

## 異種異所移植によるウシ精細管様構造の再構築

喜多章太<sup>1</sup>、森木甲子郎<sup>2</sup>、谷口俊仁<sup>3</sup>、安齋政幸<sup>4</sup>、  
加藤博己<sup>4</sup>、佐伯和弘<sup>1,2</sup>、細井美彦<sup>1,2,4</sup>、三谷匡<sup>4</sup>

### 要 旨

1994年、精原幹細胞の精細管移植によりドナー由来の精子を作製できる移植技術が開発された。さらに、2007年には幼若ブタ精巣細胞を免疫不全マウスの皮下へ移植することにより、精子形成の誘導に成功したことが報告された。そこで本研究では、絶滅危惧動物などでの精子形成分化誘導モデルの確立を目的に、ウシ精巣細胞を用いた移植実験を行った。マウス新生子（生後7日以内）、ウシ新生子（生後7日以内）およびウシ幼若（3～5ヶ月齢）精巣細胞をマトリゲルマトリックスと混合し、免疫不全マウスの皮下に移植することで、精巣様構造の再構築と精子形成の誘導を試みた。移植後、1週～44週に組織学的解析を行った。さらに、生殖細胞の生存・増殖・分化について、抗VASA抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。マウス新生子精巣細胞の移植では、移植後10週以降に再構築精細管および減数分裂に至る精子細胞がみられ、精子形成誘導を可能にする機能的な精細管の構築が示された。一方、新生子ならびに幼若ウシ精巣細胞の移植では、移植後10週から管構造の再建がみられたものの、免疫組織化学的解析において再構築された精細管様構造の基底膜上に配置される生殖細胞を認めることはできなかった。以上の結果から、異種異所移植法によりウシにおいても精細管様構造が再構築されたことから、今後移植法の改良によりウシ精子形成の誘導が可能となることが期待される。

キーワード：精原幹細胞、異種異所移植、精子形成、ウシ、免疫不全マウス

### 1. 緒 論

1994年、Brinsterらがマウスの精巣より解離した細胞を不妊の別マウスの精巣に移植すると、精子形成を起こしドナー由来の精子を獲得することができるという移植技術を開発した<sup>(1)</sup>。これにより、マウス、ラット<sup>(2)</sup>、ハムスター<sup>(3)</sup>において精子形成誘導に成功したという報告がなされたものの、ウシ精巣細胞を用いた移植実験に関しては、移植後3ヶ月で精細管の基底膜にウシ精巣細胞由来の細胞が生着していることは確認されたが、精子形成には至らなかった。しかし、2007年に幼若のブタ精巣細胞を免疫不全マウスに皮下移植することにより、ブタの精子形成誘導に成功したことが報告された<sup>(4)</sup>。この報告は、ブタの細胞をマウスに移植するという異種間移植と、精巣の細胞を背面皮膚下に移植するという異所移植を組み合わせて行うことにより、*in vivo*で再構築精細管を形成させ、精子形成誘導に成功したという点で画期的であった。さらに、解離したマウス精巣細胞懸濁液と細胞外マトリクス抽出物であるマトリゲルを混合して、ヌードマウス皮下へ異所移植することで精細管様構造が再構築され、機能的な精子細胞が誘導されることが報告された<sup>(5)</sup>。この方法によって得た精子細胞を未受精卵へ注入し、仮親に移植することで、ドナー由来の産子が作出された。これらの方法は、精子形成研究の実験モデルとなるばかりでなく、様々な哺乳動物への応用が可能であり、男性不妊における不妊治療研究や、絶滅危惧種の保全に向けた新たなア

原稿受付 2013年2月28日

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 和歌山産業振興財団 〒649-6261 和歌山県和歌山市小倉 60

4. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

ブローチとなることが期待される。

そこで本研究では、精子形成誘導のための新たな移植システムの開発を目的に、ウシ精巣細胞を用いて精巣様構造の再構築と精子形成誘導を目的に異種異所移植を行い、経時的に移植片を回収し、組織学的解析による精巣様構造の再構築と免疫組織化学的解析による生殖細胞の動態について検証を行った。

## 2. 材料および方法

### (1) ウシおよびマウス精巣

ウシ精巣は、新生子精巣は生後7日以内のジャージー種あるいはホルスタイン種より、幼若精巣は3～5ヶ月齢の黒毛和種より外科的に採取した(図1)。マウス新生子精巣は、生後7日以内のICR系マウス(日本クレア:MCH(ICR))を安楽死させた後、定法に従い回収した。

