OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	精巣組織培養における至適酸素濃度の検討と化学合成培地の開発
Author(s)	永田, 紫野
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105589
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

2025 年度（令和 7 年度）博士論文

精巣組織培養における
至適酸素濃度の検討と化学合成培地の開発

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻

永田　紫野

目次

略語一覧……3

第一編　諸論……4

第二編　本論……7

第一章　化学合成培地（CDM）を用いた精巣組織培養における酸素条件の最適化

要旨……7

序論……8

実験方法……9

結果

第一節　CDM における *in vitro* 精子形成の定量的再評価……13

第二節　CDM を用いた体外精子形成における酸素条件の最適化……15

第三節　低酸素条件下における CDM 培養での半数体細胞誘導の増加……17

小括・考察……20

第二章　グルコースおよびインスリン添加が培養下の組織成長と精子形成に及ぼす影響

要旨……22

序論……23

実験方法……24

結果

第一節　グルコースおよびインスリン添加による培養精巣組織の成長と精子形成への影響……26

第二節　増大した培養精巣組織における半数体細胞誘導の評価……27

小括・考察……29

第三章　スフィンゴ糖脂質の添加が精子細胞の分化に及ぼす影響

要旨……31

序論……32

実験方法……35

結果

第一節　スフィンゴ糖脂質添加による精子形成活性への影響……37

第二節　スフィンゴ糖脂質添加組織における半数体細胞の分化段階評価……38

小括・考察……41

第三編　結論……43

第四編　謝辞……44

第五編　主論文・参考論文リスト……45

第六編　参考文献……46

略語一覧（A toZ）

BSA: Bovine Serum Albumin

CDM: Chemically Defined Medium (化学合成培地)

DDX4: DEAD-Box Helicase 4

EdU: 5-ethynyl-2′-deoxyuridine

FSH: Follicle-stimulating hormone（卵胞刺激ホルモン）

GA1: Asialo-GM1

GA2: Asialo-GM2

GFP: Green Fluorescent Protein

G-ITS: Glucose + Insulin–Transferrin–Selenium

LacCer: Lactosylceramide

LH: Luteinizing hormone（黄体形成ホルモン）

MVH: Mouse Vasa homolog

PAS: Periodic acid–Schiff

PBS: Phosphate-buffered saline

PC: PDMS-ceiling chip

PNA: Peanut Agglutinin

Prm1: Protamine 1

RFP: Red Fluorescent Protein

SOX9: SRY-box transcription factor 9

T: Testosterone

T3: Triiodothyronine（甲状腺ホルモン）

TNP1: Transition Nuclear Protein 1

第一編　諸論

日本を含む主要先進国では、不妊症が深刻な社会課題となっている。不妊症とは、避妊せずに性交を行っているにもかかわらず一定期間（通常 1 年間）妊娠が成立しない状態と定義される。現在、約 6 組に 1 組のカップルが不妊症と診断され、そのうち半数は男性側に原因があるとされている[1]。男性不妊の 8 割以上が精子数や精子運動性の低下を呈する造精機能障害に分類されるが、ヒトの精子形成メカニズムが十分に明らかにされていないため、造精機能障害の半数は発症機序が不明である[2]。男性不妊症に対する治療法開発のため、哺乳類の精子形成過程を理解することが喫緊の課題である。

これまでに報告された精子形成機構はモデル動物、主にマウスを用いて明らかにされてきた。しかし、精子形成はマウスで約 35 日、ヒトでは約 74 日を要する連続的な分化過程である[3]。マウスでは約 8.6 日で進むステージ特異的な精上皮周期[4]が存在し、これらの時間的ダイナミクスを正確に捉えるには長期かつ連続的な観察が必要となる。しかし、個体を用いて長期間にわたり分化の全過程をリアルタイムに追跡することは困難であった。マウス精巣を対象とした *in vivo* imaging 技術も開発されているものの、動物個体の負担が大きく、観察可能な期間は数日規模にとどまる[5,6]。これに対し、*in vitro* で精子形成を再現すること（*in vitro* 精子形成）ができれば、組織や細胞レベルで分化過程を経時的に観察できる。また、精巣から切り分けた複数の組織片を実験に供することで実験動物の削減（3R）にも貢献できる。さらに、*in vitro* 精子形成系はマウスだけでなく、生体を用いた実験が困難なヒト精巣を用いた研究にも応用可能であると考えられるため、将来的にヒト *in vitro* 精子形成系の構築や薬剤評価、さらには不妊症診断・治療への貢献も期待できる。

精子形成は精原細胞の増殖、精母細胞での減数分裂、精子細胞における高度な核の凝縮と鞭毛形成を伴う形態変化という複雑な分化過程を有する。精原細胞は未分化型と分化型に大別され、未分化型は幹細胞として精子形成の恒常性を維持する。分化型精原細胞は精母細胞へと分化し、減数分裂完了後に円形精子細胞となる。さらに伸長精子細胞への形態変化を経て精子へと成熟する。一連の精子形成は体細胞であるセルトリ細胞やライディッヒ細胞によって物理的・内分泌的に支えられている。

精子形成過程を *in vitro* で再現する試みは、20 世紀初頭から行われてきた。1920 年の Champy によるウサギ精巣組織片の培養報告[7]を皮切りに、1937 年には Martinovitsh が鶏血漿および鶏

胚抽出物上でマウス精巣組織片を培養し、未分化精原細胞をパキテン期精母細胞へ誘導した[8]。さらに 1960 年代には Steinberger らが器官培養法を発展させたが、パキテン期以降への分化誘導には至らなかった[9,10]。その後は細胞培養法が主流となったが、精母細胞から精子細胞への分化誘導は依然として困難であった。2010 年に郷原らが気相液相境界面培養法を用いて半数体細胞までの誘導に成功し[11]、これを基盤として 2011 年には佐藤らが精原細胞から精子まで分化誘導可能な器官培養系を確立させた[12]。

佐藤らの確立した *in vitro* 精子形成系は、培地に浸したアガロースゲル上で精巣組織片を培養する簡便な方法である（図 1）。一個体の精巣を切り分けて使用することで同時に複数条件を検討できるほか、減数分裂中期以降の生殖細胞で GFP が発現する *Acrosin-GFP* トランスジェニックマウス[13]を用いることで、精子形成の進行をライブイメージング観察することが可能である。

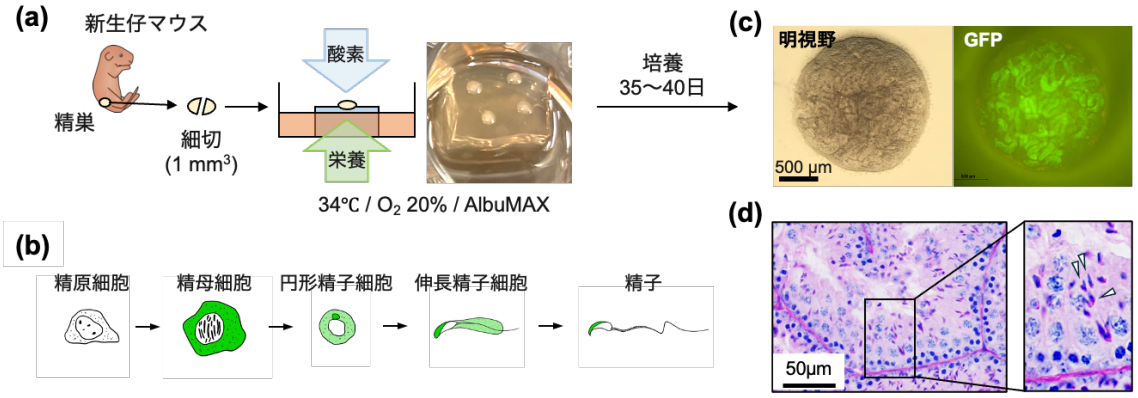

図 1　精巣組織の器官培養法

(a)培養方法。新生仔マウスから精巣を採材し、培地に浸したアガロースゲル上で培養を行う。(b) *Acrosin-GFP* レポーターマウスの生殖細胞における GFP 発現。(c)培養中の組織像。(d)培養精巣組織 の PAS 染色像（鏃：伸長精子細胞）。

従来の精巣組織培養系では、生物由来のアルブミン製剤である AlbuMAX を使用することで精原細胞を精子へと分化誘導することができた。したがって、AlbuMAX は精子形成に必要な成分を含んでいると考えられたが、AlbuMAX のロット差による精子形成効率の不安定さが課題であったため、AlbuMAX から精子形成に関与する因子を同定することで組成の明らかな化学合成培地（chemically defined medium: CDM）の開発が進められている。先行研究において精子形成への関与が明らかとなっているレチノイン酸、テストステロン（T）、トリヨードチロニン（T3）、FSH、LH に加え、遊離脂肪酸、抗酸化物質、リゾリン脂質が精子形成を促進することが示された[14,15]。しかし、現行の CDM では精子形成の進行が観察される精細管が組織全体に対して限定的で、生

殖細胞の分化も円形精子細胞の段階で停止してしまうことで伸長精子細胞が観察されない。このため、CDM を用いた精巣組織培養では、より広範での精子形成誘導および半数体細胞の分化促進に必要な培養条件ならびに培地成分の同定が課題となっている。

本研究では、CDM を用いた *in vitro* 精子形成システムの改善を行うため、精巣組織培養に対する最適な酸素濃度の同定および後期精子形成（精子細胞の分化）に必要な追加因子の特定を目的とした。まず、従来の O_2 20%に対して 3 つの低酸素環境での精子形成活性を比較した結果、*in vitro* における生殖細胞の維持と分化には O_2 10%が適していることを明らかにした (第一章)。また、低酸素条件下での組織成長の制限に対処するため培地にグルコースとインスリンを添加したところ、培養組織の有意な増大を認めた。しかし、この成長促進は精子形成効率と相関しなかった (第二章)。続いて、半数体細胞の分化誘導に関与する因子を探索したところ、スフィンゴ糖脂質が伸長精子細胞形成を軽度に促進することを明らかにした (第三章)。本論文では、これらの研究結果および結果に対する考察を報告する。

第二編　本論

第一章　化学合成培地（CDM）を用いた精巣組織培養における酸素条件の最適化

要旨

精巣組織培養系は哺乳類の精子形成を体外で再現するツールとして有用である。近年開発が進められている化学合成培地（CDM）を用いることで、精子形成を円形精子細胞の段階まで誘導することが可能である。しかし、CDM 培養では精子形成が進行している精細管が限られ、減数分裂期以降の生殖細胞が少数である。また、誘導される半数体細胞は円形精子細胞の段階にとどまり、伸長精子細胞の誘導には至っていない。精子形成効率を向上させるためには、より多くの精原細胞を分化型へ移行させ、かつ分化段階を進める培養条件の最適化が必要である。本章では、CDM 培養下での精子形成効率向上を目的とし、酸素条件の最適化を行った。

生体内の酸素濃度は約 5%程度とされており、従来培養法の酸素濃度 20%より低いため、低酸素環境が精子形成に有利であると考えられた。これを踏まえ、精巣組織を O_2 20%、15%、10%、7%の 4 条件で培養し、減数分裂期以降の生殖細胞で発現する GFP を指標として計測した陽性領域の割合や産生された半数体細胞数を比較することで精子形成効率を定量的に評価した。その結果、低酸素条件（O_2 10%、7%）下では GFP 陽性領域率および円形精子細胞数が増加し、精子形成活性が向上した。特に O_2 10%条件では、組織の成長を大きく損なうことなく後期円形精子細胞も少数ながら観察された。一方、いずれの条件においても伸長精子細胞の誘導は確認されなかった。

以上により、CDM を用いた精巣組織培養において低酸素条件は円形精子細胞の誘導効率を高めることが示され、特に O_2 10%条件が精子形成活性と組織維持の両立に最適であることを明らかにした。本研究は、精細管微小環境における酸素の役割理解に新たな知見を提供する。

序論

近年、AlbuMAX 培地のメタボローム解析およびリピドーム解析を経て、半数体細胞まで誘導することが可能な CDM が開発された[14,15]。しかし、誘導された半数体細胞はいずれも円形精子細胞の段階にとどまっており、伸長精子細胞の誘導には至っていない。さらに、精子形成が進行している精細管は AlbuMAX 培地や生体組織に比べて限定的であり、減数分裂期以降へと分化している生殖細胞が少ない。CDM を用いた精巣組織培養において精子形成効率を向上させるためには、より多くの精原細胞を分化型へと移行させ、また、精子細胞の分化段階を促進させる培養条件の最適化が必要である。

従来の培養系は大気中の酸素濃度と同等の O_2 20%で維持されてきた。しかし、生体内の酸素分圧は約 40 mmHg（O_2 5%相当）とされており、さらに精細管内は 2 mmHg 程度まで低下するとの報告もある[16]。このことから、低酸素条件下での培養が精子形成に適していると考えられた。実際、最近の研究によって AlbuMAX を用いた精巣組織培養は低酸素条件下で精子形成効率が改善されることが報告されており[17–19]、酸素条件の最適化は *in vitro* 精子形成系の効率を向上させるために重要な要素であると考えられた。

本章では、CDM を用いた精巣組織培養系における酸素濃度の影響を評価した。従来の酸素条件である O_2 20%に加え、低酸素条件（O_2 15%、10%、7%）を設定して培養を行った。各条件下の精巣組織における精子形成活性領域の割合や誘導された半数体細胞の数によって精子形成効率を評価した。精子細胞は形態学的特徴に基づき step 1 から step 16 までに分類され、円形精子細胞（step 1–8）から核の凝縮と伸長を伴う伸長精子細胞（step 9–16）へと分化が進行する[20,21]。伸長精子細胞はさらに、核の伸長が開始・進行する伸長期精子細胞（elongating spermatids; step 9–12）と、核の凝縮と伸長が概ね完了した精子細胞（elongated spermatids; step 13–16）に区別される。本研究では、これらの分化段階を踏まえ、各培養条件下で精子形成がどの段階まで進行したかを評価した。

