

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07129

研究課題名(和文) 3次元培養系による精細管構造の再構築メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms underlying reconstruction of seminiferous tubule structure by 3-D culture system

研究代表者

安部 眞一 (Abe, Shin-ichi)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：90109637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、樹立したマウス精巣の再凝集培養系を用いて、精巣形成に関わるシグナリング因子、間細胞の役割等について、Live imaging等を活用しながら解析した。その結果、CD34+細胞、p75+細胞、筋様細胞は内側から外側にかけて重層構造を形成して間組織を再構築すること、精細管様構造の再構築に間細胞が必要であること、ALK5i(ALK5阻害剤)は間細胞の増殖や細胞運動を阻害すること、純化したCD34+細胞を培養するとp75+細胞を経て筋様細胞へ分化することを示した。これらの結果は、間組織と精細管様構造の再構築にCD34+細胞とALK5シグナリングが重要であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：To address the testis formation mechanisms, we used 3-D re-aggregate cultures of testicular cells, and revealed following results: Ordered structures similar to interstitial tissues in vivo were reconstructed in re-aggregates consisting of PTMCs, p75+ and CD34+ cells. Interstitial cells were required for re-construction of tubule-like structures. Live cell imaging showed that dynamic cell movement and segregation occurred during the re-construction of tubule-like structures. ALK5i disturbed the proliferation of CD34+ cells, p75+ cells, PTMCs, and SCs, as well as movement of SCs and other types of cells. ALK5i compromised the re-construction of interstitial-like and tubule-like structures. Purified CD34+ cells cultured differentiated into p75+ cells and PTMCs, and ALK5i suppressed this differentiation. These results indicate that CD34+ cells and signaling through ALK5 play pivotal roles in the reconstruction of testicular structures.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：マウス精巣 3次元培養 精細管 再構築 KSR ALK5 Live Imaging CD34+細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精巣はチューブ状の精細管とその外側の間組織から成り、種々の体細胞によって構成されている。精細管の周縁部はセルトリ細胞が互いに密着結合で固く接着しつつ取り巻いており、外側にはコラーゲン等を分泌して基底膜を形成し、内側には細胞質を長く伸長している。生殖細胞はセルトリ細胞と接着しつつ、精原細胞が内腔側に向かって成熟精子へと分化する。基底膜の外側には筋様細胞やリンパ内皮細胞が取り巻いている。間組織には、androgen を産生するライディッチ細胞や血管、内皮細胞等が存在する。

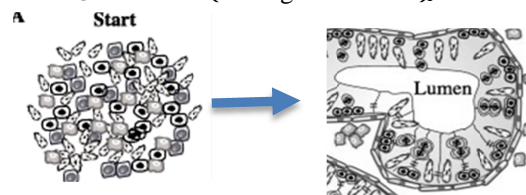
マウス胚における精巣分化は、3段階から成る。第1段階：受精後11日目に Sry 遺伝子の発現により生殖巣原基の体細胞が pre セルトリ細胞へ分化増殖し、始原生殖細胞とランダムに凝集する。第2段階：中腎から生殖巣原基へと遊走した内皮細胞等が、pre セルトリ細胞と始原生殖細胞の凝集体を取り囲み、精巣索 (seminiferous cord) を形成する。同時に血管形成や間組織の細胞から分化したライディッチ細胞によるステロイド産生が起こる。第3段階：生後セルトリ細胞が増殖して、精巣索からチューブ状の精細管へと分化が進む。

この精巣形成のメカニズムの研究については、変異マウスを用いた *in vivo* のモデルと胚や生後精巣の培養系を用いた *in vitro* のモデルがある。ノックアウトマウス等を用いた *In vivo* の研究からセルトリ細胞が産生する FGF9, PDGF α , NGF, AMH, VEGF α , desert HH, TGF- β family member (activin 等) がセルトリ細胞の増殖と索の形成に必須であると報告されているが、決定的な結論には至っていない (review by Ungewitte and Yao, 2013)。

In vitro の研究に関して、Fritz らは pioneer として、多くの論文を発表している (Tung and Fritz, 1994)。*In vitro* でラットのセルトリ細胞と筋様細胞は、相互作用することによって精巣索様構造を形成し、2つの細胞層の間に基底膜を形成する。また、Hadley et al. (1987) は、ラットセルトリ細胞を再構成基底膜 (Matrigel) 中で培養すると、立体的なセルトリ細胞が密着構造を持って互いに結合する球状の精巣索へ分化することを示した。しかし、精巣索から精細管構造への形態形成は、精巣索をヌードマウスの皮下に移植することによってしか進行しない (Gassei and Schlatt, 2007)。

我々は、生後6日目の精巣 (生殖細胞は A 型精原細胞まで存在) を解離、再凝集させてコラーゲン内 3 次元培養を行い、KSR (Knockout Serum Replacement) を添加することにより、ほぼ完全な精巣再構築に成功した (Zhang et al., 2014)。培養0日目、セルトリ細胞は小さな凝集塊を形成しているが、筋様細胞や精原細胞、ライディッチ細胞は丸い形でほぼ一様に分散していた。+KSR 培地では3日後、セルトリ細胞凝集塊の拡大、筋様細胞が精巣索の外側に付着、伸長するなど精

