

# In vivo 3D イメージング技術による精子輸送機構の解明

## In vivo dynamic investigation of sperm navigation mechanism

|          |  |
|----------|--|
| バイラー医科大学 | 梅津 康平  |
| 研究期間     | 2025年4月1日～2026年3月31日   |
| 滞在研究機関   | Department of Integrative Physiology<br>One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, United States |
| 共同研究者等   | Prof. Irina Larina   |
| 区分       | 個人 B   |

Sperm migration towards the site of fertilization is critical for successful reproduction and pregnancy. However, due to technical limitations in visualizing sperm within deep tissues, the mechanisms underlying sperm migration *in vivo* remain poorly understood. This study aimed to elucidate the role of oviductal fluid flow in sperm migration within the female reproductive tract. An *in vivo* imaging platform based on optical coherence tomography (OCT) was established to allow for three-dimensional live imaging of the mouse female reproductive tract. This approach enabled label-free detection of sperm and reconstruction of their trajectories from four-dimensional datasets. Quantitative analyses of sperm motility parameters, including velocity and directional changes, were performed in relation to the surrounding microenvironment. To directly assess the contribution of oviductal flow, an oviduct-specific *Dnah5* conditional knockout mice was utilized. These mice exhibited significantly decreased ciliary beat frequency and markedly reduced fertility. Ongoing OCT-based analyses are quantifying sperm dynamics under flow-deficient conditions. Together, these findings provide a spatiotemporal framework for understanding sperm behavior *in vivo* and demonstrate a critical role for oviductal fluid flow in sperm migration, offering novel insights into reproductive processes and potential applications in reproductive medicine.

### 研究目的

精子が卵子まで到達できるか否かは、受精の成否を決定づける最初の重要な分岐点である。この過程においては、マイクロメートルスケールの微小な精子が、複雑な雌性生殖器内を移動しながら適切な場所へと到達する必要がある。しかしながら、雌性生殖器は体の深部に位置しているうえ、精子一つ一つの挙動は極めて小さく高速であるため、生体内でその動態を直接観察・追跡することは技術的に非常に困難である。このような技術的制約から、受精に至るまでの精子の輸送機構や誘導原理については、依然として不明な点が多く残されている。従って、生体内環境における精子輸送の実体を明らかにすることは、生殖生物学の根幹に関わる喫緊の課題であるといえる。

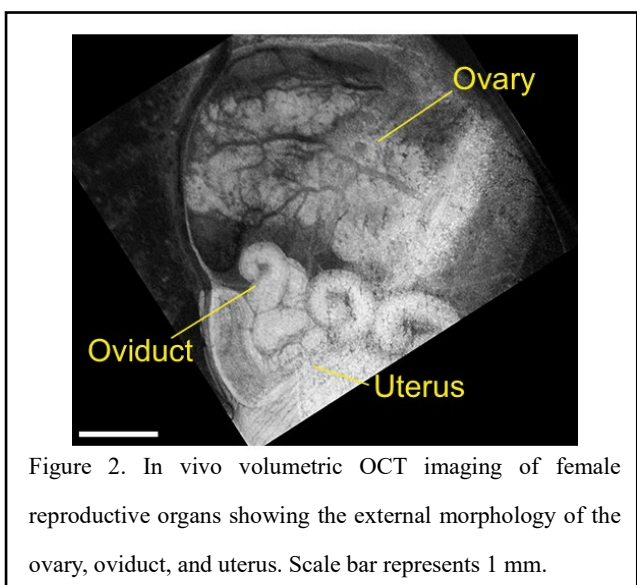
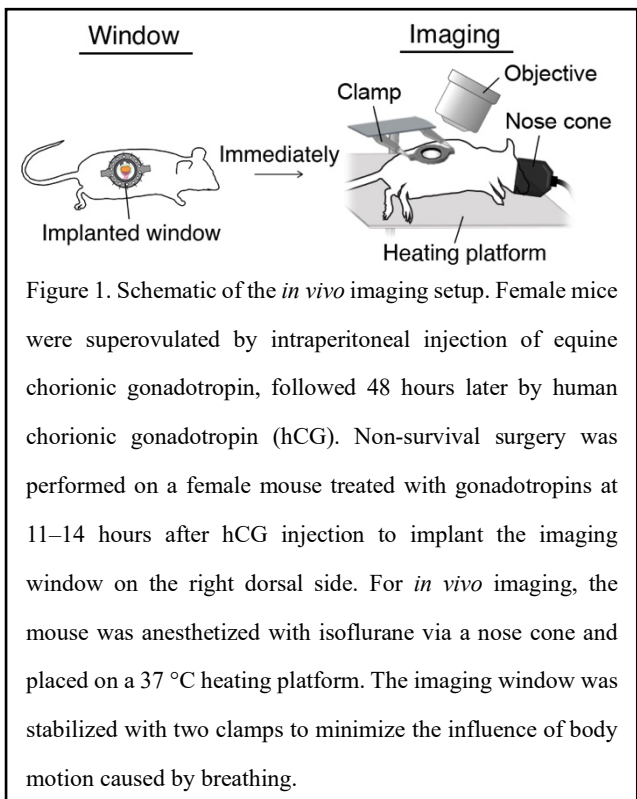
本研究では、精子が流体の流れを感知する特殊な