実験方法

実験動物

本研究では *Acrosin-GFP/Prm1-H3.3-mCherry* ダブルトランスジェニックマウス[13,22]を使用した。本マウスでは減数分裂のパキテン期 stage IV 以降の精母細胞の細胞質で GFP が発現し、精子細胞の先体内に集積していくと同時に、step 11 以降の伸長期精子細胞の核で mCherry が発現する。マウスは SPF（Specific Pathogen Free）環境の空調管理室（24±1℃、55±5%湿度、12 時間明期-12 時間暗期）で飼育され、飼料は市販の硬質ペレット（MF ; オリエンタルイースト）を自由摂取させた。飲用水は塩酸で pH 2.7-3.0 に酸性化した。全ての動物実験は「動物実験の適正実施に関する指針」に基づき、横浜市立大学実験動物委員会（承認番号 : F-A-20-038, 23-012）の承認を得て実施された。

培養法

生後 1.5 日の雄マウスから精巣を採取した。白膜を除去した後、各精巣を約 1mm³の断片に分割した。組織片は 12 ウェルプレート内のアガロースゲルブロック上に配置した。アガロースゲルは、アガロース粉末（346-00072, Dojindo）を Milli-Q 精製水に 1.5%(w/v)で溶解し、オートクレーブで滅菌後に 33 mL/10 cm dish で注いで厚さ 5 mm に揃えた。培養前に 10 mm 角に切り出し、1 mL の培地に 6 時間以上浸漬して準備した。組織は 34℃、CO_2 5%、および 4 種類の酸素濃度（20%、15%、10%、または 7%）に設定されたインキュベータ内で培養された。培地は週 1 回、0.5 mL/ウェルで交換した。

AlbuMAX の調製

AlbuMAX™ I（11020-021, Gibco）を 2 倍濃縮の α-MEM（12000-022, Gibco）に最終濃度 40 mg/mL で添加し 2 時間攪拌して溶解した。抗生物質・抗真菌剤（02892-54, NACALAI TESQUE）を 100 倍希釈濃度で添加し後、pH 調整のため $NaHCO_3$を最終濃度 1.82 g/L で添加した。最終体積まで Milli-Q 水を加え、フィルター滅菌（S2GPT02RE, Millipore）し、4℃で保存した。

ウシ血清アルブミン（BSA）の精製

CDM 調製準備として、Iscove 法[23]によりウシ血清アルブミン（BSA）の精製を行った。10 g の BSA (A9418, Sigma-Aldrich)を 37℃で 2 時間、200 rpm で攪拌し 100 mL の Milli-Q 水に溶解させた。同時に、デキストラン被覆炭を作るため、0.2g のデキストラン (D299100, TRC)を 100 mL の Milli-Q 水へ溶解させたのち、2 g の活性炭 (034-02125, Wako)を加えて RT 30 分間攪拌した。

木炭溶液は 2960 RCF で 15 分間遠心した後、上清を捨て Milli-Q 水 100 mL で再溶解した。続いて BSA 溶液と木炭溶液を混合し、攪拌しながら HCl (5 M)を滴下して pH を 3.0 に調整した。混合物を 60℃で 2 時間加熱しながら 200 rpm で撹拌したのち、2960 RCF で 15 分間遠心し、上清を回収した。上清液を NaOH (5 M)で pH を 5.5 に調整し、孔径 0.22 μm のミリポアフィルター(S2GPT02RE, Millipore)で残りの炭を除去した。この溶液を、20 g のイオン交換樹脂 Bio-Rex™ MSZ 501 (D) Resin (142-7245, BIO-RAD)を用いて 4℃で一晩脱イオン処理を行った。翌日、孔径 70 μm のフィルターpluriStrainer (43-50070-51, pluriSelect)を用いて樹脂を除去したのち、超遠心フィルターVivaspin Turbo 15 [MWCO 10,000] (VS15T01, sartorius)を用いて 4℃、2960 RCF で約 30 分間濃縮した。HCl (1 M)で pH を 7.0 に調整した後、孔径 0.22 μm のミリポアフィルター(S2GPT02RE, Millipore)を用いて滅菌し、4℃で保存した。精製された BSA の濃度は Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (5000205, BIO-RAD)で測定した。濃度は概ね約 150 mg/mL に落ち着いた。

CDM の調製

遊離脂肪酸を空のビーカーに注ぎ、溶媒を蒸発させた。蒸発後、上記の精製 BSA 溶液を最終濃度 40 mg/mL になるよう加え、37℃、200 rpm で 2 時間撹拌し脂質を溶解させた。その後、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、リゾリン脂質、ビタミン A、ホルモン、抗酸化物質を添加した。2 倍濃縮 α-MEM を室温に戻し、最終溶液の半分の量で BSA 溶液と混合した。AlbuMAX 培地と同様に NaHCO3 溶液および抗生物質-抗真菌剤を添加し、最終容量まで Milli-Q 水を添加した。孔径 0.22 μm のミリポアフィルター(S2GPT02RE, Millipore)を用いて滅菌し、4℃で保存した。CDM の詳細な組成およびそれぞれの終濃度は以下の表 1 に示す。

表 1 CDM の組成

基礎培地	α-MEM	
	精製 BSA	40 mg/mL
ビタミン A	レチノール	1 μM
	レチノイン酸	1 μM
遊離脂肪酸	オレイン酸	600 μM
	ステアリン酸	600 μM
	パルミチン酸	600 μM
	リノール酸	100 μM
	リノレン酸	50 μM
その他脂質	コレステロール	3.5 μg/mL
	スフィンゴミエリン	3.2 μg/mL
	ホスファチジルコリン	20 μg/mL

ホルモン	T	1 μM
	T3	2 ng/mL
	LH	1 ng/mL
	FSH	1 ng/mL
抗酸化物質	ビタミン C	500 μM
	ビタミン E	500 μM
	グルタチオン	500 μM
リゾリン脂質	LPC	100 μg/mL
	LPA	10 μM

観察方法

培養組織は GFP 励起光源を備えた実体顕微鏡（Leica M205 FA; Leica Microsystems）を用いて週 1 回観察した。GFP 発現を半定量的に評価するため、培養精巣組織に対する GFP 陽性領域の比率を算出した。組織の水平投影面積および GFP 陽性領域は、生物学的画像解析用オープンソースプラットフォームである Fiji を用いて測定した。GFP 陽性領域率はマウス精子形成の開始と進行を評価する信頼性の高い指標として機能し、これは先行研究でも確認されている[19,24]。6 週間培養を行ったのち、伸長精子細胞マーカー mCherry を観察するため培養組織を PBS で湿らせたガラススライドに移し、カバーグラスで覆い、倒立顕微鏡（オリンパス IX 73 ; Olympus）で観察した。

組織学的および免疫組織化学的分析

培養終了後、一部の精巣組織をブアン液で固定してパラフィン包埋した後、4 μm 厚の切片を作製し H-PAS 染色による組織学的評価を行った。他の組織は 4%パラホルムアルデヒドで固定し、O.C.T. Compound（45833, サクラファインテックジャパン）で凍結包埋した後、7 μm 厚で切片化し免疫染色を行った。本章で使用した抗体および染色剤を以下に示す (表 2)。免疫染色したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡（AX; Nikon）で観察した。

表 2 本章で使用した抗体および染色剤の一覧

Antibodies and fluorescent stains	**Dilution**	**Manufacturer**	**Identifier**
Antibodies			
Chicken anti-GFP	1:1000	Abcam	ab13970

Rabbit anti-RFP	1:1000	Medical & Biological Laboratories	PM005
Rabbit anti-Calmegin	1:200	Custom-made	N/A
Goat anti-Chicken IgY (Alexa Fluor 488)	1:200	Invitrogen	A11039
Donkey anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor Plus 555)	1:200	Invitrogen	A32794
Goat anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor Plus 647)	1:200	Invitrogen	A32733TR
Fluorescent stains			
Alexa Fluor 568-conjugated peanut agglutinin	1:200	Invitrogen	L32458
Alexa Fluor 647-conjugated peanut agglutinin	1:200	Invitrogen	L32460
Hoechst 33342	1:1000	Nacalai Tesque	23491-52-3

統計解析

データは平均値±標準誤差（SEM）で示した。本章の統計解析は、各データの性質に応じて unpaired t test または Brown-Forsythe and Welch ANOVA を用いて実施した。統計的有意性は*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001 と定義した。全ての解析は GraphPad Prism 10（version 10.5.0；GraphPad Software）を用いて実施した。

結果

第一節　CDM における *in vitro* 精子形成の定量的再評価

本研究では、*in vitro* での精子形成効率を定量的に評価するため、減数分裂期以降の生殖細胞で発現する GFP を指標として用いた。組織全体の面積に対する GFP 陽性領域の比率を算出し、これを精子形成効率として評価した（図 2）。

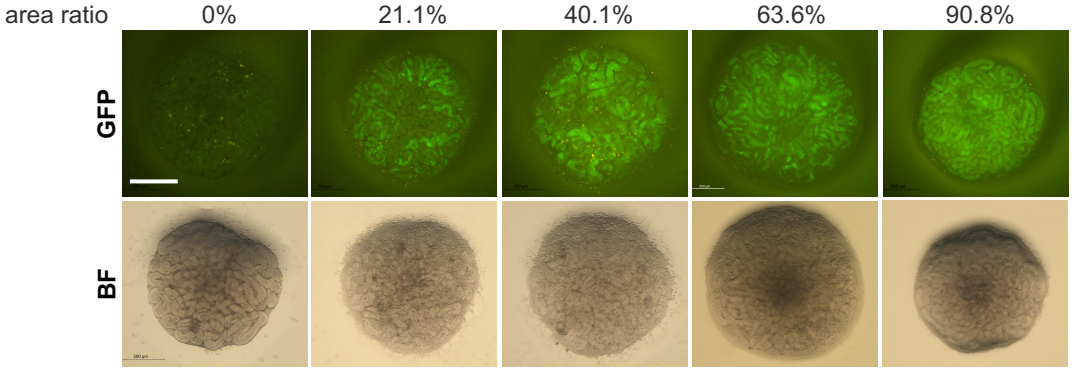

図 2　代表的な培養精巣組織像。GFP 陽性領域比率の増加順に示した。スケールバー：500 μm。

従来の精巣組織培養研究では 5 段階の視覚的スコアリングシステムに依存していたが[12,25]、本研究では画像解析ソフトウェアを採用することで精度向上を図った。CDM の精子形成能をより詳細に評価するため、この定量的手法を用いて AlbuMAX 培地を用いて培養した組織との比較を行った。その結果、CDM を用いて培養した組織は AlbuMAX 培養組織よりも GFP 陽性領域率が低いことを明らかにした。ここでは、代表例として 4 週間培養時の組織像を示す（図 3a）。さらに、各群 15 サンプルを用いて 6 週間の経時変化を解析したところ、CDM 群では培養期間を通じて GFP 陽性領域比率が低値で推移し、AlbuMAX 群のような顕著な増加は認められなかった（図 3b）。また、組織学的解析の結果、AlbuMAX 培地では円形精子細胞および伸長精子細胞の両方が確認された。これに対し、CDM では精子形成が円形精子細胞の段階で停止しており、伸長精子細胞の誘導は認められなかった（図 3c）。

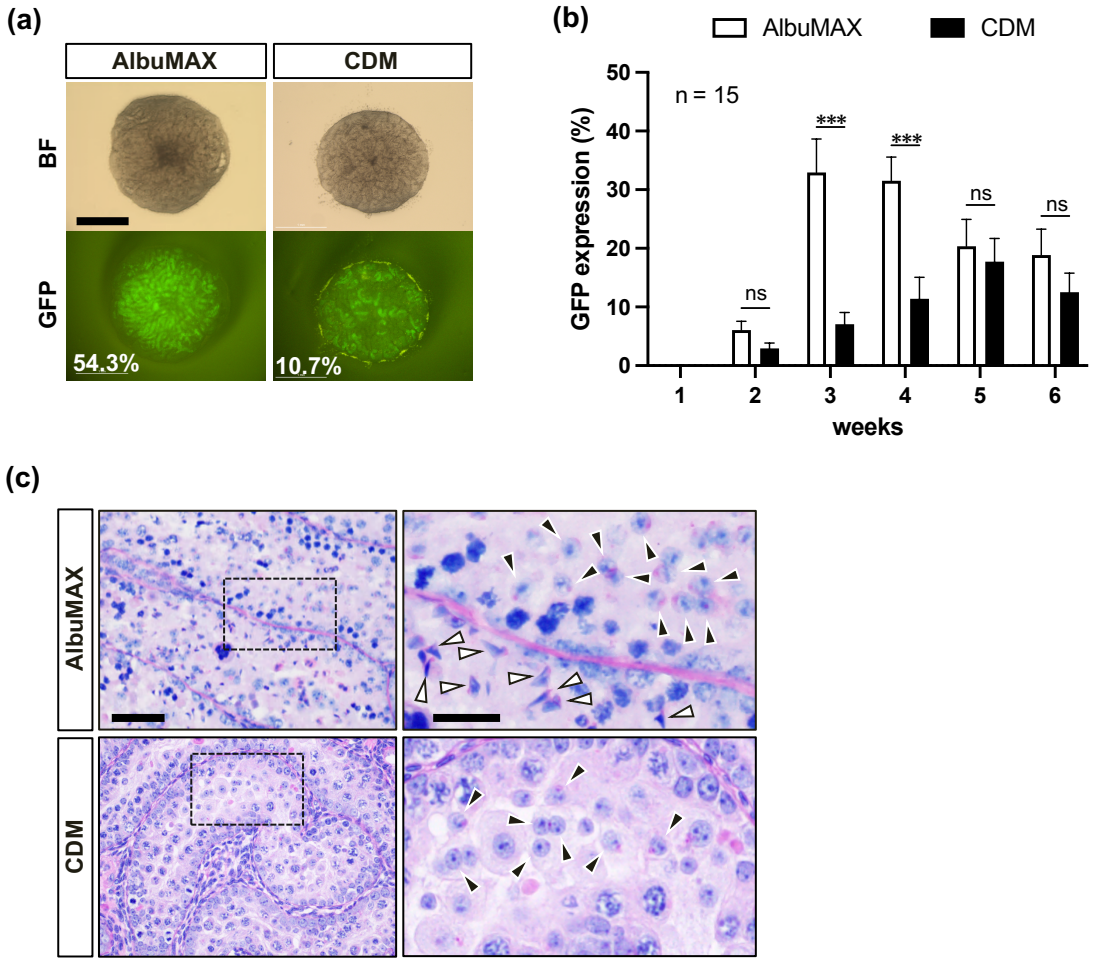

図 3　CDM を用いた精巣培養の再評価：AlbuMAX 培地との比較

(a) 精巣組織を AlbuMAX または CDM で 4 週間培養した。スケールバー：1 mm。(b) AlbuMAX 培地と CDM における培養精巣組織の GFP 陽性領域比率の定量的比較（unpaired t test, *** P＜0.001）。(c) 培養 6 週間後の精巣組織の PAS 染色像。AlbuMAX 群では伸長精子細胞（白鏃）が確認されたが、CDM 群では検出されなかった。円形精子細胞（黒鏃）は両群で観察された。左図中の破線四角で示した領域の拡大像を右図に示す。スケールバー：左 50 μm、右 20 μm。

