因子の同定に集中した。その結果、上述したような成果が得られ、ラット精子形成に適した培養液の作成に繋がった。ラット用培地の特徴は、AlbuMAXの濃度を半分にし、抗酸化剤であるビタミンE、ビタミンC、グルタチオン、並びにリゾリン脂質を添加したことである。それらに加えて、それまでの気相液相境界部培養法にマイクロ流体システムを導入し、さらにそこからシリコンチップ法を開発して、精巣組織片培養において各精細管の状況を観察しやすく、かつ簡便化する改良を行った(図3)<sup>7)</sup>。それらの知見に基づく培

養法の改良により、試験管内ラット精子形成の効率は大きく向上した<sup>8)</sup>。

### 4. ヒトへの応用

近年、ヒトの試験管内精子形成に関する報告も散見される<sup>9-12)</sup>。それらの中には、思春期前の男児から採取した未熟な精巣組織を培養することで、半数体細胞が生成された報告するものがある<sup>10)</sup>。一方で、長期間の培養でも精子形成の進行が見られず、培養時間の経過とともに精原細胞は徐々に減少していったという報告もある<sup>12)</sup>。また、ヒト胎児精巣組織を培養し、妊孕能のある精子が得られたとの報告もあるが<sup>13)</sup>、追試による確認が待たれる。

我々も性転換手術に際して、摘出されるヒト精巣組織を利用していただき、*in vitro*精子形成実験を行っている。しかし、幾つかの点で、この実験は非常に難易度が高い。例えば、ヒト精子形成は74日間という長期間を要することが知られているが、これはマウスの35日間の2倍である。また、ヒト精原細胞の分裂頻度は極端に少なく、短期間の培養で変化を捉えることは難しい。さらに、上述したように成熟した精巣組織の培養はマウスにおいても非常に困難なので、ヒト組織の場合にも同様の難しさが付きまとう。上に紹介したヒトの体外精子形成実験では、精子産生までに要する日数が数日足らずのものが殆どである。この点は大きな謎である。マウスの場合の*in vitro*精子形成では生体内の精子形成とほぼ同じ期間、もしくは少し長い期間を要しており、*in vitro*だからといって精子形成の進行が早まることはない。この点から、ヒト体外精子形成の報告には信憑性に欠ける点があると思われる。

### 5. ES/iPS細胞からの精子形成

マウスES/iPS細胞を培養下において始原生殖細胞に分

化誘導することが可能となった(2011年)<sup>14)</sup>。その細胞は始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)と名付けられ、生体内の始原生殖細胞とは区別されている。しかし、新生仔マウスの精巣に移植されたPGCLCsは、精子になり、その機能的正当性が証明された。斎藤らのこの研究はさらに発展し、現在ではES/iPS細胞から精子幹細胞様細胞(GSCLCs)が誘導され、その精子形成能も証明された<sup>15)</sup>。我々もこの研究に参加し、GSCLCsからin vitroで精子産生を担当した。マウスにおけるこのような基礎研究の成果がヒトのES/iPS細胞でも再現できるかと言えば、そこには大きな技術的障壁がある。上述したように、in vitro精子形成は動物種間で培養条件の調整が必要であり、マウスでの成功がすぐに他種動物に応用できないことが明らかとなっているからだ。とは言え、化学組成が規定されている合成培地でのin vitro精子形成が可能となっている現在においては、培養液組成の最適化は実現可能である。74日間という長期間を要するヒト精子形成を培養下で再現することの難易度は極めて高いが、重要な研究課題であり、今後の進展が待たれる。