巣索 (cord) 構造の形成が見られた。生殖細胞は精巣索の内側に、ライディッチ細胞は索の外側に局在した。さらに +KSR で 1~3 week 培養すると、セルトリ細胞が索の外縁部に一層に並び、核と細胞質が伸長、Tight junction の形成、内腔 (lumen) の形成など精細管様構造の形成が見られた。また、精原細胞は第一精母細胞へ分化した。しかし KSR を含まない培地では、このような形態形成は全く見られなかった。このように、精巣索形成を超えて、ほぼ完全な精細管構造の形成に成功したのは、希有な例である。これらの結果は、精巣索の形成機構 (セルトリ細胞の凝集と極性化等) と精細管の形成機構 (極性化したセルトリ細胞の伸長と分化、内腔の形成等) について *in vitro* で調べるユニークなモデル系が確立されたと考えられる (Zhang et al. 2014)。



2. 研究の目的

我々は、これまでに樹立した精巣のユニークな再凝集培養系を用いて、またトランスジェニックマウスを用いて、精巣形成に関わるシグナリング因子、間細胞の役割等について、Live imaging 等を活用しながら解析することを目的とした。

3. 研究の方法

I. コラーゲン内 3 次元培養系による再凝集培養

生後 10-12 日目の マウスの精巣を酵素処理で解離し、50 μ m mesh のナイロンガーゼで固まりを除いた後、細胞を回転培養器で再凝集させ、エッペンチューブに分けて遠心する。細胞のペレットを少量のコラーゲンと共に吸い上げ、nuclepore filter に乗せて 35-mm のプラスチック培養皿の底に置き、コラーゲンが固まったら、10% KSR を含む RPMI-1640 培地を注ぎ込み、filter を浮かせる。34、5% CO₂、50% O₂ で 3~7 日間培養した。

II. 純化した CD34⁺細胞の培養

精巣を collagenase 処理によって間質に富む分画を分離した後、biotin 化した CD34 に対する抗体、次に抗 biotin マイクロビーズと反応させ、MACS カラム (磁気分離法) によって CD34⁺細胞を純化する。poly-L-lysine でコートし、洗った後コラーゲンでコートしたカバーガラス 1 枚を 35-mm の培養皿に置く。半数の培養皿には RPMI+KSR を、残りの半数には StemPro 培地を入れる。

III. 蛍光免疫法

コラーゲン内の再凝集培養は4% PFAで固定し、パラフィン包埋する。5 μ m切片を煮沸によって抗原不活化し、1次抗体を4 一晚、2次抗体を室温で2時間処理した。蛍光顕微鏡 (BX61VS-ASW, Olympus)で観察した。

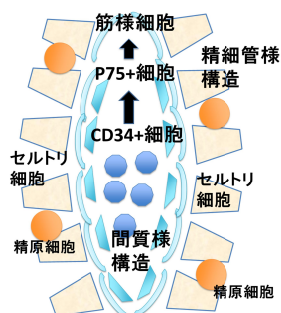
IV. Live Imaging によるタイムラプス観察

セルトリ細胞のみに EGFP を発現する Sox9-EGFP 精巣の再凝集培養を cell culture insert (Falcon, REF353090)に乗せ、それをガラス底培養皿 {3910-035-MYP, 27 mm (No.1), IWAKI}に置く。CV1000 共焦点顕微鏡でタイムラプス観察した。

4. 研究成果

1) 再凝集培養において CD34⁺細胞, p75⁺細胞, 筋様細胞は間質様構造を再構築する

間質や精細管辺縁に存在する CD34⁺細胞, p75⁺細胞, 筋様細胞の再構築に於ける挙動を調べたところ、当初別々の固まりを形成していたが、3日目には3種の細胞群がお互いに混ざり合い、外側から筋様細胞、p75⁺細胞、CD34⁺細胞と3層を形成し、一部の細胞は2種類の抗原を同時発現することが観察された。また、p75⁺細胞、CD34⁺細胞は3日目にピークを持つ増殖活性を示した。これらの結果は、CD34⁺細胞→p75⁺細胞→筋様細胞と増殖しつつ分化して行くことを示唆する。



精細管様構造と間質様構造の再構築

2) 再凝集培養におけるセルトリ細胞や他の細胞の Live cell imaging 観察から、索や精細管様構造形成は動的なプロセスである

直径 500 μ m 以上の再凝集体を観察すると、蛍光を発するセルトリ細胞と発しない細胞が活発に動き回りながら、2-3 日以内により大きな固まりへと分離した。これは小さなセルトリ細胞の集合体が集合して索様構造を形成すると同時に CD34⁺, p75⁺細胞や筋様細胞らが間質組織を形成していくと考えられる。

50-500 μ m の小さな再凝集体を観察すると、より小さな凝集体がより大きな凝集体に向かって近寄り、1週間以内に1つの大きな凝集体を形成した。この過程を詳細に観察すると、非蛍光の丸い、あるいは細長い細胞群が再凝集体から動きだし、他の再凝集体から伸び出した細胞と繋がって2つの再凝集体との間に「橋」を形成する。いくつかの再凝集体はお互いをこの「橋」を通じて引っ張り合い、互