なお、実験の立案および動物の飼養については、近畿大学動物実験規定に準じて行った。

### (2) 精巣細胞懸濁液の調製

新生子ならびに幼若ウシより外科的に摘出した精巣を洗浄後、氷上で保存し、Penicillin-Streptomycin 添加 PBS (-) を入れたシャーレ内で眼科用ハサミを用いて白膜を切り開き精細管を露出させた。精細管を1cm角片に切り、新たな Penicillin-Streptomycin 添加 PBS (-) を入れたシャーレに入れた。その後、血液の付着した精細管や血液が逆流した精細管をできるだけ除去した後細切し、新たな Penicillin-Streptomycin 添加 PBS (-) を入れたシャーレに入れた。細切した精細管を眼科用ハサミでできるだけ細かく切断し、0.1% Type I コラゲナーゼ (Sigma: C0130) を含む Hanks' Balanced Salt Solution (invitrogen: 14025-092) -Hepes (Sigma: H6147) 緩衝液を20ml入れた100mlのコルベンに移した。32～33℃で40分間振盪することにより精細管小片から間質細胞を分離した。温浴振盪後、氷上に約5分コルベンを静置し精細管小片を沈降させた。コラゲナーゼ溶液を除去し、Hanks' Balanced Salt Solution-Hepes 緩衝液を約20ml入れて氷上で静置し、再び上清を除去した。この洗浄操作を2回行った。0.25%トリプシン溶液を20ml加えて37℃で約15分間温浴振盪し、精細管小片中の精巣細胞を解離した。その後、ウシ胎児血清を2ml加え、ピペッティングにより細胞を懸濁した。滅菌ガラスウールを50mlチューブに詰め、PBS (-) で洗浄し、細胞懸濁液を濾過した。さらに、セルストレイナー (BD バイオサイエンス: 352360) で細胞懸濁液を濾過した。濾過した細胞懸濁液は、470×gで5分間遠心した。上清除去後、PBS (-) 1mlで懸濁し、細胞数を計測した。総細胞数に応じて、細胞懸濁液を移植用(マウス:  $1 \sim 5 \times 10^7$  cells/ml 移植用培地, ウシ:  $1 \times 10^8$  cells/ml 移植用培地)、凍結保存用 ( $4.0 \times 10^7$  cells/ml 凍結保存培地) に細胞懸濁液を分けた。新生子マウス精巣からの精巣細胞懸濁液の調製は、既報<sup>(6)</sup>に準じた。

### (3) 精巣細胞の異所移植

移植に供する細胞はPBS (-) で懸濁し、470×gで5分間遠心した。上清除去後、移植用培地(表1) 500μlと予め4℃で融解しておいたマトリゲル™マトリックス(日本ベクトン・ディッキンソン: 356234) 500μlで $1.2 \times 10^7$  cells/mlになるように懸濁し、移植まで氷上で保存した。レシピエントマウスには6～10週齢の免疫不全マウス(日本エスエルシー: BALB/c Slc-nu/nu)を用いた。麻酔後、定法に従い精巣を摘出した。引き続き、精巣細胞の移植は、26G注射針(TERUMO: NN-2613S)を装着した1mlシリンジ(TERUMO:SS-01T)を用いて、精巣細胞懸濁液を背部皮下に1ヶ所あたり約100μlずつ、片側4ヶ所を上限として注入することにより行った。

#### (4) 組織学的解析ならびに免疫組織化学的解析

精巣細胞移植後、経時的にレシピエントマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、移植片を摘出した。

##### 4-1. 組織学的解析

摘出した移植片を4%PFA/PBSに浸し、1日間、4℃で固定を行った。定法に従いエタノール系列で緩慢脱水処理後、キシレン(Wako: 244-00086)で室温1時間の浸漬処理を2回行った。その後、定法に従いパラフィン置換を行い、パラフィン包埋を行った後、ロータリーマイクロトーム(LEICA: RM 2155)により連続切片を作製した。ヘマトキシリン・エオシン染色は、マイヤーヘマトキシリン溶液(Wako: 131-09665)と1%エオシンY溶液(Wako: 051-06515)を用いて定法に従い行った。

##### 4-2. 免疫組織化学的解析<sup>(7)</sup>

摘出した移植片を定法に従い凍結包埋後、マイクロトーム(LEICA: CM 1800)により5 $\mu$ m厚の凍結切片を作製した。PBS(-)で2回洗浄後、4%PFA/PBSで30分間室温で固定した。固定後、PBS(-)で5分間洗浄し、0.1%PBTに浸漬し15分間室温で透過処理を行った。処理後、5% Skim milk/PBTで60分間室温でブロッキング処理を行った。1次抗体処理は、5% Skim milk/PBTで500倍希釈したRabbit polyclonal DDX4/MVH IgG(Abcam Inc.: 13840)中で4℃で一晩行った。PBS(-)で5分間の洗浄を3回行った。2次抗体処理は、5% Skim milk/PBTで500倍希釈したDonkey anti-rabbit IgG-Rhodamine(Santa Cruz Biotechnology Inc.: sc-2095)中で室温で60分間反応させた。2次抗体溶液除去後、PBS(-)で10分間の洗浄を3回行った後、VECTASHIELD MOUNTING MEDIUM FOR FLUORESCENCE WITH DAPI(Vector Laboratories: H-1200)で封入し、蛍光顕微鏡(LEICA: DM RXA)下で観察した。