第二節　CDM を用いた体外精子形成における酸素条件の最適化

CDM を用いた培養において酸素濃度が精子形成に及ぼす影響を明らかにするため、精巣組織を O_2 20%（従来法）、15%、10%、7% の 4 条件で培養し、精子形成効率を比較した。GFP 陽性領域率を算出したところ、O_2 20%に比べて 3 種の低酸素条件すべてで高い値が示された（図 4a, b）。特に O_2 10% および 7%では GFP 陽性領域率の増加が顕著であり、CDM を用いた精巣組織培養では低酸素条件が精子形成の進行に有利に働くことを明らかにした。なお、O_2 10%と 7%間の GFP 陽性領域率には有意差がなかった。

また、明視野画像から、酸素濃度の違いに伴い組織サイズが変化していることが示唆されたため、各酸素濃度における組織の成長率を比較した。その結果、酸素濃度が高い条件ほど精巣組織が大きく成長する傾向にあった（図 4c）。これらの結果から、酸素濃度の高い 2 群（O_2 20%、15%）では GFP 陽性領域率が低いものの全体的な組織面積はより大きく維持されており、低酸素条件 2 群（O_2 10%、7%）では対照的に GFP 陽性領域率が高いものの組織サイズの拡大が抑制されていたことが示された。また、O_2 10%、7%では培養 1 週間以降に組織中心部の暗色化および精細管構造の萎縮が観察された。

GFP 陽性領域率の向上と組織の成長抑制という、相反する結果から、GFP 陽性領域率だけでは実際の活性領域の大きさを正確に反映していない可能性が生じた。そこで、各条件における GFP 陽性領域を計測し、酸素条件ごとの精子形成活性を補完的に評価した。その結果、GFP が発現し始める培養 2 週目以降、培養終了する 6 週目までの全期間にかけて、O_2 10%で最大の GFP 陽性領域が維持されていた（図 4d）。

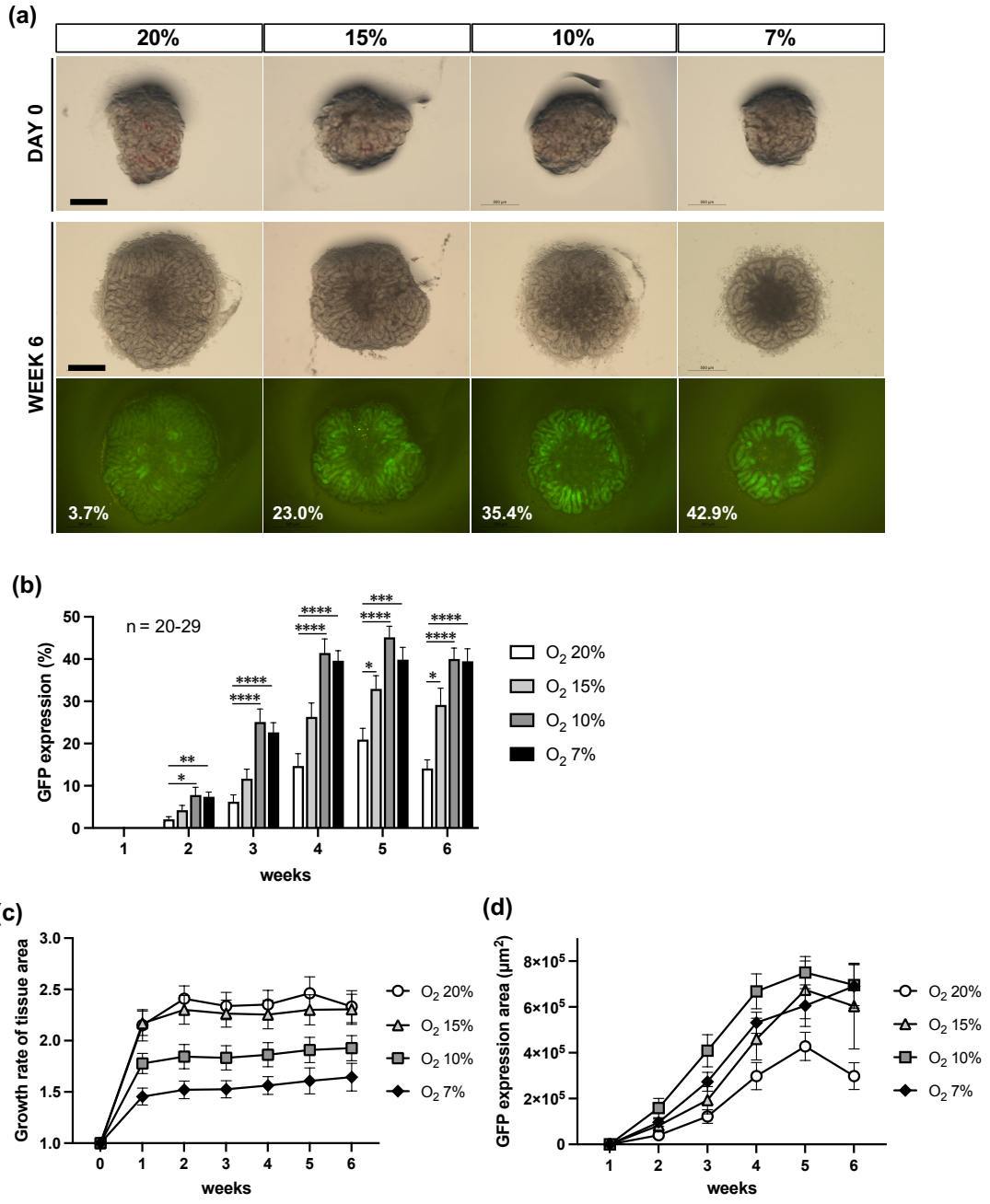

図 4　酸素濃度が培養精巣組織の精子形成効率と組織成長に及ぼす影響

(a) 精巣組織を異なる酸素濃度（20%、15%、10%、7%）下で培養した。培養 0 日目（上段）および 6 週間培養後（中段・下段）の代表的組織像を示す。スケールバー：500 μm。(b) 培養組織における GFP 陽性領域の割合。低酸素条件で GFP 陽性領域比率が増加する傾向が認められた（Brown-Forsythe and Welch ANOVA , *P＜0.05, **P＜0.01, ***P＜0.001, ****P＜0.0001）。(c) 組織の成長率（0 日目に対する総面積の変化率）。O_2 20%および 15%下では成長が促進され、O_2 10%および 7%下では成長が抑制された。(d) 培養期間中の GFP 陽性領域の絶対面積。2 週目から 6 週目にかけて、O_2 10%下で精子形成が最も活発であった。

第三節　低酸素条件下における CDM 培養での半数体細胞誘導の増加

精子細胞分化の進行度を評価する目的で、step 11 以降の伸長期精子細胞の核で発現する mCherry を観察した。O_2 20%および 15%では mCherry の発現は認められなかったが、O_2 10%および 7%では低頻度（10%：3/35 組織、7%：4/28 組織）で mCherry 陽性細胞が観察された（図 5a）。しかし、免疫染色の結果、これらの細胞は成熟した伸長精子細胞に特徴的な核の伸長形態を示さず、円形の核形態を保持していた（図 5b）。このことは、低酸素条件で誘導された mCherry 陽性細胞が完全な伸長精子細胞へは到達していないことを示唆していた。

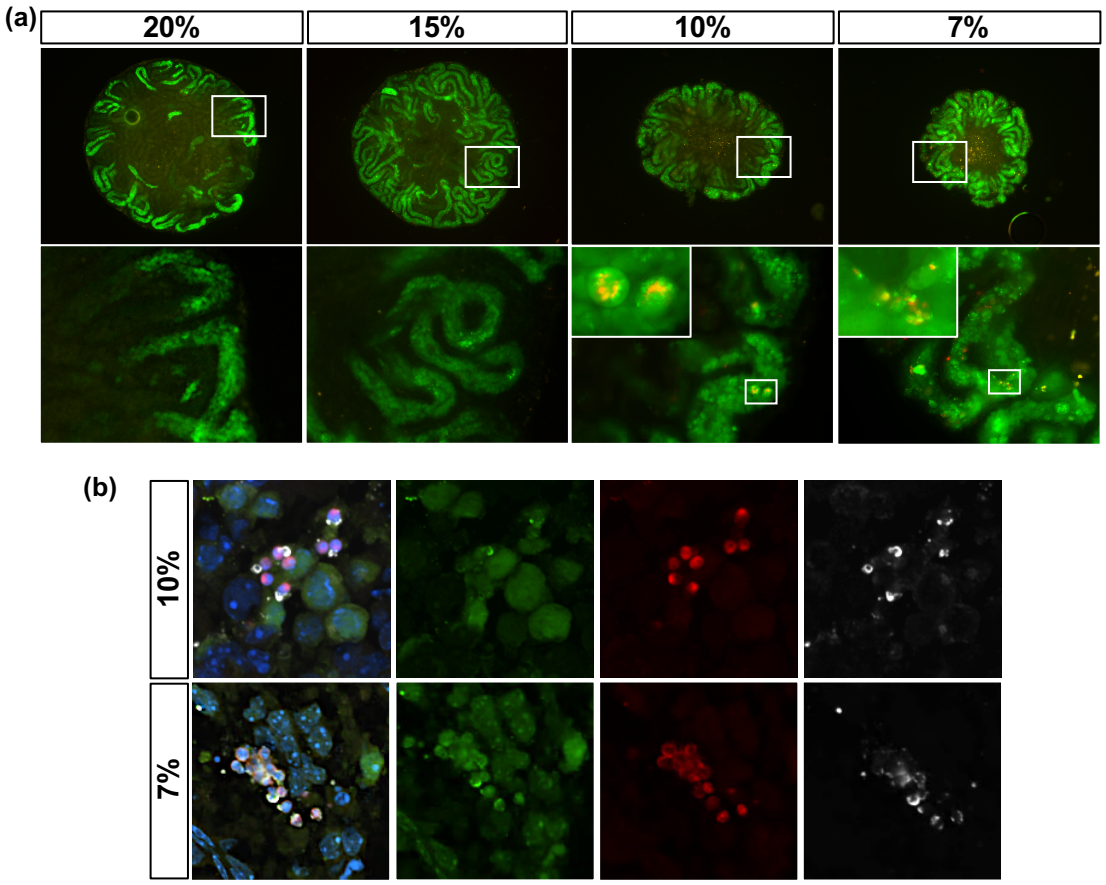

図 5　各酸素条件下における半数体細胞の分化段階評価

(a) 6 週間培養後、mCherry を発現する精子細胞を示す蛍光顕微鏡画像。O_2 20%および 15%では観察されず、O_2 10%および 7%下でも稀にしか検出されなかった。スケールバー：上 500 μm、下 100 μm。

(b) 半数体細胞マーカーである PNA レクチンと mCherry に対する免疫蛍光染色。mCherry 陽性細胞は PNA で染色されたが、核は伸長形態を示さず円形を保った。スケールバー：25 μm。

続いて、各酸素濃度下で精子形成がどの段階まで進行したかを評価することを目的として、Calmegin および PNA レクチンの二重染色を行った。Calmegin は初期パキテン期精母細胞から円形精子細胞 step 4 まで発現するため、精母細胞から初期円形精子細胞の指標として用いた。一方、PNA はアクロソーム形成に伴い円形精子細胞以降に発現するため、半数体細胞の指標として用いた。これを踏まえ、Calmegin のみ陽性の細胞は精母細胞、Calmegin と PNA の共陽性細胞は初期円形精子細胞、PNA のみ陽性の細胞は後期円形精子細胞に相当すると判断した。その結果、4 群すべてで円形精子細胞が誘導されていることを確認した（図 6a）。O_2 20%および 15%では初期円形精子細胞のみ観察されたが、O_2 10%と 7%では少数ながら後期円形精子細胞が観察された。さらに、H-PAS 染色によりアクロソームキャップが観察された円形精子細胞について切片ごとの細胞数を定量・比較したところ、低酸素濃度下で誘導効率が高まる傾向が認められた（図 6b, c）。O_2 10%群と O_2 7%群で、O_2 20%群に比べ有意に高い円形精子細胞数が確認され、両群間には有意差は認められなかった。また、統計的有意差には達しなかったものの（$P = 0.0591$）、O_2 15%群でも同様に増加傾向が認められた。