能力を有している可能性に着目するとともに、実際に受精が起こる場である卵管内において流れ（卵管内フロー）が存在する点に注目した。特に、精子が流れに逆らって泳ぐ性質である「走流性 (rheotaxis)」が、生体内における精子の方向性制御および誘導機構として機能している可能性を検証することを目的とした。すなわち、本研究は、物理的な流体環境と精子の運動応答との関係性を解明することで、これまで十分に理解されてこなかった受精過程の初期段階における新たな制御メカニズムの提示を目指すものである。

### 研究経過

まず、本研究を遂行するにあたり最も重要な技術基盤である光干渉断層計（OCT: optical coherence tomography）を用いたマウス雌性生殖器官の *in vivo*

イメージング技術の確立を試みた。3Dプリンターで作成したイメージングウインドウをメスマウスの背に移植手術を行った (Figure 1)。移植したイメージングウインドウを介して卵巣、卵管、子宮の OCT 3D ライブイメージングに成功した (Figure 2)。これにより、生体マウスにおける雌性生殖器の詳細な内部構造までを三次元で可視化することが可能となった。



また、卵管内で遊走している精子の三次元運動を捉えることも試みた。精子の検出には外部標識を用いず、運動に伴う散乱シグナルの変化を指標として同定が行われた。取得された時系列の三次元ポリ

ームデータ (四次元データ) から精子の位置情報を抽出し、各精子の軌跡を三次元空間上で再構築した。さらに、画像解析ソフトウェアを用いることで、精子の位置、速度、運動方向といった動態パラメータが定量的に算出された。加えて、卵管上皮の三次元構造も同時に再構築することで、精子と周囲組織との空間的関係性の評価も可能とした。これにより、生体内における精子の詳細な三次元運動およびその挙動の多様性を高解像度で解析することが可能となった。この手法を活用して、精子運動ならびに卵管内に存在する微小顆粒のトラッキング解析を試み、現在、フロー速度とフローベクトルを卵管全域で算出中であり、これらのフロー指標と精子運動パラメーター (遊走速度、方向転換の頻度等) との関連解析を予定している。

次に、卵管内におけるフローの役割を検証するためのモデル動物として、*Dnah5* cKO マウスの作成に成功した。*Dnah5* は繊毛運動を駆動するダイニン複合体の主要なモータータンパク質の一つであり、繊毛による流体輸送の形成に不可欠である。本研究では、卵管特異的プロモーターを用いたコンディショナルノックアウト戦略により、卵管上皮において特異的に *Dnah5* を欠損させたメスマウスを樹立し、安定的な系統として維持することに成功した。得られたマウスについて、遺伝子発現解析およびタンパク質レベルでの検証を行い、卵管組織における *Dnah5* の特異的欠損が確実に達成されていることを確認した。

さらに、このメスマウスの卵管上皮における繊毛運動を詳細に解析した結果、*ciliary beat frequency* (CBF) がコントロール群と比較して有意に低下していることが明らかとなり、本モデルが卵管内フローの低下あるいは抑制を反映した実験系として適切であることが示された。また、*Dnah5* cKO メスマウスを野生型オスマウスと交配させ、受精率および産仔数を評価したところ、いずれも顕著な低下が認められ、妊孕性が著しく障害されていることが明らかとなった。これらの結果は、卵管内における流体フローが、生体内での精子輸送および卵子への到達に重要な役割を果たしている可能性を示唆しており、精子誘導機構としてのフローの関与という本研究の仮説を強く支持するものである。

現在は、OCT を用いた *in vivo* 3D ライブイメージングを実施し、オスマウスとの交配後に卵管内で観

察される精子の挙動を詳細に解析している。具体的には、卵子に到達した精子数、到達までに要する時間、個々の精子の運動速度、さらには方向転換の頻度などのパラメータを定量的に算出し、コントロール群との比較解析を進めている。これにより、フローが存在しない、あるいは低下した環境下における精子の三次元的運動特性を明らかにし、生体内における精子誘導メカニズムの解明に迫ることを試みている。

## 考察

以上の研究成果は、精子の運動動態と受精の場である卵管内に存在する流体フローの双方を、生体内において時空間的に統合的に把握することを可能にした点に大きな意義がある。これにより、これまで技術的制約のために直接的な検証が困難であった、生体内における精子誘導機構というブラックボックスに対し、その実体解明に向けた重要な知見を提供するものである。特に、フロー環境と精子の応答との関係性を定量的に示したことは、受精過程の初期段階における新たな制御原理の理解につながると考えられる。

さらに、本研究で確立したモデル動物およびイメージング・解析手法は、今後、精子輸送異常の原因

解明や、さまざまな病態における生殖機能障害の評価に応用可能な基盤技術となり得る。これらの成果は、不妊症の発症メカニズムのより深い理解に寄与するとともに、その診断法や治療戦略の高度化にも貢献することが期待される。また、卵管内環境の物理的要因に着目した本研究の視点は、生殖補助医療における精子選別や受精効率の向上といった技術的改善にも新たな指針を与える可能性がある。以上より、本研究は基礎生物学的意義にとどまらず、臨床応用への展開も見据えた重要な知見を提供するものと位置付けられる。

## 研究の発表

口頭発表

1. **Kohei Umezu**, Andre C Faubert, Shang Wang, Richard R Behringer, Irina V. Larina. Spatiotemporal dynamics of ovulation in live mice. The 58th Society for the Study of Reproduction Annual Meeting, Washington D.C., USA, July 2025
2. 梅津 康平、*In vivo* イメージングを活用した排卵の時空間的動態の解明、第 118 回日本繁殖生物学会公募型シンポジウム、東京、2025 年 9 月