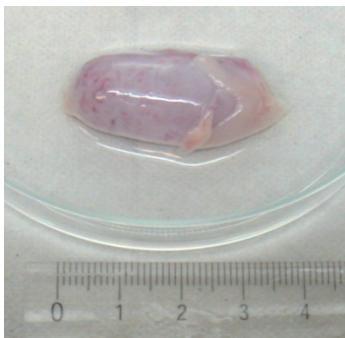


図1. 5日齢ウシ精巣

表1. 移植用培地 (Serum free ES Medium)

Knockout D-MEM	10 ml
L-Glutamine (200mM)	100 $\mu$ l
MEM Non-Essential Amino Acids solution (10mM)	100 $\mu$ l
Penicillin-Streptomycin	100 $\mu$ l
100 $\times$ nucleosides	100 $\mu$ l
1000 $\times$ $\beta$ -mercaptoethanol	10 $\mu$ l

### 3. 結果

#### ウシ精巣細胞の異種異所移植による移植片の発達

ウシ精巣細胞を移植したヌードマウス背面皮膚下の移植部に発達した組織が再構築された(図2-a, b)。また、再構築組織の大きさは5~10mmであり、血管の新生がみられた。

#### ウシ精巣細胞の異種異所移植による精細管様構造の再構築

ウシ新生子および幼若精巣細胞の異種異所移植による再構築組織について、1~44週で経時的に回収しヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的解析を行った。また、マウス新生子精巣細胞の同種異所移植についても同様の解析を行った。

マウス新生子精巣では、精細管は未発達で管腔の形成はなく、基底膜に沿ってライディヒ細胞が単層で整列していた(図3-m)。マウス精巣細胞移植後1週で、精細管の再構築の開始がみられた(図3-n)。移植後10週で、精細管は再構築し、基底膜に沿って精原細胞と思われる円形で大型の細胞が整列し、管腔

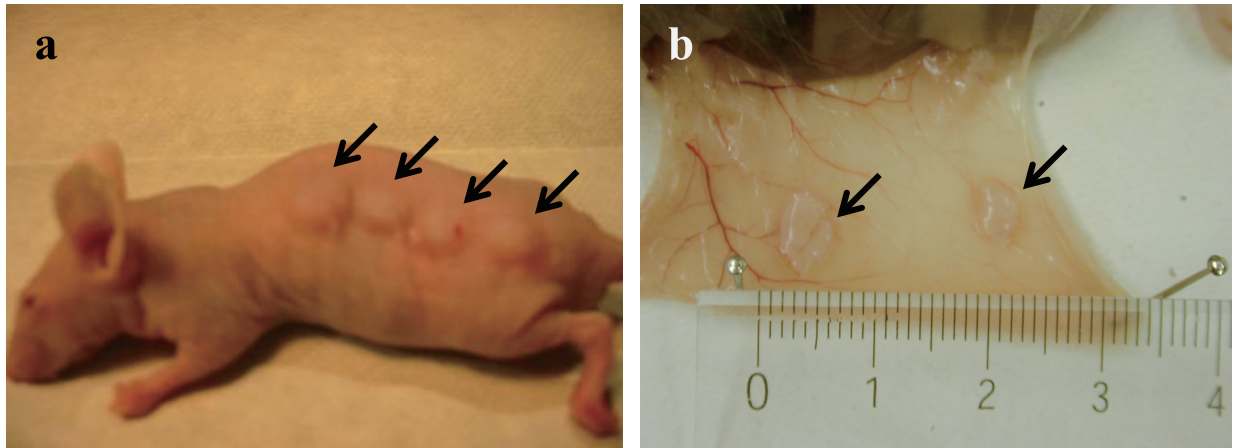


図2. 精巣細胞の免疫不全マウスへの異種異所移植における移植後20週での再構築組織.  
(a) 背側部皮下に移植後、発達した再構築組織. (b) 再構築組織での血管新生.