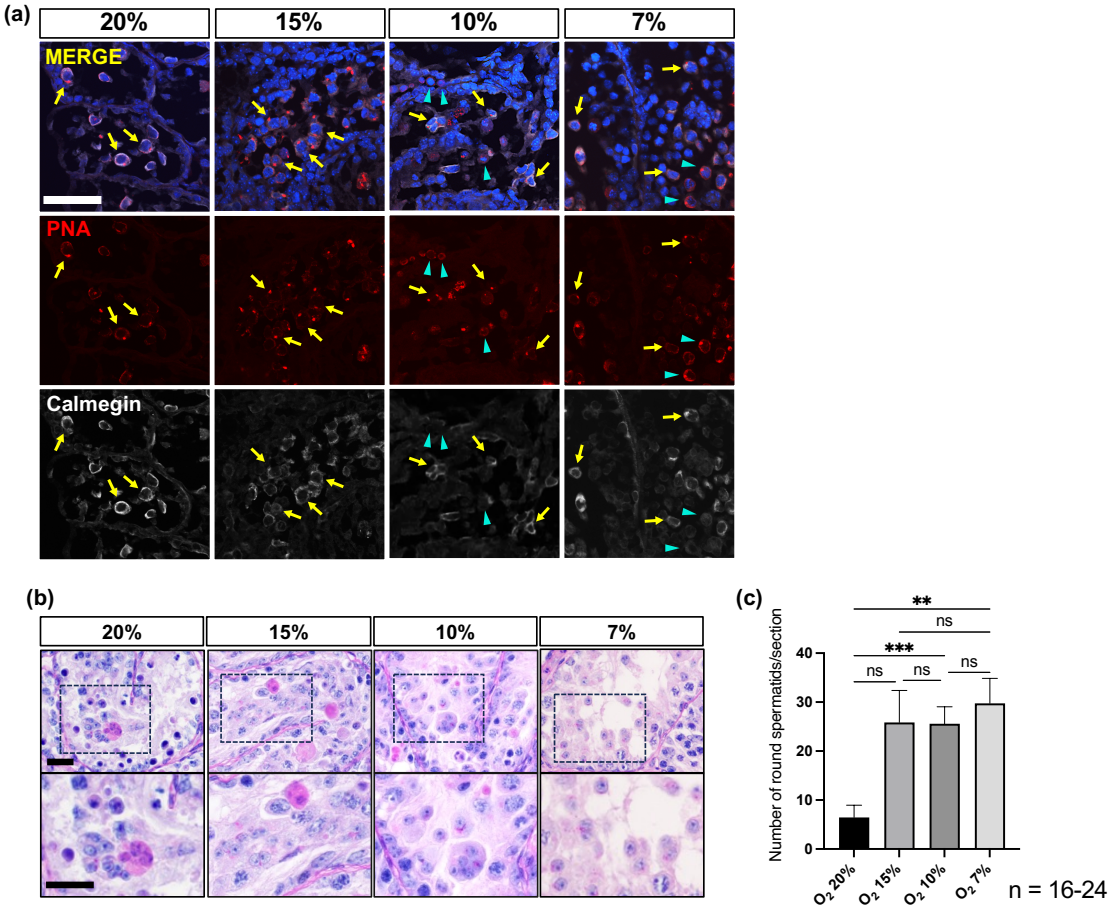

図 6　酸素濃度が培養精巣組織の円形精子細胞誘導に及ぼす影響

(a) PNA レクチンおよび Calmegin に対する免疫蛍光染色。全ての酸素濃度条件下で PNA と Calmegin を共発現している初期円形精子細胞（矢印）が観察された。O_2 10%と 7%では後期円形精子細胞（鏃）がわずかに観察された。スケールバー：50 µm。(b) 6 週間培養後の精巣組織の PAS 染色。スケールバー：20 µm。(c) 切片あたりの円形精子細胞数の定量比較。円形精子細胞数は O_2 10%もしくは 7%下で最も多く誘導された（Brown-Forsythe and Welch ANOVA, **P＜0.01, ***P＜0.001）。

小括・考察

本研究ではまず、CDM を用いた培養系における精子形成効率の向上を目的として酸素条件の最適化を行った。低酸素環境下で培養した結果、GFP 陽性領域率および円形精子細胞数の増加が確認され、精子形成活性の向上が示された。試験した低酸素条件のうち、O_2 10%および 7%条件はいずれも対照群と比較して著しい改善をもたらした。両条件とも高い精子形成効率を示したが、10%と 7%の間で GFP 陽性領域率および誘導された円形精子細胞数に有意差は認められなかった。したがって低酸素条件による精子形成促進効果はこの濃度域でほぼ飽和している可能性が示唆された。また、酸素濃度が低くなるにつれて組織成長が抑制されることが確認された。さらに、低酸素条件では組織中心部に壊死様の構造変化が観察され、特に O_2 7%下で広範に認められた。臓器培養では中心部への酸素および栄養拡散が不十分となり、中心壊死が生じやすいことが報告されている[26]。このことを踏まえると、本研究で観察された中心部の変性も、低酸素環境下での拡散不良が組織の構造維持に影響した可能性を示唆している。以上より、精子形成活性の増強と組織維持の両立を考慮すると、(1) 円形精子細胞数の増加がより顕著であること、(2) 組織成長に対する抑制が比較的軽度であること、(3) 組織中心部の変性が最も軽度に抑えられていたことの 3 点から、O_2 10%条件が最も安定した培養条件であると考えられる。

低酸素条件が精子形成に有利に働いた理由として、生体内精細管内の酸素濃度に近い環境が再現され、酸化ストレスの低減や分化に適した微小環境が維持されたことが考えられる。一方で、酸素濃度の低下は生殖細胞や支持細胞の増殖を通じて組織成長に影響を与える可能性もある。精子形成活性の向上と組織維持を両立させるためには、酸素濃度の適切な設定が重要である。

なお、生体精巣における精細管内部の実際の酸素張力を正確に測定することは技術的に困難であり、現在までに信頼性の高いマウスにおける直接測定データはほとんど存在しない。参考として、ラットでは精巣間質の酸素張力が精巣動脈血の約 20%（12–15 mmHg）であることが示されており、精細管内はこれよりも低いと推定されているが、その実測値には議論が残る[27]。このように、生体を用いて精子形成と酸素濃度の関係を体系的に理解することは容易ではなかった。個体レベルでは高地環境などの低酸素状態で精子形成能が低下することが古くから報告されている[28,29]。しかし、生体における低酸素応答は呼吸調節や赤血球生成の増加といった全身レベルの反応、血管新生などの組織レベルの反応、さらに代謝制御などの細胞レベルの反応といった多階層の適応機構を伴う。そのため、全身性低酸素状態で見られる精子形成障害が、精巣局所の酸素環境の変化に起因するものなのか、それ以外の生体応答の影響によるものなのかを切り分けて評価することは困難であった。

本研究は、精巣組織培養系を用いることで体循環、内分泌調節、免疫系などの要因を排除し、酸素条件が精巣内部の精子形成過程に与える直接的影響を検証することを可能にした。その結果、O_2 10%が精子形成活性と組織維持の両立に最適であることを明らかにした点は、精細管微小環境における酸素の役割理解に新たな知見を提供するものである。

AlbuMAX を用いた橋本らの先行研究では、酸素濃度の低減により伸長精子細胞の誘導効率が大幅に向上していた[19]。同様に、本研究の CDM を用いた培養においても円形精子細胞の誘導効率が向上し、O_2 10%および 7%条件下では後期円形精子細胞も少数ながら観察された。したがって、酸素濃度の低減は精子形成活性、すなわち分化過程に進む生殖細胞数の増加に寄与することが示された。一方で、低頻度で観察された mCherry 陽性細胞は核が円形のままであり、伸長精子細胞に特徴的な核形態変化が確認されなかった。したがって、伸長精子細胞の誘導には CDM 組成の改善や他の補助因子の供給が必要であると考えられる。

なお、橋本らの PDMS-ceiling chip（PC）法（図 7; [30]）を用いた先行研究では O_2 15%が最も有効とされたが、本研究では PC 法でない条件下で 10%酸素が最高の精子形成効率を示した。この相違は、PC chip の使用有無による酸素供給量の差で説明できる。前研究では高酸素透過性 PDMS 製 PC を組織上に配置して組織を平面化することで酸素・栄養素の均一な拡散を促進していたが、PC は同時に組織への総酸素供給量を制限していた。PDMS は酸素透過性を有するものの[31]、開放空間と比較すると拡散経路が制限される。一方、本研究では PC を省略したため、精巣組織単位あたりの酸素利用可能性が相対的に高くなっていたと考察できる。このことから、前研究の $O_2$15%＋PC 条件下の実効酸素供給量は、本研究の PC なし O_2 10%条件に近い条件であったと考えられる。

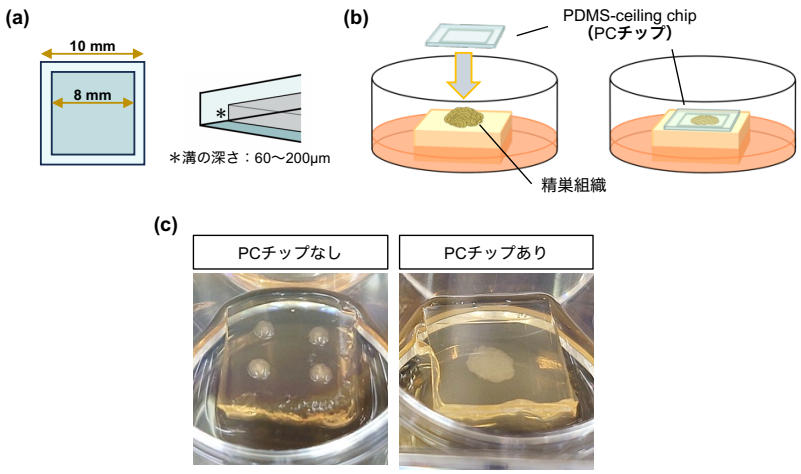

図 7　PDMS-ceiling chip を用いた精巣組織培養（PC 法）の模式図
(a) PDMS-ceiling chip（PC チップ）の模式図。培養する精細管の太さに合わせて溝の深さを 60～200μm で作成して使用する。(b) PC チップ設置法。アガロースゲル上に精巣組織を設置後、溝面を下にして PC チップを乗せる。 (c) PC チップ使用時の精巣組織像。
本模式図は、既報の総説[30]を基に本研究用に一部改変して作成した。

第二章　グルコースおよびインスリン添加が培養下の組織成長と精子形成に及ぼす影響

要旨

円形精子細胞は伸長精子細胞形成の基盤となる半数体細胞であり、その誘導効率を高めることは精子細胞の分化過程を解析する上で重要である。前章の検討により、酸素濃度を低下させることで円形精子細胞の誘導効率が向上する一方で、組織成長は抑制されることを明らかにした。このことから、低酸素条件下で精子形成活性を維持しながら組織成長を促進させる手法の開発が必要であった。

本章では、CDM にグルコースおよびインスリン（G-ITS）を添加し、低酸素条件下で培養した精巣組織の成長と精子形成への影響を評価した。培養は O_2 10%および 7%条件下で行い、組織成長率、GFP 陽性領域、半数体細胞数を指標として解析した。その結果、G-ITS 添加により組織は顕著に増大し、高い成長促進効果を示した。一方で、GFP 陽性領域率は低下傾向を示し、GFP 陽性領域は組織の増大と同程度までは拡大しないことを明らかにした。さらに、円形精子細胞数には有意な増加が認められず、伸長精子細胞も誘導されなかった。EdU 解析の結果、G-ITS 添加群では主としてセルトリ細胞が増殖しており、生殖細胞の増殖率には変化がなかった。

以上より、G-ITS 添加による組織増大は、低酸素条件での高い精子形成効率を完全に維持するには至らなかった。また、G-ITS 添加は生殖細胞の分化を促進しないこと、さらに組織増大はセルトリ細胞の増殖によるものであることを明らかにした。本章は、精巣組織培養において組織成長と生殖細胞の分化促進は独立に最適化する必要があることを示した。

序論

円形精子細胞は減数分裂を経た直後の半数体細胞であり、後続の伸長精子細胞形成に至る分化過程の基盤となる細胞集団である。そのため、円形精子細胞の誘導効率を高めることは、伸長精子細胞形成過程を解析する上で重要な前提条件である。前章の検討により、CDM を用いた精巣組織培養において酸素濃度の低減により円形精子細胞の誘導効率を向上させることに成功した。一方で、同条件下では培養組織の成長が抑制される傾向があり、組織成長や細胞数の増加が制限されることで分化した生殖細胞の母集団全体への影響が懸念される。

実際、低酸素条件では円形精子細胞は誘導されるものの、後期円形精子細胞はごく少数しか観察されなかった。誘導される円形精子細胞数がさらに増加すれば、後期円形精子細胞や mCherry 陽性細胞の絶対数が増加し、分化過程に関する再現性の高い解析および統計評価が可能になると考えられる。さらに、生体では半数体細胞が大量に産生されることから、*in vitro* 系においても円形精子細胞の誘導数を増やすことで生理条件の再現性を高め、培養系の信頼性および精子形成モデルとしての妥当性を向上させる上で重要である。

我々の先行研究では、新生仔マウスの精巣組織培養における成長因子および栄養因子の効果を評価しており、その中でインスリンが組織成長を支持する主要因子であることを報告している[32]。しかし、本研究に先立つ予備実験において CDM にインスリンを添加した条件を検討したところ、組織増大効果は限定的であった。インスリンは細胞内へのグルコース取り込みや代謝活性化を促進することで作用するため、培地中のエネルギー基質、特にグルコースが不足している条件では十分な効果を示さない可能性が示唆された。これを踏まえ、インスリンの作用を補完する目的でグルコースを追加補充したところ、組織増大効果を認めた。グルコースの添加濃度については、高グルコース DMEM の濃度 4.5 mg/mL を参考とし、CDM の基礎培地 α-MEM に既に 1 mg/mL 含まれていることを考慮した上で 1 mg/mL と 3 mg/mL を比較した。その結果、1 mg/mL が適切であると判断したため、本研究ではこの濃度を採用した。

以上より、本章では低酸素条件下で精子形成活性を維持しつつ、培養組織の成長を促進するために CDM にグルコースおよびインスリンを添加した。具体的には、(1) 組織の成長をどの程度増大させられるか、(2) 精子形成効率を維持したままでより多くの分化した生殖細胞（円形精子細胞）を誘導できるか、(3) 組織増大がどの細胞種の変化によって起きているか、の 3 点を検討した。

実験方法

実験動物

第一章の実験動物を参照。

培養法

第一章の培養法を参照。本章ではインキュベータの酸素濃度を 10%、7%の 2 種類に設定した。

培地の調製

第一章の CDM の調製を参照。本章では、CDM に以下の試薬を添加した：グルコース（049-31165、Wako；最終濃度 1 mg/mL）、Insulin-Transferrin-Selenium（41400-045、Gibco/Thermo Fisher Scientific；100 倍希釈）。

観察方法

第一章の観察方法を参照。

組織学的および免疫組織化学的分析

第一章の組織学的および免疫組織化学的分析を参照。本章で使用した抗体および染色剤を以下の表 3 に示す。本章の一部実験では、培養 6 日目に精巣組織に EdU を投与し、培養 7 日目に組織を収集後、EdU 染色および免疫染色を実施した。

表 3 本章で使用した抗体および染色剤の一覧

Antibodies and fluorescent stains	**Dilution**	**Manufacturer**	**Identifier**
Antibodies			
Mouse anti-DDX4/MVH	1:500	Abcam	ab27591
Rabbit anti-SOX9	1:200	TransGenic Inc.	KO608
Goat anti-Mouse IgG (Alexa Fluor 488)	1:200	Invitrogen	A28175
Donkey anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor Plus 555)	1:200	Invitrogen	A32794
Fluorescent stains			
Hoechst 33342	1:1000	Nacalai Tesque	23491-52-3
Click-iT Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor 647 dye	—	Invitrogen	C10640