## おわりに

科学・技術の進歩は直線的ではなく、時に長く停滞し、時に指数関数的でさえある。それ故に、ヒト体外精子形成の技術的完成の時期を正確に予想することはできないが、私は近い将来だろうと期待している。となると、それらの技術の安全性についての評価・考察も欠かせない。生殖細胞には変異を抑える未解明の特別な仕組みがあり、体細胞と比べてそのゲノム変異頻度は桁違いに抑えられている<sup>16)</sup>。さらに、精子ゲノムのメチル化状態が不妊の原因にもなりえる<sup>17)</sup>。それらの観点から、in vitro精子形成によって作られた精子はどうか。さらに、ES/iPS細胞から誘導したGSCLCs、そこから作られた精子はどうか。これらの疑問にも答えていく必要がある。

## 文 献

- 1) Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T: In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, **471** (7339) : 504–507, 2011. doi: 10.1038/nature09850.
- 2) Sato T, Katagiri K, Kojima K, Komeya M, Yao M, Ogawa T: In Vitro Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS One*, **10** (6) : e0130171, 2015.
- 3) Garcia-Gonzalo FR, Izpisua Belmonte JC: Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal. *PLoS One*, **3** (1) : e1384, 2008.
- 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, Ogawa T: In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS One*, **13** (2) : e0192884, 2018.
- 5) Sanjo H, Yao T, Katagiri K, Sato T, Matsumura T, Komeya M, Yamanaka H, Yao M, Matsuhisa A, Asayama Y, Ikeda K, Kano K, Aoki J, Arita M, Ogawa T: Antioxidant vitamins and lysophospholipids are critical for inducing mouse spermatogenesis under organ culture conditions. *FASEB J*, **34** (7) : 9480–9497, 2020.
- 6) Mason KE: Differences in testis injury and repair after vitamin A-deficiency, vitamin E-deficiency, and inanition. *American J Anatomy*, **52**: 153–239, 1933.
- 7) Komeya M, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Nakamura H, Kimura H, Fujii T, Sato T, Ogawa T: In vitro spermatogenesis in two-dimensionally spread mouse testis tissues. *Reprod Med Biol*, **18** (4) : 362–369, 2019.
- 8) Matsumura T, Sato T, Abe T, Sanjo H, Katagiri K, Kimura H, Fujii T, Tanaka H, Hirabayashi M, Ogawa T: Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Sci Rep*, **11** (1) : 3458, 2021.
- 9) 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, 2017.
- 10) de Michele F, Poels J, Vermeulen M, et al.: Haploid germ cells generated in organotypic culture of testicular tissue from prepubertal boys. *Front Physiol*, **9**: 1413–1413, 2018.
- 11) Medrano JV, 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, 2018.
- 12) Portela JMD, de Winter-Korver CM, van Daalen SKM, 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, 2019.
- 13) Yuan Y, Li L, Cheng Q, et al.: In vitro testicular

- organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Res*, **30**: 244 – 255, 2020.
- 14) Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M: Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, **146**: 519 – 532, 2011.
- 15) Ishikura Y, Ohta H, Sato T, Murase Y, Yabuta Y, Kojima Y, Yamashiro C, Nakamura T, Yamamoto T, Ogawa T, Saitou M: In vitro reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **28** (12) : 2167 – 2179.e9, 2021.
- 16) Goriely A: Decoding germline de novo point mutations. *Nat Genet*, **48** ( 8 ) : 823 – 824, 2016.
- 17) Rotondo JC, Lanzillotti C, Mazziotta C, Tognon M, Martini F: Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Front Cell Dev Biol*, **9**: 689624, 2021.

### Abstract

#### IN VITRO SPERMATOGENESIS: CURRENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS

Takehiko OGAWA

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

Research on germ cell biology has progressed dramatically over the past 30 years. In particular, culture technologies and techniques for germ cell propagation and inducing spermatogenesis have made remarkable progress. In mice, it is now possible to produce sperm from spermatogonial stem cells in cultured testicular tissue fragments. Furthermore, it is even possible to produce sperm from ES/iPS cells in culture. However, the application of these technologies to humans remains a challenge. In this article, the progress in the experimental technique of in vitro spermatogenesis and the prospects for its future development are described.