に向けて放射状の細胞の重層がみられた(図3-o)。移植後20週で、再構築精細管の構造はさらに発達し(図3-p)、32週で管腔付近には伸長精子細胞がみられた(図3-q)。

ウシ新生子精巣では、精細管は未発達で管腔の形成はなく、基底膜に沿ってライディヒ細胞が単層で整列し、大型の精原細胞が基底膜から遊離した状態であった(図3-a)。精巣細胞移植後1週で、精細管の再構築の開始がみられた(図3-b)。移植後10週で、精細管の再構築は進行したが、マウス精巣細胞に比べて発達は遅れていた(図3-c)。移植後20週で、再構築精細管の発達は遅れているものの、基底膜上に円形で大型の細胞が整列し、管腔に向けて放射状に細胞の重層がみられた(図3-d)、移植後32、44週で、再構築精細管の発達はほとんど進行せず、精細管内の細胞の消失による空洞化がみられた(図3-e, f)。ウシ幼若精巣では、精細管は発達し、基底膜に沿ってライディヒ細胞が単層で整列していた(図3-g)。精巣細胞移植後1週で、精細管の再構築の開始がみられた(図3-h)。移植後10週で、精細管の再構築は進行したが、マウス精巣細胞に比べて発達は遅れていた(図3-i)。移植後20週で、再構築精細管の発達は遅れているものの、基底膜上に円形で大型の細胞が整列し、管腔に向けて放射状の細胞の重層がみられた(図3-j)、移植後32週で、再構築精細管の発達がみられ、基底膜に細胞が整列し、管腔に向けて放射状の細胞の重層がみられた(図3-k)。移植後44週で、再構築沿って精細管はさらに発達し、マウス精巣細胞の移植後32週に類似した構造が認められた(図3-l)。

#### 再構築精細管組織中の VASA 陽性細胞の局在

再構築組織中における生殖細胞の局在について、生殖細胞で特異的に発現する VASA (mouse VASA homologue: MVH) タンパク質に対する免疫組織化学的解析を行った。マウス新生子精巣では、未発達な精細管の中央に基底膜から遊離した状態で VASA 陽性細胞が認められた(図4-i)。精巣細胞移植後1週では、精細管の再構成過程で VASA 陽性細胞は組織内に散在していたが(図4-j)、移植後10週以降、VASA 陽性細胞は基底膜に沿って整列していた(図4-k, l)。ウシ新生子精巣では、VASA 陽性細胞はマウス新生子精巣と同様に未発達な精細管の中央に基底膜から遊離した状態で存在していた(図4-a)。精巣細胞移植後1週で VASA 陽性細胞は増加していたものの、再構築組織内に散在していた(図4-b)。移植後10週以降、VASA 陽性細胞は細胞塊を形成するものの、基底膜に沿って整列するような局在は示さなかった(図4-c, d)。ウシ幼若精巣では、VASA 陽性細胞は精細管の基底膜上に局在していたが(図4-e)、精巣細胞移植後1、10、20週では、新生子ウシ精巣細胞と同様、再構築精細管の基底膜に沿って整列することなく散在していた(図4-f, g, h)。