統計解析

第一章の統計解析を参照。本章の統計解析は Brown-Forsythe and Welch ANOVA を用いて実施した。

結果

第一節　グルコースおよびインスリン添加による培養精巣組織の成長と精子形成への影響

グルコース、インスリンを添加した CDM（CDM+G-ITS）を用いて O_2 10%および 7%下で培養した組織は、それぞれ添加していない対照群と比較して組織サイズが顕著に増大した（図 8a, b）。しかし、GFP 陽性領域率を算出したところ、両酸素条件下で G-ITS 添加により比率が低下する傾向がみられ、特に培養後期（5〜6 週目）の O_2 7%群で明瞭であった（図 8c）。G-ITS の添加により GFP 陽性領域率が低下する一方で組織サイズが増大することを受け、これらを総合的に評価するため GFP 陽性領域の面積値を比較した。その結果、O_2 10%では組織増大の影響が大きく、GFP 陽性面積値は培養期間を通じて最高値を示した（図 8d）。また、O_2 7%では組織サイズの増大が GFP 陽性領域率の低下に相殺され、面積値は全体としてほとんど変化しなかった。

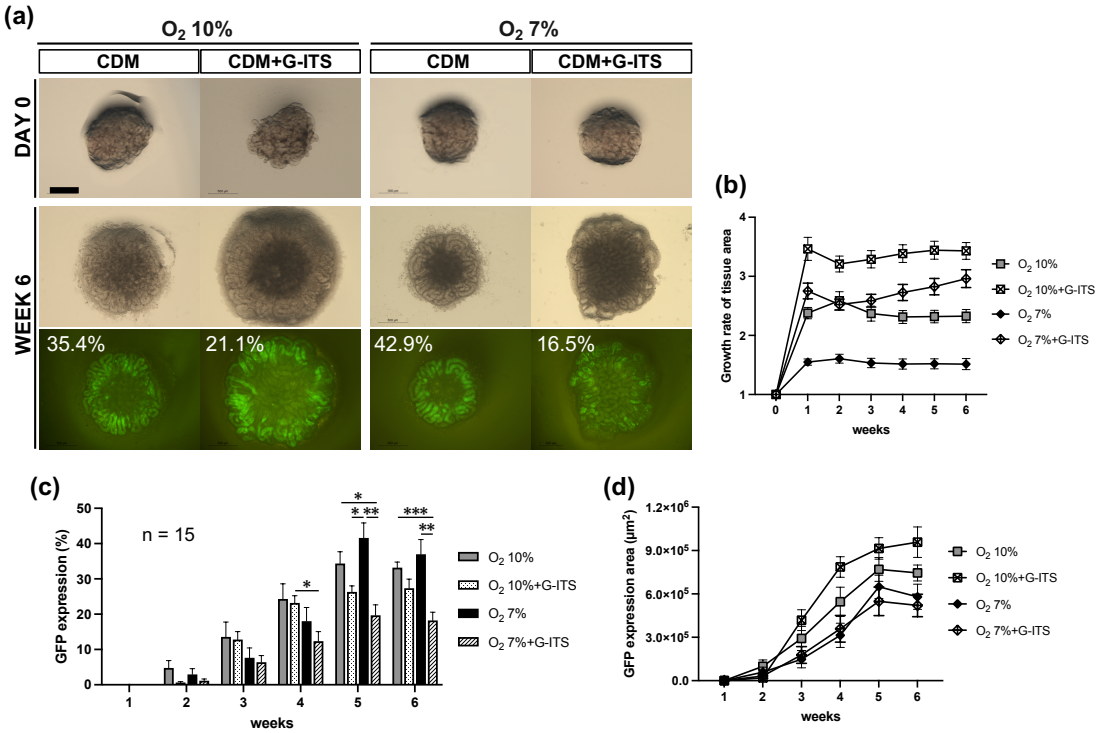

図 8　低酸素条件下における G-ITS 添加が組織成長および GFP 発現に及ぼす影響

(a) 培養 0 日目および 6 週間目の精巣組織像。G-ITS 添加は両酸素濃度において顕著な組織増大を促進した。スケールバー：500 μm。(b) 0 日目に対する組織の成長率。G-ITS 添加により、最終成長率が O_2 10%では約 2.5 倍から約 3.5 倍、O_2 7%では約 1.5 倍から約 3 倍となった。(c) GFP 陽性領域率。両酸素条件下で G-ITS 添加は GFP 発現領域の割合を減少させた（Brown-Forsythe and Welch ANOVA, *P＜0.05, **P＜0.01, ***P＜0.001）。(d) GFP 陽性領域の面積値。G-ITS 添加の O_2 10%群は培養期間を通じて一貫して最高値を示したが、その差は統計的に有意ではなかった（Brown-Forsythe and Welch ANOVA）。

第二節　増大した培養精巣組織における半数体細胞誘導の評価

H-PAS 染色によって、G-ITS 添加培地を用いて培養された精巣組織で誘導された半数体細胞の誘導効率を評価した。組織学的解析により 4 条件すべてにおいて円形精子細胞の存在が確認され、群間でその数に有意差は認められなかった（図 9a, b）。これらの知見は、G-ITS 添加が精巣組織の拡張を促進した一方で、低酸素条件下で観察された高い精子形成効率を完全には維持できなかったことを示唆している。

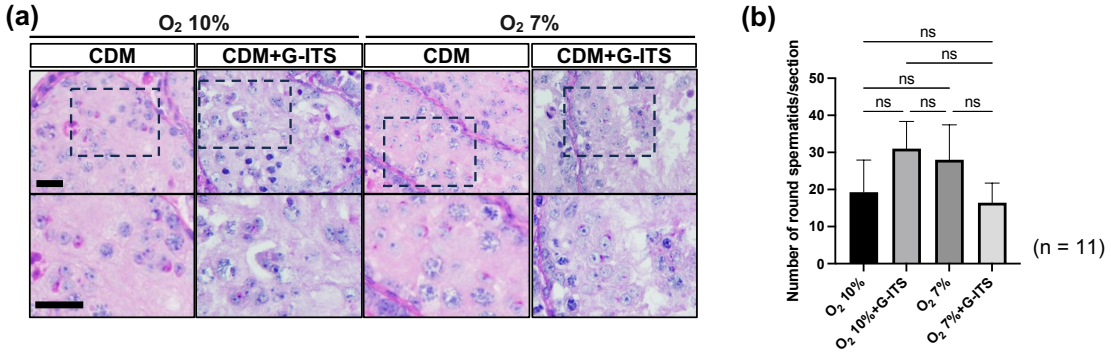

図 9　G-ITS 添加による半数体細胞の誘導効率

(a) 培養 6 週間後の組織切片。全条件下で円形精子細胞が観察された。スケールバー：20 µm。(b) 切片あたりの円形精子細胞数の定量比較。4 群間で有意差は認められなかった（Brown-Forsythe and Welch ANOVA）。

次に、組織拡大に寄与する細胞集団を特定するため、増殖細胞を可視化する EdU 取り込み解析を行った。前節の結果（図 8b）から、培養開始後 1 週間が最も組織増殖の活発な時期であると考えられたため、培養 6 日目に EdU を添加し、7 日目で培養を終了して染色を実施した。EdU 染色は、生殖細胞マーカーDDX4 およびセルトリ細胞マーカーSOX9 に対する免疫染色と併用して解析した（図 10a）。その結果、G-ITS 添加により増殖中の SOX9 陽性セルトリ細胞の割合が有意に増加した一方、DDX4 陽性生殖細胞の割合は O_2 10%、O_2 7%ともに変化がなかった（図 10b）。これらの結果は、G-ITS 添加による組織拡大が主にセルトリ細胞の増殖に起因することを示している。

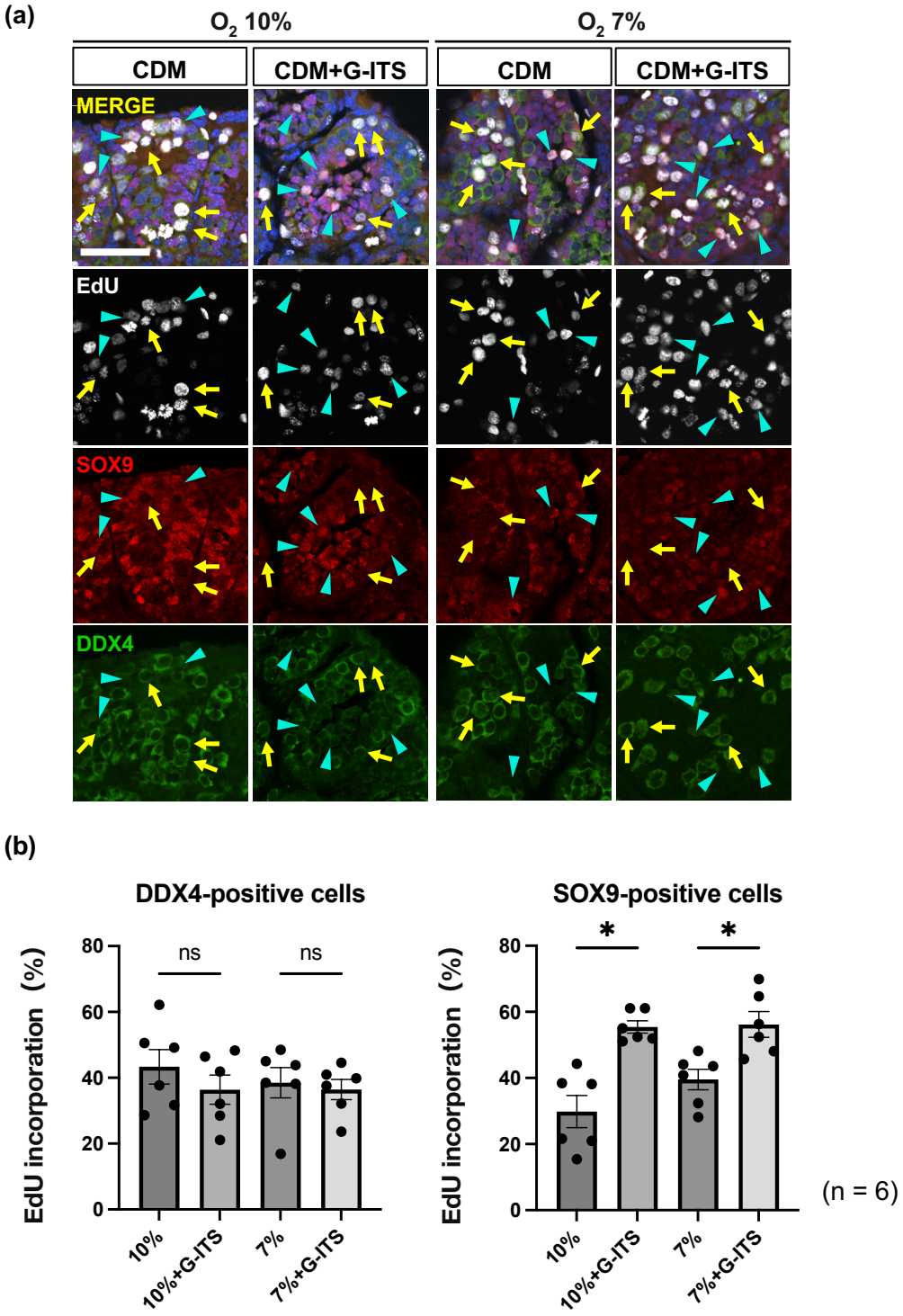

図 10　G-ITS 添加による培養精巣組織の細胞増殖解析

(a) 培養精巣組織の 7 日目における免疫蛍光染色。いずれの組織でも EdU を取り込んだ DDX4 陽性細胞（矢印）と SOX9 陽性細胞（鏃）が観察された。スケールバー：50 μm。(b) 4 条件下における DDX4 陽性細胞または SOX9 陽性細胞への EdU 取り込み率の定量化。G-ITS 添加はセルトリ細胞の増殖を増強させる傾向を示した（Brown-Forsythe and Welch ANOVA, *P＜0.05）。

小括・考察

前章において、酸素濃度を低減することで精子形成活性が向上する一方、組織全体の成長は抑制されることを明らかにした。この「精子形成の促進」と「組織成長の抑制」が同時に生じる背景には、精巣内に存在する複数の細胞種がそれぞれ異なる酸素要求性や代謝特性を有している可能性が考えられる。とりわけ、生殖細胞は低酸素環境に適応しやすく分化が進む一方で、セルトリ細胞をはじめとする体細胞は酸素低下により代謝活動や増殖が制限され、結果として組織全体の拡張が阻害されることが予想された。

本章では、培養組織の成長を促進させつつ低酸素条件下で得られた高い精子形成効率を維持することを目的として、CDM にグルコースおよびインスリンを添加した。グルコースはセルトリ細胞の主要なエネルギー基質であり、乳酸を介して生殖細胞の代謝にも寄与する[33]。一方インスリンは、グルコース取り込みの促進や細胞の栄養代謝の調整を通じて精巣組織の維持に関与することが知られている。これらの因子を加えることで、低酸素条件下で制限されていた体細胞の代謝・増殖を補完し、組織成長を改善できることが期待された。

実際に、G-ITS を添加した培養系では組織が大幅に増大し、著しい成長促進効果が認められた。これを受けて培養組織の成長率と GFP 陽性領域の変化を合わせて解析したところ、O_2 10%条件では組織の拡大に伴い GFP 陽性領域の絶対面積が増加したものの、組織全体の成長率の方が高く、結果として相対的割合は低下した。さらに、O_2 7%条件では、組織の成長による GFP 陽性領域率の低下と絶対量の増加が相殺され、GFP 陽性領域の絶対量はほぼ変化しなかった。これにより、G-ITS の添加は組織の増大に対して GFP 陽性領域が同じようには拡大しないことを明らかにした。これらの傾向は、G-ITS 添加による組織拡大が生殖細胞数の増加を伴っていない可能性を示唆していた。さらに、いずれの酸素濃度においても G-ITS の添加による円形精子細胞数の有意な増加は認められず、伸長精子細胞の誘導にも至らなかった。