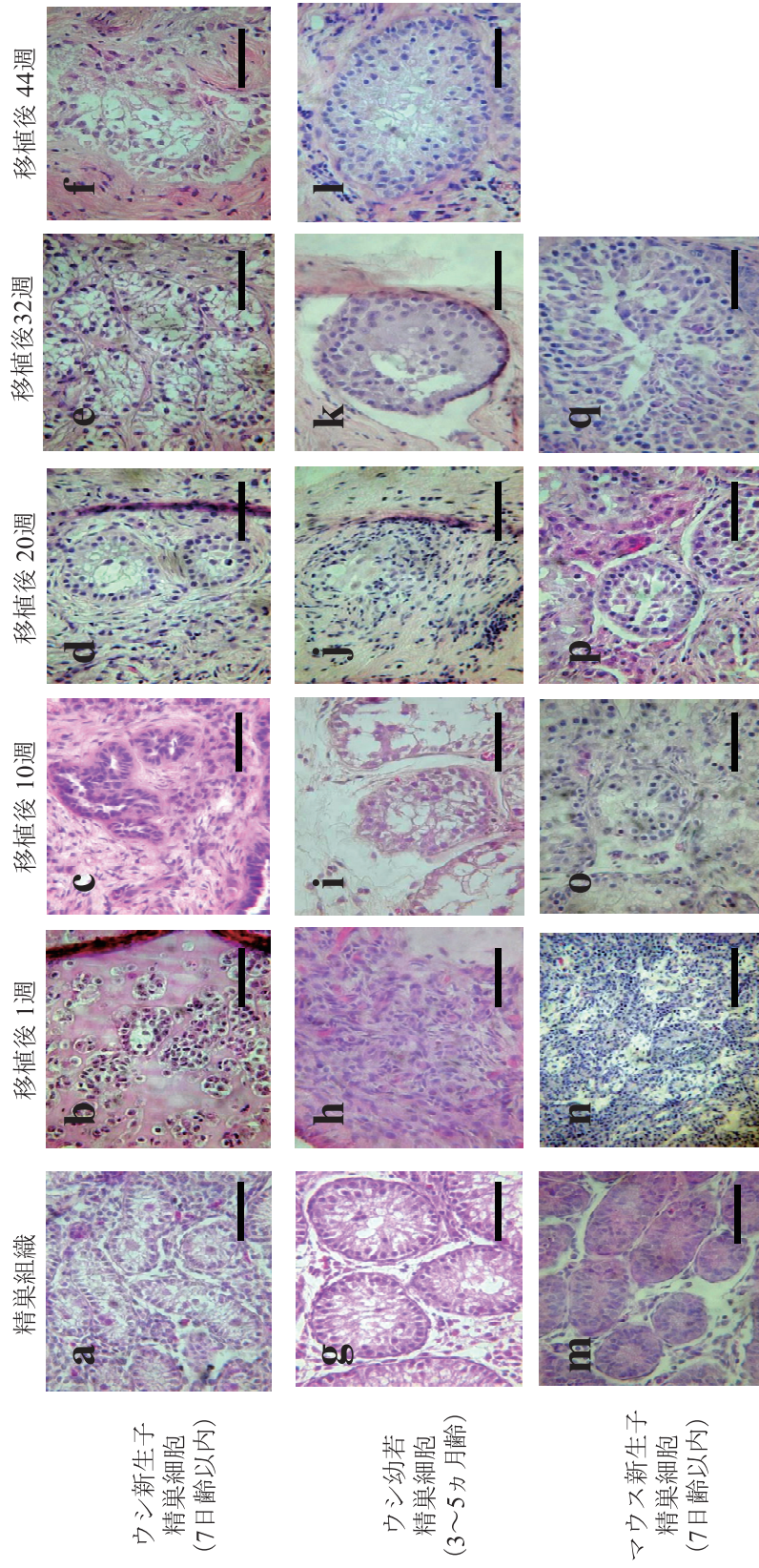


図3. ウシならびにマウス精巣細胞の免疫不全マウス皮下への異種異所移植により形成された再構築組織の組織学的解析.  
(a~f) ウシ新生子精巣細胞由来再構築組織. (g~l) ウシ幼若精巣細胞由来再構築組織. (m~q) マウス新生子  
精巣細胞由来再構築組織. Scale bar : 50  $\mu$  m