EdU 染色による解析の結果、組織の増大が主としてセルトリ細胞の増殖によるものであり、生殖細胞数の増加が伴わないことを明らかにした。体細胞の増殖は生殖細胞を支持する基盤として重要である一方、体細胞と生殖細胞の量的関係が適切な範囲から逸脱した場合には生殖細胞が受ける微小環境（栄養供給・酸素濃度・局所的なシグナル伝達）が最適条件から逸脱する可能性がある。これに関連して、代謝補強の過剰が精子形成に逆効果をもたらす可能性も指摘されている。例えば、糖尿病状態を模倣した高グルコース条件下のマウス精巣組織培養では、セルトリ

細胞数の増加と管腔面積の縮小が報告されており、セルトリ細胞の成熟障害や機能低下が生じうることが示されている[34]。この知見は、代謝補強が適切な範囲で作用する場合には組織維持に有効である一方、過剰な代謝負荷はむしろ支持細胞の機能破綻を引き起こし、生殖細胞分化に不利に働く可能性を示している。

また、本研究の結果は、先行研究における KSR 培地と AlbuMAX 培地の比較結果[35]とも整合性がある。KSR は *in vitro* 精子形成を誘導可能な血清代替物であり、その主要成分として AlbuMAX を含む[12]。KSR を用いた培養では AlbuMAX よりも組織の増大が顕著である一方、長期培養における精子細胞への分化効率は AlbuMAX の方が高い傾向にあることが報告されている。KSR にはインスリンが含まれている点で AlbuMAX と異なり[36]、また両培地に共通して用いられる基礎培地 αMEM にはグルコースが含まれている。本研究では、G-ITS 添加により体細胞増殖が選択的に促進される一方で、生殖細胞分化がそれに追随しないことが示された。KSR と AlbuMAX の間で観察される組織増大と生殖細胞の分化効率の差異は、本研究で得られた傾向と符合している。このことから、インスリンやグルコースによる代謝補強は体細胞の成長を促す一方で、その増殖が生殖細胞にとって最適な微小環境の維持に必ずしも寄与しない可能性がある。

以上の結果より、本章では「低酸素条件における高い精子形成活性」と「体細胞の増殖不足による組織成長の制限」という二つの現象が、代謝特性と細胞種依存的な酸素応答の違いにより生じている可能性を示唆した。また、G-ITS による代謝基盤の補強が体細胞の増殖を亢進し、組織成長を改善することを示した一方で、その増殖が生殖細胞分化のさらなる進展には直接結びつかないことも明らかにした。これらの知見は、CDM 培養系において「体細胞の増殖・維持」と「生殖細胞の分化促進」という二つの要素を独立に最適化する必要性を示している。

第三章　スフィンゴ糖脂質の添加が精子細胞の分化に及ぼす影響

要旨

本章では、*in vitro* 精子形成において円形精子細胞から伸長精子細胞への分化を促進する因子として、スフィンゴ糖脂質（ガングリオシド）に着目した。前章までの結果から、低酸素条件やG-ITS 添加では精巣組織培養では伸長精子細胞が誘導されず、CDM には分化促進に必要な因子が欠如している可能性が示唆された。また、CDM を用いた培養では一部の円形精子細胞が凝集し、多核巨細胞を形成することが確認された。

糖脂質は細胞膜外側に局在し、細胞間相互作用や膜安定化、シグナル伝達に関与することが知られており、伸長精子細胞形成に関与する可能性が考えられる。特に、スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドを欠損するマウスでは円形精子細胞段階で精子形成が停止し、多核巨細胞が形成される。表現型の類似性から、CDM における分化停止の原因の一つにガングリオシド欠失が関与している可能性が示唆された。

そこで、本研究では O_2 10%条件下で CDM にラクトシルセラミド（LacCer）、GM3、GA2 および GA1 を添加し、精子細胞分化への影響を検討した。GFP 陽性領域率の比較では、培養後期に LacCer および GA2 添加群で増加が見られたが、GM3 および GA1 では明確な増強効果は認められなかった。半数体細胞の解析では、すべての脂質添加群で核 mCherry 陽性の伸長精子細胞が観察された。免疫染色により、これらの伸長精子細胞が step 9–11 段階の伸長精子細胞であることが確認された。組織学解析から、スフィンゴ糖脂質添加により、頻度・数ともに低値であるものの伸長精子細胞数を誘導することができたことを明らかにした。

これらの結果から、ガングリオシドおよびその前駆体は CDM 条件下で円形精子細胞から伸長精子細胞への分化を一定程度促進することが示された。本章によって、糖脂質の添加が精子細胞の分化促進に寄与し得ることを示し、*in vitro* 精子形成系における分化制御因子の一つとしてガングリオシドの重要性を明確にした。

序論

前章までの解析から、酸素濃度の低減が培養精巣組織における GFP 陽性領域率を大きく向上させ、円形精子細胞数も有意に増加することを明らかにした。しかし、低酸素条件では円形精子細胞の形成こそ促進されるものの、伸長精子細胞の安定した誘導には至らなかった。一方、AlbuMAX を含む培地では酸素濃度にかかわらず安定して伸長精子細胞が誘導されることから、CDM では円形精子細胞の伸長精子細胞への分化を進める上で必要な因子が不足している可能性が示唆された。

O_2 10%下で CDM を用いて培養した精巣組織では、生殖細胞の分化が円形精子細胞の段階で停止することに加え、一部の円形精子細胞は凝集して多核巨細胞を形成していた（図 11）。この現象は CDM を用いた精巣組織培養における分化停止や異常な細胞集団形成の顕著な特徴として捉えることができる。

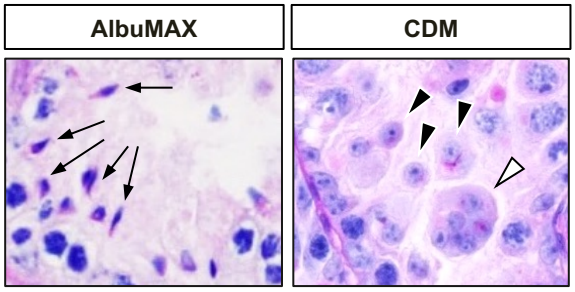

図 11　AlbuMAX もしくは CDM を用いて 6 週間培養した精巣組織の PAS 染色像。AlbuMAX 培養組織では伸長精子細胞（矢印）が観察された。CDM 培養組織では円形精子細胞（黒鏃）が観察され、一部は凝集して多核巨細胞（白鏃）を形成していた。

これまで我々は、AlbuMAX が脂質を豊富に含むアルブミン製剤である点に着目し、その脂質組成を解析することで遊離脂肪酸やリゾリン脂質が精子形成に寄与することを明らかにしてきた。しかし、AlbuMAX は生体由来製剤でありロット差が大きく、微量脂質や未知成分を網羅的に解析することには限界がある。このことから、AlbuMAX の構成成分を起点として精子形成に関わる因子を同定する方法には限界があると考えられた。

生体に存在する脂質は単純脂質や誘導脂質のほかに複合脂質が存在し、複合脂質はリン脂質と糖脂質に大別される。CDM には脂肪酸やコレステロール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、リゾリン脂質などのリン脂質は含まれているが、糖脂質は含まれていない。糖脂質は細胞膜の外側に偏って局在し、細胞間相互作用、膜の安定化、シグナル伝達などに関与している[37]。伸長精子細胞への形態変化には、生殖細胞と体細胞が密接に連携することが不可欠である[38,39]ことから、細胞間相互作用に関与する糖脂質がこの分化過程を制御する可能性が考えられた。これを踏まえ、本研究では、CDM で欠失している可能性のある因子として糖脂質に着目した。

糖脂質の一種であるガングリオシドが精子形成に関与することは、既存研究から報告されている。ガングリオシドはスフィンゴ糖脂質の一種であり、シアル酸残基の数や結合位置の違いにより 4 つの系列（o, a, b, c）に分類される[40–42](図 12)。細胞膜脂質ラフトの形成を通じて、細胞増殖・分化、接着、シグナル伝達などを制御する。生体内では主に a および b 系列が高頻度に存在する。

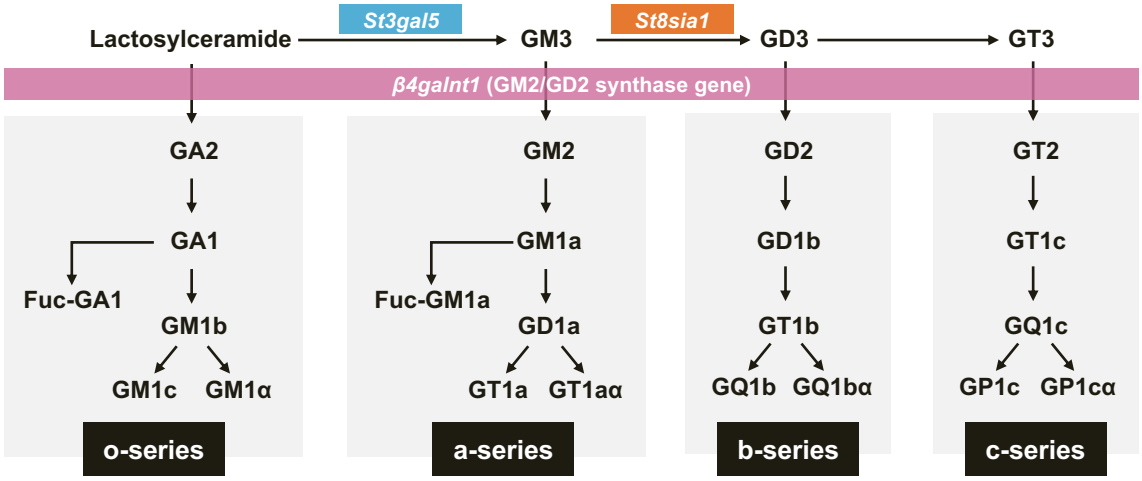

図 12　ガングリオシドの生合成経路

Lactosylceramide（LacCer）を共通前駆体として、o/a/b/c の 4 系列のガングリオシドが合成される過程を示す。本図は既報の知見[39,41]に基づき作成した。本研究では LacCer および代表的な下流分子（GM3, GA2, GA1）を CDM に添加して培養し、円形精子細胞から伸長精子細胞への分化への影響を評価した。

このガングリオシドの合成酵素遺伝子 *B4galnt1* を欠損したマウスでは、精子形成が円形精子細胞段階で停止し、多核巨細胞が形成される重篤な表現型を示す[43]。この表現型は、CDM で培養した精巣組織で観察される多核巨細胞形成と類似しており、ガングリオシド欠乏が CDM における分化停止の一因である可能性が示唆された。

さらに、他のガングリオシド合成酵素欠損マウス研究から系列ごとの重要性が示唆されている。*St8sia1* 欠損マウス（b・c 系列欠損）[44]および *St3gal5* 欠損マウス（a・b・c 系列欠損）[45,46]では妊孕性に異常は見られない一方、すべてのガングリオシド系列を合成できない *B4galnt1* 欠損マウスのみが重篤な精子形成障害を示す。また、*St3gal5* 欠損マウスでは通常ほとんど発現しない o 系列が高発現していることから、o 系列ガングリオシドが a・b 系列の代替機能を担う可能性があると考えられている。さらに、o 系列の一部には精子細胞の分化誘導能を持つ分子が存在することも報告されている[47]。

以上の知見を踏まえ、本章では GM3（a・b・c 系列の共通前駆体）、GA2・GA1（o 系列）、

LacCer（全ガングリオシドの共通前駆体）を候補分子として選択し、CDM へ添加することで円形精子細胞から伸長精子細胞への分化に及ぼす影響を評価することを目的とした。

実験方法

実験動物

第一章の実験動物を参照。

培養法

第一章の培養法を参照。本章ではインキュベータの酸素濃度を 10%に固定して培養を行った。

培地の調製

第一章の CDM の調製を参照。本章では、以下の試薬をそれぞれ最終濃度 10 μM で添加した：Lactosylceramide（860545P-5mg, Avanti Research）、ganglioside GM3（AG-CN2-9002-M001, Adipogen Life Sciences）、asialo-ganglioside GM2（GA2；AG-CN2-9009-C100, Adipogen Life Sciences）、asialo-ganglioside GM1（GA1；AG-CN2-9008-M001, Adipogen Life Sciences）。

観察方法

第一章の観察方法を参照。

組織学的および免疫組織化学的分析

第一章の組織学的および免疫組織化学的分を参照。本章で使用した抗体および染色剤を以下の表 4 に示す。

表 4 本章で使用した抗体および染色剤の一覧

Antibodies and fluorescent stains	**Dilution**	**Manufacturer**	**Identifier**
Antibodies			
Rabbit anti-TNP1	1:200	proteintech	17178-1-AP
Mouse anti-Hup1N (Prm1)	1:200	Briar Patch Biosciences	MAb-Hup1N-150
Donkey anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 488)	1:200	Invitrogen	A21206
Goat anti-Mouse IgG (Alexa Fluor Plus 647)	1:200	Invitrogen	A48289TR
Fluorescent stains			
Alexa Fluor 568-conjugated peanut agglutinin	1:200	Invitrogen	L32458
Hoechst 33342	1:1000	Nacalai Tesque	23491-52-3

統計解析

第一章の統計解析を参照。本章の統計解析は、各データの性質に応じて Brown-Forsythe and Welch ANOVA または Fisher's exact test を用いて実施した。

結果

第一節　スフィンゴ糖脂質添加による精子形成活性への影響

本章では、精子細胞の分化を促進する因子としてガングリオシド類の添加効果を検討した。培養条件には、第一章で最適と判断された O_2 10% を採用した。CDM に複合ガングリオシドの前駆体であるラクトシルセラミド（LacCer）もしくは GM3、GA2、GA1 の 3 種のガングリオシドを添加して培養を行い、GFP 陽性領域率の推移を比較した。6 週間の培養期間中、いずれの脂質添加群も CDM 単独条件と同程度の GFP 陽性率の推移を示した（図 13a, b）。GM3、GA1 添加群では明確な増強効果は認められなかった一方、培養後期の 5 週、6 週において、LacCer もしくは GA2 を添加した群においてわずかながら有意な増加が観察され、生殖細胞の生存率や初期分化段階への軽微な影響を示唆した。