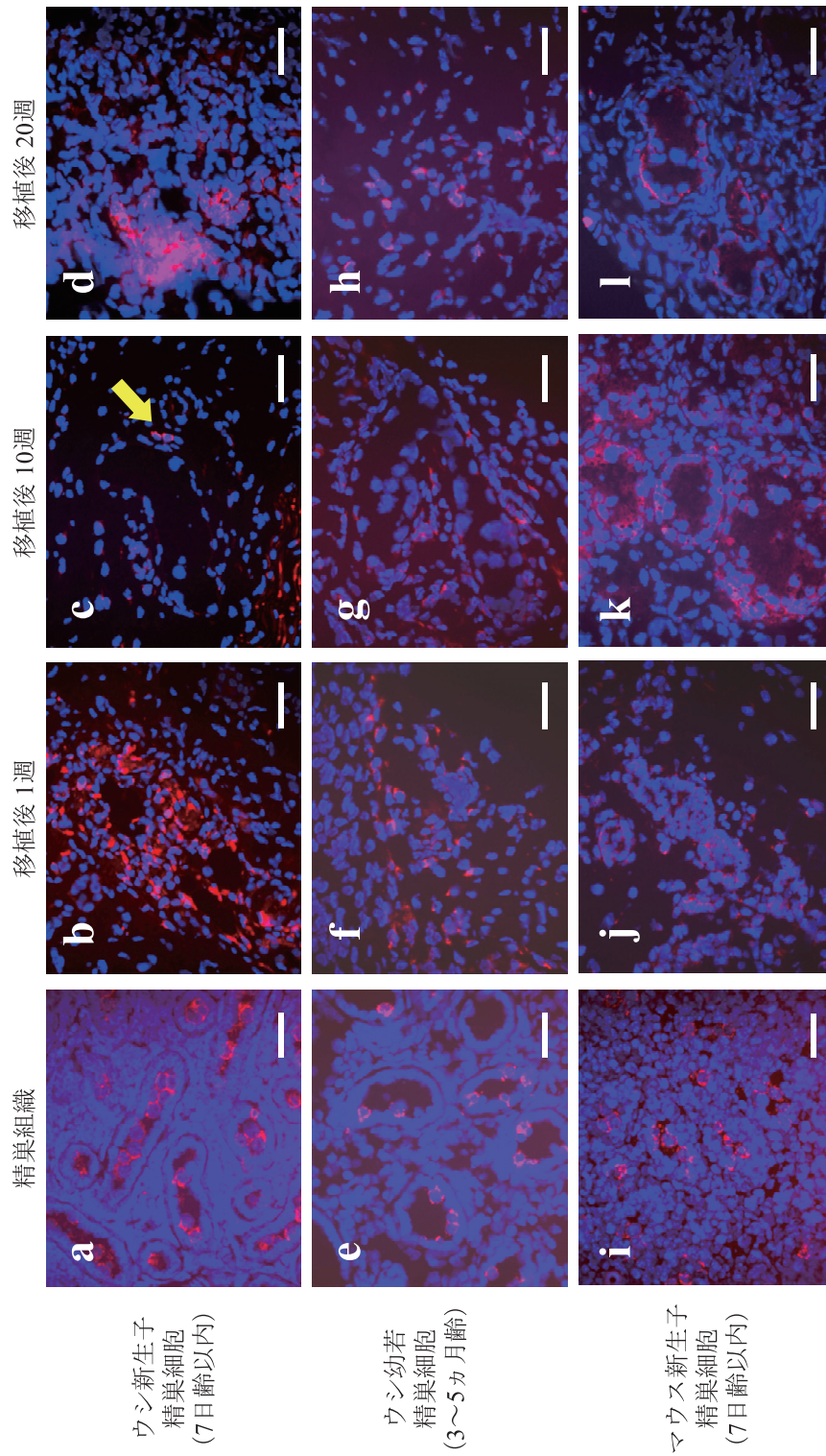


図4. ウシならびにマウス精巢細胞の免疫不全マウス皮下への異種異所移植により形成された再構築組織の免疫組織化学的解析.  
 (a~d) ウシ新生子精巢細胞由来再構築組織 (c: 矢印は、VASA 陽性細胞を示す). (e~h) ウシ幼若精巢細胞由来再構築組織.  
 (i~l) マウス新生子精巢細胞由来再構築組織. (青) MVH (mouse VASA homologue), (赤) DAPI; (赤) MVH (mouse VASA homologue), Scale bar: 50  $\mu$ m

#### 4. 考 察

哺乳動物における精子形成誘導の試みは、有用家畜や実験動物の育種・繁殖技術や遺伝子改変技術として、さらには絶滅危惧種の保全を目的として研究がなされてきた。そして近年は、生殖医療への応用に向けた新たな展開もみられている<sup>(8)</sup>。精巣由来の細胞の移植による精子形成誘導の方法については、これまでに精原幹細胞の精細管への移植<sup>(1)</sup>や高濃度の精巣細胞懸濁液を直接レシピエントの皮下に注射する方法<sup>(4)</sup>などが報告されている。前者の精細管移植法では、レシピエントの精巣内のストロマ細胞とドナーとする精原幹細胞の種差によるマッチングの関係で、マウスをレシピエントとした場合、マウス<sup>(1)</sup>、ラット<sup>(2)</sup>およびハムスター<sup>(3)</sup>での精子形成しか成功していない。また、後者の異所移植法についても、移植片の再建効率が低く安定していない。

そこで本研究では、3次元的な高次構造をとる精細管の再構築の誘導に、可溶性の基底膜成分抽出物として市販されているマトリゲルマトリックスに着目し、ウシおよびマウス精巣細胞を高濃度マトリゲルマトリックスと混合して、免疫不全マウス皮膚下に異所的に移植することにより、精巣構造の異所的な再建技術の開発を試みた。その結果、精巣細胞塊は移植部位に生着し発達した組織の形成がみられ、そこには新生血管も形成されていた(図 2-a, b)。マウス精巣において、雄性生殖細胞の分化は精細管を取り囲む血管付近のニッチから起こることから<sup>(9)</sup>、再構築された組織での血管新生は精子形成誘導に有効な環境を提供しうると考えられる。

再構築組織を組織学的に解析した結果、マウス新生子精巣細胞移植後 1 週の再構築組織(図 3-n)では、管構造の再建が開始されていたが、ウシ新生子および幼若精巣細胞の移植後 1 週では、再構築組織(図 3-b, h)において管構造の再建は遅れており、それぞれ移植後 10 週で精細管様構造の再建がみられた。さらに、マウス新生子精巣細胞移植後 10 週の再構築組織(図 3-o)では精細管様構造の構築が進み、細胞は基底膜に沿って整列し、一部では重層化して内腔に向かう細胞が認められた。そして、移植後 32 週の再構築組織(図 3-q)では、形態的に伸長精子細胞と思われる分化精子の出現がみられた。一方、ウシ新生子および幼若精巣細胞の移植では、10 週以降、精細管様構造の発達はみられたが、ウシ新生子精巣細胞の移植組織では管内腔の空洞化が進み、高度に重層化した構造は形成されなかった(図 3-d, e, f)。ウシ幼若精巣細胞の移植組織では遅延しながらも管内腔の重層化が進み、移植後 44 週のサンプルではかなり発達した精細管様構造が認められた(図 3-l)。

精巣では精細管内の未分化精原細胞は基底膜側に位置し、精細管の内腔に向かって分化を進める。したがって、再構築された管の内側に向かう細胞が生殖細胞であれば精子形成が進行している可能性がある。そこで、生殖細胞の存在と動態を検証するために、生殖細胞の細胞質で特異的に発現する VASA タンパク質に対する免疫組織化学的解析を行った。その結果、移植に供するマウス新生子精巣、ウシ新生子および幼若精巣では、未熟な精細管の内腔に VASA 陽性細胞が局在していた(図 4-a, e, i)。マウス新生子精巣細胞を移植した場合、精細管様構造の発達に伴い、VASA 陽性細胞が基底膜に沿って整列していたが(図 4-j, k, l)、ウシ新生子および幼若精巣細胞を移植した場合、再構築組織全体に VASA 陽性細胞が散在しており、管構造の基底膜に沿った局在は認められなかった(図 4-c, d, g, h)。

本研究では、マウス精巣細胞をヌードマウス皮膚下に移植すると、精細管に類似する管構造を有した組織が再構築され、その管構造内に生殖細胞が存在し、内腔に向かって分化が進むことが明らかとなった。しかし、ウシ精巣細胞を同様に移植すると、精細管様構造を有した組織は再構築されるが生殖細胞は組織全体に散在し、管構造内に基底膜に沿って配置されないため、生殖細胞の分化が進まなかったと考えられる。その一因として、管構造構築の遅れが考えられる。ウシ精巣細胞移植組織は、マウス精巣細胞移植組織に比べ管構造の構築が遅れる傾向が認められる。これは、マウスの精巣の発達に比べウシでは遅いとい

う形態形成過程における種差に起因すると考えられる。マウスでは通常、精巣内に精子が確認されるのが生後4週間、ウシでは、生後、精子が精細管に出現するまでに約32週を要する。その後、ウシにおける精子形成の周期は約60日である。精子形成過程では、精巣内の生殖細胞と体細胞系列のライディヒ細胞やセルトリ細胞との相互作用が必要であり、また脳下垂体からのFSHやLHの刺激でライディヒ細胞から分泌されるテストステロン、さらにはセルトリ細胞から分泌されるインヒビンやABP (androgen binding protein) などいろいろな因子が関与する<sup>(10, 11, 12)</sup>。したがって、精細管様構造の発達遅れは生殖細胞に対するニッチ環境の提供の遅れとなり、生殖細胞の生存性や未分化維持に大きく影響すると考えられる。そこで、未分化生殖細胞を新生子精巣から、精細管を形成するストロマ細胞を幼若精巣から供給することを狙い、ウシ新生子精巣細胞と幼若精巣細胞の混合懸濁液についても同様の移植を行ったが、精細管様構造の再構築、VASA陽性細胞の分布、いずれも改善効果は認められなかった(未発表)。

今後、ウシ精巣細胞の移植後の管構造構築を促進させる移植法について、細胞外マトリクスの改良、セルトリ細胞の機能の賦活化や生殖細胞の未分化維持・増殖・生存に係わるサイトカインなどの検討が必要である。そして、多様な種における精巣細胞の異種異所移植法が確立すれば、精原幹細胞の体外培養・遺伝子改変操作や顕微授精と組み合わせることにより、発生生物学、実験動物学、野生生物保全、男性不妊治療など生命科学の幅広い領域で有効なツールとなることが期待される。

## 5. 結 論

本研究では、ウシ精巣細胞の免疫不全マウスへの異種異所移植による精子形成の誘導を試みた。精子分化は認められなかったものの、精細管様構造が再構築されることが示された。今後、本法を改良することにより多様な種で精子形成の誘導が可能となることが期待される。

## 6. 謝 辞

本研究を行うにあたり、幼若ウシ精巣をご提供いただきました農事組合法人・黒沢牧場ならびに若齢ウシ精巣の採取にご協力いただきました和歌山県農林総合技術センター(現・畜産試験場)、紀北家畜保健衛生所の職員の皆様方に深く感謝いたします。

## 7. 参 考 文 献

1. Brinster, R. L., Zimmermann, J. W. (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Develop. Biol.* 91, 11298-11302.
2. Clouthier, D. E., Avarbock, M. R., Maika, S. D., Hammer, R. E., Brinster, R. L. (1996) Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381, 418-421.
3. Ogawa, T., Dobrinski, I., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. (1999) Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod.* 60, 515-521.
4. Honaramooz, A., Megee, S. O., Rathi, R., Dobrinski, I. (2007) Building a testis: Formation of functional testis tissue after transplantation of isolated porcine (*sus scrofa*) testis cells. *Biol. Reprod.* 76, 43-47.
5. Kita, K., Watanabe, T., Ohsaka, K., Hayashi, H., Kubota, K., Nagashima, Y., Aoki, I., Taniguchi, H., Noce, T., Inoue, K., Miki, H., Ogonuki, N., Tanaka, H., Ogura, A., Ogawa, T. (2007) Production of functional