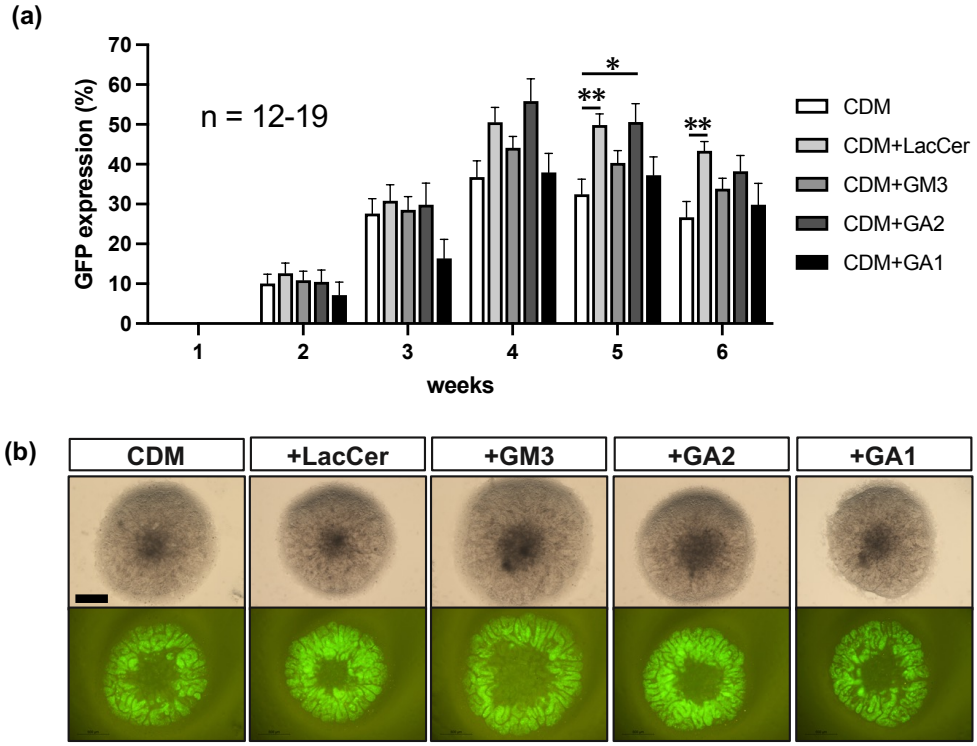

図 13　培養精巣組織の精子形成効率に対するスフィンゴ糖脂質の影響
O_2 10%下で CDM 単独またはスフィンゴ糖脂質 LacCer、ガングリオシド GM3、GA2、GA1 を添加した CDM を用いて 6 週間培養を行った。(a) 培養期間中の GFP 陽性領域率。CDM と脂質添加群との間に顕著な差異は認められなかった（Brown-Forsythe and Welch ANOVA, *P＜0.05, **P＜0.01）。(b) 培養 5 週目の精巣組織像。スケールバー：上 500 μm、下 100 μm。

第二節　スフィンゴ糖脂質添加組織における半数体細胞の分化段階評価

培養終了時の観察では、脂質添加群全てで伸長精子細胞特異的マーカーである核 mCherry の発現が観察されたが、CDM 単独条件では検出されなかった（図 14a）。特に、LacCer および GA1 を添加した条件では、核形態の伸長がより明瞭な細胞が複数観察された。

次に、伸長精子細胞としての同一性を確認するため、PNA レクチンと併せて移行期タンパク質 1（Transition Nuclear Protein 1: TNP1）およびプロタミン 1（Prm1）に対する免疫染色を実施した。いずれの添加条件においても、PNA および TNP1 陽性、かつ Prm1 陰性の細胞が検出された（図 14b）。Prm1 は精子形成後期に発現するため、陰性所見は最終的な核凝縮段階には到達していないことを示す。これらの染色パターンは step 9–11 に相当する伸長中の精子細胞の特徴と一致しており、糖脂質添加により半数体細胞の分化が伸長期まで進行していることが確認された。

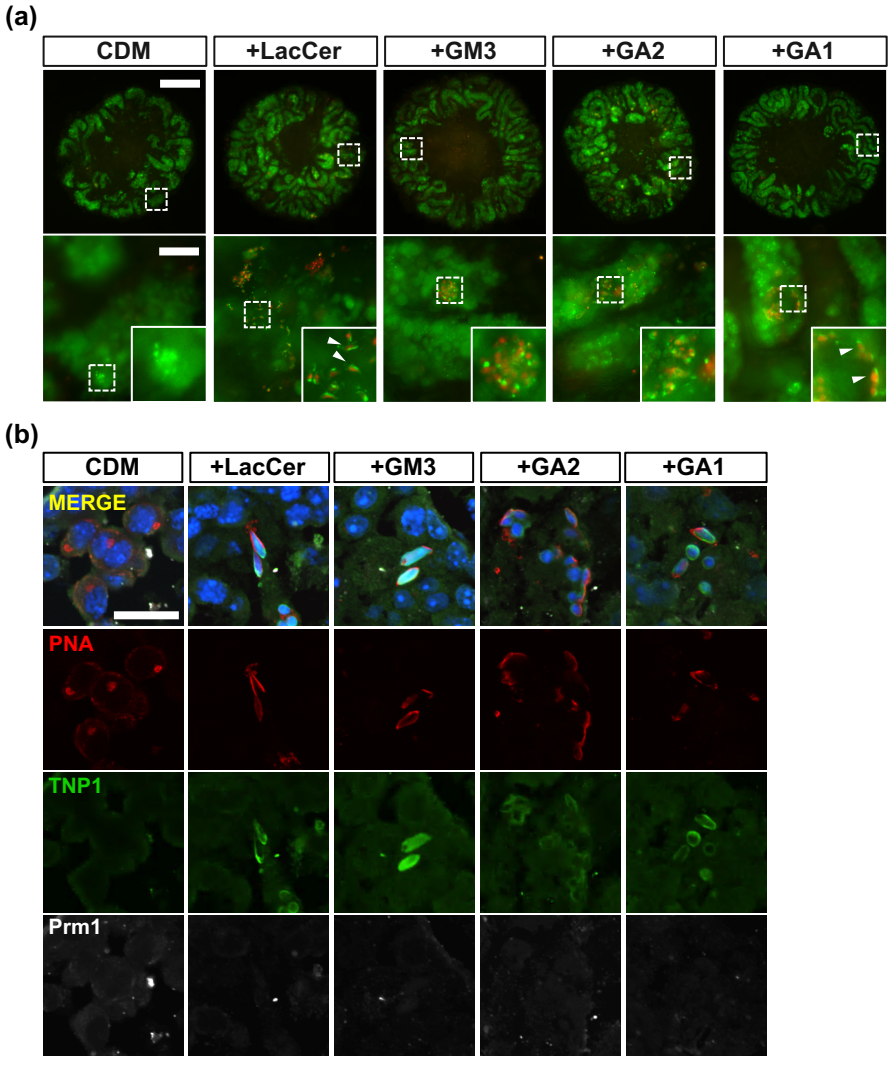

図 14　スフィンゴ糖脂質添加 CDM を用いて培養した精巣組織で誘導された半数体細胞の評価
(a) 培養 6 週目の蛍光顕微鏡画像。mCherry 陽性細胞は脂質添加条件下すべてで観察されたが、CDM 単独群では観察されなかった。LacCer 添加群と GA1 添加群では伸長した核形態を示す伸長精子細胞様細胞（鏃）が観察された。(b) 精子細胞分化マーカーに対する免疫蛍光染色。脂質添加群全てで PNA および TNP1 陽性で Prm1 陰性の伸長精子細胞が検出された。スケールバー：20 μm。

組織学的解析の結果、CDM 単独条件では円形精子細胞のみが観察され伸長精子細胞は確認されなかった一方、脂質添加条件ではいずれの群においても核伸長を示す伸長精子細胞が検出された（図 15a）。PAS 染色切片を用いた円形精子細胞数の定量では CDM 単独群と脂質添加群の間に有意差は認められなかった（図 15b）。さらに、各群精巣組織で誘導された伸長精子細胞数を定量したところ、伸長精子細胞が検出されたすべての脂質添加群において、切片あたりの伸長精子細胞数は 5-10 個程度と低値を示した（図 15c）。なお、伸長期精子細胞を含む組織片の出現頻度は、脂質添加群のうち GA2 添加群においてのみ、CDM 単独群と比較して統計的に有意な差が認められた（Fisher's exact test, P = 0.0070）。これらの結果は、ガングリオシド類およびその前駆体の添加によって円形精子細胞から伸長期精子細胞への移行が一定程度誘導され得るものの、その効果は限定的であることを示唆している。

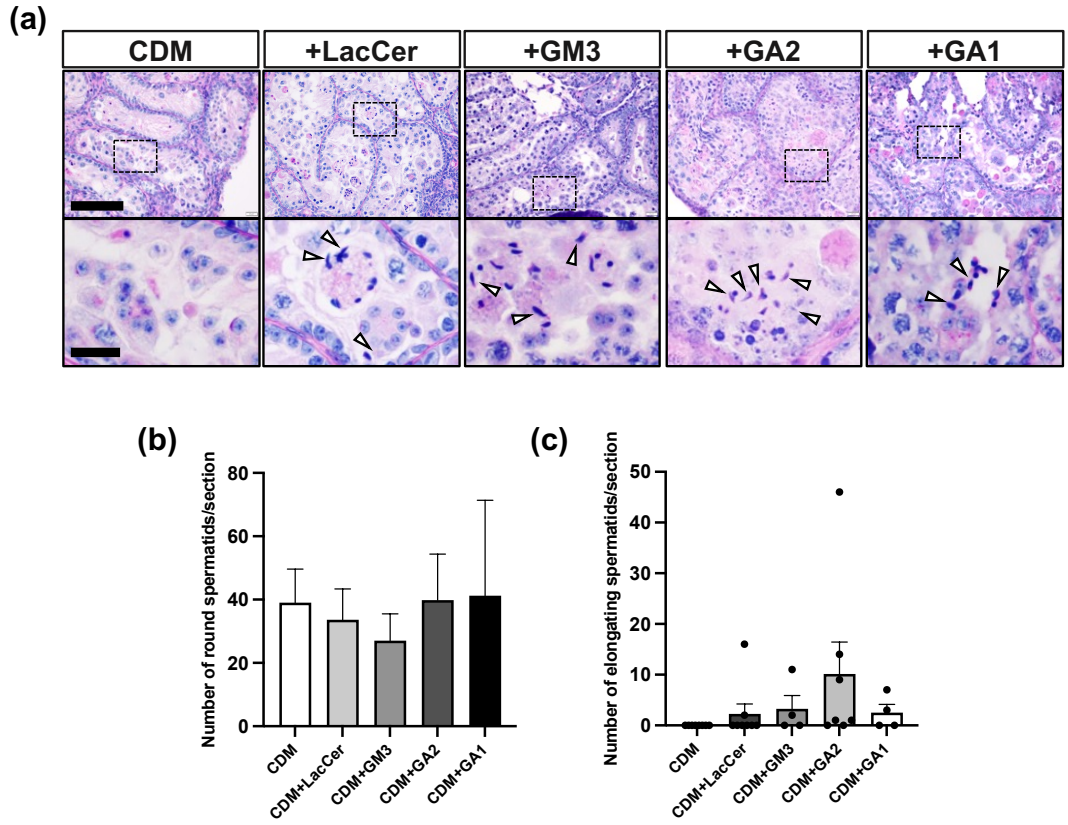

図 15　G-ITS 添加による培養精巣組織の細胞増殖解析

(a) 培養 6 週間後の組織切片の PAS 染色像。脂質添加群では伸長精子細胞（鏃）が散見された。スケールバー：上段パネル 100 µm、下段パネル 20 µm。(b) 切片あたりの円形精子細胞の定量。CDM 群と脂質処理群のいずれの間にも有意差は認められなかった（Brown-Forsythe and Welch ANOVA）。(c) 切片あたりの伸長精子細胞の定量。CDM 群では伸長精子細胞は検出されなかったが、糖脂質添加下では低効率ながら散見された。

小括・考察

mCherry の発現観察、組織学的解析および TNP1・Prm1 に対する免疫染色の結果、糖脂質添加条件ではいずれも伸長途上の精子細胞が誘導されていることを明らかにした。精子形成後期ではクロマチンの再編成が段階的に進行し、その過程は特定のタンパク質の発現によって特徴づけられる。TNP1 はヒストンが移行期タンパク質へ置換される段階を反映し、伸長期前〜中期に相当する step 9-11 頃に発現する。一方で Prm1（Protamine 1）は step 12-13 以降に発現するため、最終的なプロタミン置換および核の高度凝縮を示す指標となる。

本研究で観察された PNA 陽性かつ TNP1 陽性という染色パターンは、半数体細胞が step 9–11 の伸長精子細胞に到達していることを示すものである。以上の結果から、糖脂質添加により伸長精子細胞への分化は促進されることを明らかにした。同時に、伸長精子細胞分化の最終段階まで到達していないという限界も示された。

本章において伸長精子細胞はすべての脂質添加群で検出されたものの、その数および検出頻度は総じて低く、唯一 GA2 添加群のみが出現頻度の有意な差を示した。o 系列ガングリオシドが a・b 系列の代替として機能する可能性が指摘されていることから、o 系列に属する GA2 の特異的な糖鎖構造が生殖細胞とセルトリ細胞間の接着・コミュニケーションや膜リモデリングを介して伸長過程を部分的に補完した可能性が考えられる。

また、ガングリオシドが精子形成に与える影響のメカニズムとして、テストステロン輸送との関連が報告されている[43]。その中でガングリオシドはシアル酸含量の高い分子ほどテストステロンとの結合能が高いことが明らかになっている。精子細胞の伸長過程はテストステロン依存性が高いことから[48,49]、膜上ガングリオシドによるテストステロン受容および輸送の調節が *in vitro* における伸長精子細胞誘導効率に影響した可能性が考えられる。

なお、本研究では添加濃度として 10 μM を選択した。これは、マウス血清中のガングリオシド濃度が系統により 2–24 μM と幅を持つこと[50–53]、また ICR 系マウスの血中濃度に関する具体的な定量データが得られなかったことを踏まえ、範囲の中間値で設定した。

本章の結果から、単一分子の添加のみでは *in vivo* における複合的な糖脂質ネットワークを再現することはできない可能性が示唆された。これは、いくつかの GM3-only マウスの表現型からも支持される[44,54,55]。このマウスでは中枢および末梢神経系の正常機能維持に重大な障害が生じ、GM3 単独では複合ガングリオシドの機能を補完できないことが明らかになっている。精