- 
- spermatids from mouse germline stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* 76, 211–217.
6. Mitani, T., Ozaki, Y., Tanaka, Y., Takeuchi, A., Saeki, K., Kato, H., Matsumoto, K., Hosoi, Y., Iritani, A. (2006) In vitro culture of CD9- and  $\alpha 6$ -integrin-expressing cells enriched by magnetic cell sorting from cryptorchid adult and pup testes in mice. *Mem. Inst. Adv. Technol., Kinki Univ.* 11, 23-34.
  7. 森木甲子郎, 田津原陽平, 谷口俊仁, 安齋政幸, 加藤博己, 佐伯和弘, 入谷明, 三谷匡 (2008) ウシ雄性生殖細胞におけるゴノサイトおよび精原幹細胞の同定. *近畿大学先端技術総合研究所紀要* 13, 41-50.
  8. Sato, T., Yokonishi, T., Komeya, M., Katagiri, K., Kubota, Y., Matoba, S., Ogonuki, N., Ogura, A., Yoshida, S., Ogawa, T. (2012) Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 16934-16938.
  9. Yoshida, S., Sukeno, M., Nabeshima, Y. (2007) A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 317, 1722-1726.
  10. Sharpe, R.M. (1994) Regulation of spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction Vol.1 Second Edition* (Knobil, E. and Neill, J. D. eds) pp1363-1434. Raven Press. New York.
  11. Weinbauer, G. F., Wessels, J. (1999) Paracrine control of spermatogenesis. *Andrologia* 31, 249-262.
  12. 安部真一 (2006) 精子の分化. *新編 精子学*, 毛利秀雄、星 元紀 [監修]、pp54-73、東京大学出版会

## 英文抄録

## Reconstitution of seminiferous tubules by xenoectopic transplantation of juvenile bovine testicular cells into the subcutis of immunodeficient mice

Shota Kita<sup>1</sup>, Koushirou Moriki<sup>2</sup>, Shunji Taniguchi<sup>3</sup>, Masayuki Anzai<sup>4</sup>,  
Hiromi Kato<sup>4</sup>, Kazuhiro Saeki<sup>1, 2</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1, 2, 4</sup>, Tasuku Mitani<sup>4</sup>

Male germ cell transplantation induces donor cell-derived spermatogenesis in the testis of recipient mice. However, this technique is still available only to mice and rats. Recently, xenoectopic transplantation of testicular cells into the subcutis of immunodeficient mice has been developed as a novel technology to rebuild seminiferous tubules and to produce functional sperm. In order to develop an alternative technology for transgenesis and induction of spermatogenesis in domestic animals, we examined xenoectopic transplantation of bovine testicular cells. Testicular cells from neonatal (within 7 days) and juvenile (3-5 months) bovine and neonatal (within 7 days) mouse testes were prepared at the concentration of  $1.5 \times 10^7$ /ml (mouse) or  $1 \times 10^8$ /ml (bovine) and then mixed with equal volume of BD Matrigel<sup>TM</sup> Basement Membrane Matrix (Matrigel). The testicular cell/Matrigel suspensions were grafted into the subcutis of castrated immunodeficient male mice (BALB/c Slc-*nu/nu*). Morphogenesis of the grafts was examined between 1 and 44 weeks after transplantation. To examine the growth and differentiation of donor germ cells, the expression of VASA, which is expressed from gonocytes to early meiotic stages in mammalian male germ cells, was examined by immunohistochemistry. Grafts derived from mouse testicular cells regenerated complete functional seminiferous tubules 20 weeks after transplantation in which haploid spermatids were generated in the lumen. Initiation of reconstruction of seminiferous tubules from bovine testicular cells was also observed 10 weeks after transplantation. However, immunohistochemical analysis demonstrated that bovine germ cells failed to colonize along the basement membrane of reconstructed seminiferous tubules and to proliferate thereafter. Although further investigation for suitable conditions of bovine germ cell colonization and survival in the reconstructed seminiferous tubules is needed, xenoectopic transplantation would make possible to induce bovine spermatogenesis and be useful for animal sciences, conservation of wild animals and male infertility.

Key words : spermatogonial stem cells, xenoectopic transplantation, spermatogenesis, bovine, immunodeficient mice.

---

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Graduate School of Biology-oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Wakayama Industry Promotion Foundation, Wakayama 649-6261, Japan

4. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama 624-0017, Japan