子形成における糖脂質ネットワークも同様に、複数系列のガングリオシドが同時に存在することが維持に不可欠であり、単一種の添加では膜上の糖鎖環境を十分に再現できないと考えられる。したがって、複数ガングリオシドの組合せ添加や代謝前駆体と下流分子の同時供給など、より生理的な構成に近づける戦略が必要である。

ガングリオシド合成酵素欠損モデルの表現型からも明らかなように、精子形成の維持には複数系列のガングリオシドが同時に存在することが重要であり、単一種のみの添加では膜上の糖鎖環境を十分に補完できないと考えられる。したがって、複数ガングリオシドの組合せ添加あるいは代謝前駆体と下流分子の同時供給といった、より生理的な構成に近づける戦略が必要である。

総じて、本研究はガングリオシドおよびその前駆体が CDM 条件下での精子細胞伸長過程を補助し得ることを示したが、その効果は限定的であった。今後、種類・濃度・添加タイミングの体系的最適化、複数種類の同時添加による伸長精子細胞の高効率な誘導を検証すべきである。さらに、セルトリ細胞機能との相互作用解析、テストステロン輸送・シグナル制御への寄与の検証などを通じ、ガングリオシドがどの段階のどのプロセスを支えているのかを明らかにする必要がある。

第三編　結論

1. 低酸素条件は培養精巣組織における精子形成効率を向上させる

本研究では、CDM を用いた精巣組織培養における酸素濃度の影響を検討した結果、低酸素条件下で精子形成活性を示す精細管の割合が増加し、それに伴って円形精子細胞数も増加した。これらの結果は、低酸素環境が生殖細胞の維持と分化を促進し、精子形成効率の向上させることを明らかにした。一方で、組織の成長は抑制され、伸長精子細胞も検出されなかった。したがって、低酸素条件は精子形成効率の向上には有効であるものの、組織成長や精子細胞の分化誘導を達成するためにはさらなる条件最適化が必要であると考えられた。

2. G-ITS 添加は組織維持に寄与するが、精子形成の進行には直結しない

G-ITS を添加すると組織の成長率は顕著に改善し、セルトリ細胞の増殖活性が向上することを示した。一方で生殖細胞の活発な増殖や GFP 陽性領域拡大に伴う円形精子細胞数の増加は実現されず、体細胞を維持するだけでは精子形成の進行は促されないことを明らかにした。これらの結果から、精子形成の中期以降の進行には追加の特異的な分化促進因子が必要であると考えられた。

3. ガングリオシド補充は生殖細胞の後期分化を部分的に促進させる

ガングリオシドおよびその前駆体を CDM に添加したところ、いずれの条件でも伸長過程へ進んだ精子細胞が低頻度ながら観察され、糖脂質が生殖細胞の後期分化に寄与し得ることが示唆された。特に GA2 添加群では、その検出頻度が有意に増加し、糖脂質の種類によって分化促進効果に差異が存在する可能性が示された。ただし、いずれの脂質添加群でも後期伸長精子細胞に特徴的な高度な核凝縮には到達しておらず、完全な伸長精子細胞形成を成立させるには不十分であった。以上より、糖脂質は後期分化を補助する要素ではあるものの、濃度・組み合わせ・補助因子との協働作用など、多因子的最適化が不可欠であると考えられる。

in vitro 精子形成システムは、げっ歯類だけでなくヒトを含む幅広い哺乳類への応用可能性を秘めている。重要なことに、ラットにおける *in vitro* 精子形成の確立は、CDM の開発から得られた知見に基づく培養培地の開発によって大きく前進した[17]。この観点から、培養系の指摘酸素濃度検討と精子細胞分化を促進する因子探索に関する本研究は、*in vitro* 精子形成の適用範囲を他の種へ拡大するための重要な知見を提供する可能性がある。

第四編　謝辞

本研究を行うにあたり、特別受入研究生として多大なご指導をいただいた横浜市立大学医学研究科臓器再生医学教室教授　小川 毅彦先生に心より感謝申し上げます。また、日々の実験においてご助言・ご指導をいただいた横浜市立大学医学研究科臓器再生医学教室講師　佐藤 卓也先生、助教　石川（山内）祐先生にも深く感謝いたします。さらに、実験動物の管理や施設運営にご協力いただいた横浜市立大学動物実験施設の皆様に感謝いたします。

本論文の指導および審査をしていただきました大阪大学薬学研究科教授　橋本 均先生、深田宗一朗先生にも厚く御礼申し上げます。

最後に、大阪大学微生物病研究所教授　伊川 正人先生には、本研究全般にわたるご指導・ご鞭撻に心より感謝いたします。

第五編　主論文・参考論文リスト

主論文

Nagata S, Ishikawa-Yamauchi Y, Katagiri K, Sato T, Ikawa M, Ogawa T. Optimization of Oxygen Concentration and Glycosphingolipid Effects on Spermatogenesis in Mouse Testicular Culture. *Biology of Reproduction*, Accepted.

参考論文

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. Generation of rat offspring using spermatids produced through in vitro spermatogenesis. *Scientific Reports*, 2023;13:12105.

Hashimoto K, Odaka H, Ishikawa-Yamauchi Y, **Nagata S**, Nakamura H, Kimura H, Sato T, Makiyama K, Ogawa T. Culture-space control is effective in promoting haploid cell formation and spermiogenesis in vitro in neonatal mice. *Scientific Reports*, 2023;13:12354.

第六編　参考文献

1. Agarwal A, Majzoub A, Parekh N, Henkel R. A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice. *World J Mens Health* 2020;38:308.

2. Tsujimura A, Iijima M, Umemoto Y, Kobayashi H, Komiya A, Shiraishi K, Chiba K, Hirota Y, Fukuhara S, Yumura Y. Summary of the Clinical Practice Guidelines for Male Infertility by the Japanese Urological Association With the Support of the Japan Society for Reproductive Medicine. *Int J of Urology* 2025;32:1301–13.

3. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews* 2016;96:1–17.

4. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 1956;99:507–16.

5. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. *Science* 2007;317:1722–6.

6. Fleck D, Kenzler L, Mundt N, Strauch M, Uesaka N, Moosmann R, Bruentgens F, Missel A, Mayerhofer A, Merhof D, Spehr J, Spehr M. ATP activation of peritubular cells drives testicular sperm transport. *eLife* 2021;10:e62885.

7. Champy C. Quelques résultats de la méthode de culture des tissues. *Arch Zool Exp Gén* 1920:461–500.

8. Martinovitch PN. Development in vitro of the Mammalian Gona. *Nature* 1937;139:413.

9. Steinberger E, Steinberger A, Perloff WH. Initiation of Spermatogenesis in Vitro1. *Endocrinology* 1964;74:788–92.

10. Steinberger A, Steinberger E. Tissue culture of male mammalian gonads. *In Vitro* 1970;5:17–27.

11. Gohbara A, Katagiri K, Sato T, Kubota Y, Kagechika H, Araki Y, Araki Y, Ogawa T. In Vitro Murine Spermatogenesis in an Organ Culture System1. *Biology of Reproduction* 2010;83:261–7.

12. 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* 2011;471:504–

7.

13. Nakanishi T, Ikawa M, Yamada S, Parvinen M, Baba T, Nishimune Y, Okabe M. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Letters* 1999;449:277–83.

14. 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.

15. 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* 2020;34:9480–97.

16. Max B. This and that: hair pigments, the hypoxic basis of life and the Virgilian journey of the spermatozoon. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:272–6.

17. 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* 2021;11:3458.

18. Feng X, Matsumura T, Yamashita Y, Sato T, Hashimoto K, Odaka H, Makino Y, Okada Y, Nakamura H, Kimura H, Fujii T, Ogawa T. In vitro spermatogenesis in isolated seminiferous tubules of immature mice. Yenugu S (ed.). *PLoS ONE* 2023;18:e0283773.

19. Hashimoto K, Odaka H, Ishikawa-Yamauchi Y, Nagata S, Nakamura H, Kimura H, Sato T, Makiyama K, Ogawa T. Culture-space control is effective in promoting haploid cell formation and spermiogenesis in vitro in neonatal mice. *Sci Rep* 2023;13:12354.

20. Ohta H, Sakaide Y, Wakayama T. Functional Analysis of Male Mouse Haploid Germ Cells of Various Differentiation Stages: Early and Late Round Spermatids Are Functionally Equivalent in Producing Progeny1. *Biology of Reproduction* 2009;80:511–7.

21. Ahmed EA, De Rooij DG. Staging of Mouse Seminiferous Tubule Cross-Sections. In: Keeney S (ed.). *Meiosis*. Vol 558. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, 263–77.

22. Makino Y, Inoue E, Hada M, Aoshima K, Kitano S, Miyachi H, Okada Y. Generation of a dual-color reporter mouse line to monitor spermatogenesis in vivo. *Front Cell Dev Biol* 2014;2.

23. Iscove NN, Guilbert LJ, Weyman C. Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Exp Cell Res* 1980;126:121–6.

24. Kamoshita M, Shirai H, Nakamura H, Kishimoto T, Hatanaka Y, Mashiko D, Esashika K, Yang J, Yamasaki S, Ogawa T, Kimura H, Ikawa M. Development of the membrane ceiling method for in vitro spermatogenesis. *Sci Rep* 2025;15:625.

25. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, Ogawa T. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep* 2016;6:21472.

26. Sudha Gangal. *Principles and Practice of Animal Tissue Culture 2*. India: Universities Press, 2010: 46-54.

27. Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. Respiratory Gas Tensions in Tissues and Fluids of the Male Rat Reproductive Tract. *Biology of Reproduction* 1976;14:481–8.

28. Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15809–14.

29. Germack R, Leon‐Velarde F, De La Barra RV, Farias J, Soto G, Richalet JP. Effect of intermittent hypoxia on cardiovascular function, adrenoceptors and muscarinic receptors in Wistar rats. *Experimental Physiology* 2002;87:453–60.

30. 永田紫野, 小川毅彦, 佐藤卓也. 精巣器官培養の進化で広がる精子形成研究の未来. 臨床婦人科産科 2024;78:1034–9.

31. Merkel TC, Bondar VI, Nagai K, Freeman BD, Pinnau I. Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane). *J Polym Sci B Polym Phys* 2000;38:415–34.

32. 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. *Biotechnology and Bioengineering* 2018;115:3030–41.

33. Boussouar F, Benahmed M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2004;15:345–50.

34. Tavares RS, Portela JMD, Sousa MI, Mota PC, Ramalho-Santos J, Amaral S. High glucose

levels affect spermatogenesis: an in vitro approach. *Reprod Fertil Dev* 2017;29:1369.

35. Nakamura N, Merry GE, Inselman AL, Sloper DT, Del Valle PL, Sato T, Ogawa T, Hansen DK. Evaluation of Culture Time and Media in an *In Vitro* Testis Organ Culture System. *Birth Defects Research* 2017;109:465–74.

36. Garcia-Gonzalo FR, Izpisúa Belmonte JC. Albumin-Associated Lipids Regulate Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. Rutherford S (ed.). *PLoS ONE* 2008;3:e1384.

37. Zhang S, Zhu N, Gu J, Li H-F, Qiu Y, Liao D-F, Qin L. Crosstalk between Lipid Rafts and Aging: New Frontiers for Delaying Aging. *Aging and disease* 2022;13:1042.

38. Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 2004;67:271–84.

39. Payne CJ, Gallagher SJ, Foreman O, Dannenberg JH, Depinho RA, Braun RE. *Sin3a* Is Required by Sertoli Cells to Establish a Niche for Undifferentiated Spermatogonia, Germ Cell Tumors, and Spermatid Elongation. *Stem Cells* 2010;28:1424–34.

40. Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *Journal of Lipid Research* 2004;45:783–93.

41. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *J Oleo Sci* 2011;60:537–44.

42. Schnaar RL. The Biology of Gangliosides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol 76. Amsterdam: Elsevier, 2019, 113–48.

43. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Zhao J, Fukumoto S, Yamashiro S, Okada M, Haraguchi M, Shin M, Kishikawa M, Shiku H, Aizawa S, Furukawa K. Complex gangliosides are essential in spermatogenesis of mice: Possible roles in the transport of testosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998.

44. Kawai H, Allende ML, Wada R, Kono M, Sango K, Deng C, Miyakawa T, Crawley JN, Werth N, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL. Mice Expressing Only Monosialoganglioside GM3 Exhibit Lethal Audiogenic Seizures. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:6885–8.

45. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, Kono M, Tsuji S, Daniotti JL, Werth N, Sandhoff R, Sandhoff K, Proia RL. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3445–9.

46. Yoshikawa M, Go S, Takasaki K, Kakazu Y, Ohashi M, Nagafuku M, Kabayama K, Sekimoto J, Suzuki S, Takaiwa K, Kimitsuki T, Matsumoto N, Komune S, Kamei D, Saito M, Fujiwara M, Iwasaki K, Inokuchi J. Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:9483–8.

47. Sandhoff R, Geyer R, Jennemann R, Paret C, Kiss E, Yamashita T, Gorgas K, Sijmonsma TP, Iwamori M, Finaz C, Proia RL, Wiegandt H, Gröne H-J. Novel Class of Glycosphingolipids Involved in Male Fertility. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:27310–8.

48. Donnell LO, McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology* 1994;135:2608–14.

49. Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 2004;131:459–67.

50. Kloppel TM, Keenan TW, Freeman MJ, Morré DJ. Glycolipid-bound sialic acid in serum: increased levels in mice and humans bearing mammary carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3011–3.

51. Lengle EE. Increased Levels of Lipid-Bound Sialic Acid in Thymic Lymphocytes and Plasma From Leukemic AKR/J Mice2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1979; 62:1565-7.

52. Saha S, Chattopadhyay U. Changes in plasma gangliosides in relation to tumor growth and their tumor - enhancing effect. *Intl Journal of Cancer* 1988;41:432–5.

53. Cotterchio M, Seyfried TN. Serum gangliosides in mice with metastatic and non-metastatic brain tumors. *Journal of Lipid Research* 1994;35:10–4.

54. Inoue M, Fujii Y, Furukawa K, Okada M, Okumura K, Hayakawa T, Furukawa K, Sugiura Y. Refractory Skin Injury in Complex Knock-out Mice Expressing Only the GM3 Ganglioside. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:29881–8.

55. Tajima O, Egashira N, Ohmi Y, Fukue Y, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Inokuchi J, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K. Reduced motor and sensory functions and emotional response in GM3-only mice: Emergence from early stage of life and exacerbation with aging.

Behavioural Brain Research 2009;198:74–82.