いに融合していくものと考えられる。

3) 索や精細管様構造形成には間質と精細管周囲の細胞が必要である

索構造の再構築に間質や精細管周囲の細胞が必要かどうかを調べるために、間質や精細管周囲の細胞をできるだけ除去して再凝集培養を行った。その結果、除去されなかった筋様細胞 2-3 個の周りにセルトリ細胞が不規則に配列するが、索構造と間質を明瞭に判別することは困難であった。また、除去した間質や精細管周囲の細胞をセルトリ細胞分画に戻してやると、整然とした一列のセルトリ細胞が配列した精細管様構造とその外側の間質様構造が再構築された。このことから、索様構造や精細管様構造の再構築には、間質と精細管周囲の細胞が必要であることが示唆された。

4) SB431542 と ALK5i は索様構造や精細管様構造の再構築を阻害する

精巣発生には TGF β signaling が重要な働きをすることが知られているので、ALK4/5/7 inhibitor である SB431542 と ALK5 inhibitor である ALK5i を再凝集培養に投与して索や精細管様構造の再構築に対する影響を調べた。20 μ M SB431542 を投与すると、索様構造と間質様構造の区別がつかず、セルトリ細胞の核は丸くランダムに分布していた。多くの筋様細胞も丸く不規則に分布していた。15 μ M の ALK5i も同じ効果であった。これらの結果から、索構造・精細管様構造の再構築には ALK5 を通した TGF β signaling が必須であることが示唆された。

5) ALK5i は CD34⁺細胞, p75⁺細胞, 筋様細胞による間質様構造と精細管周辺構造の再構築を阻害する

再凝集培養に ALK5i を 3 日間投与すると、CD34⁺細胞と p75⁺細胞の再凝集体のサイズが減少し、本来それぞれ内側と外側に局在するはずのものがランダムに混ざっていた。筋様細胞も再凝集体の外側だけでなく、内側にも分布していた。7 日目になると、CD34⁺細胞と p75⁺細胞が同一の再凝集体に存在しなくなった。これらの結果は、ALK5i が CD34⁺細胞、p75⁺細胞と筋様細胞の相互作用を阻害することを示唆する。また、ALK5i は再凝集体のラミニンの発現パターンも阻害したことから、ラミニン産生に必要な筋様細胞とセルトリ細胞の相互作用も阻害することを示唆する。

ALK5i は PCNA⁺の CD34⁺細胞、p75⁺細胞、筋様細胞の割合も減らすことから、3種類の細胞の増殖を低下させることが示唆された。

さらに、Live cell imaging の結果、ALK5i はセルトリ細胞だけでなく他の細胞の運動能力も低下させることが明らかになった。

6) 純化した CD34⁺細胞の培養により、CD34⁺細胞は p75⁺細胞を経て α -SMA⁺筋様細胞へと

分化することを証明した。また、この分化は ALK5i によって阻害される

CD34⁺細胞から p75⁺細胞を経てα-SMA⁺筋様細胞へと分化するかどうかを調べるために、CD34 抗体を用いた磁気分離法によって CD34⁺細胞を純化し、collagen コートしたカバーグラス上で培養した。その結果、KSR のみの培養では3日で CD34⁺細胞から p75⁺細胞、筋様細胞へと分化したが、Alk5i を加えると CD34⁺細胞から p75⁺細胞、筋様細胞への分化を阻害した。これらの結果は、CD34⁺細胞から p75⁺細胞、p75⁺細胞から筋様細胞へと分化すること、その分化を Alk5i が直接阻害することを証明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

1 Abe S-I, Abe K, Zhang J, Harada T, Mizumoto G, Oshikawa H, Akiyama H, Shimamura K (2017)

Roles of CD34⁺ cells and ALK5 Signaling in the Reconstruction of Seminiferous Tubule-like Structures in 3-D Re-aggregate Culture of Dissociated Cells from Neonatal Mouse Testes.

PlosOne, 12(11): e0188705. (査読有) DOI: 10.1371/journal.pone.0188705

2 Arai T, Ono Y, Arimura Y, Sayama K, Suzuki T, Shinjo S, Kanai M, Abe S-I, Semba K, Goda N. (2017) Type I neuregulin1 is a novel local mediator to suppress hepatic gluconeogenesis in mice. Sci. Rep. 7:42959. (査読有) DOI: 10.1038/srep42959

3 Takeda N, Yoshinaga K, Furushima K, Takamune K, Li Z, Abe S-I, Aizawa S, Yamamura K. (2016) Viable offspring obtained from Prm1-deficient sperm in mice. Sci. Rep. 6:27409. (査読有) DOI: 10.1038/srep27409

[学会発表](計 4件)

1 安部眞一、安部和子、張継東、秋山治彦、嶋村健児
マウス精巣3次元再凝集培養におけるセルトリ細胞と非セルトリ細胞の動態
第88回日本動物学会大会(平成29年9月、富山県民会館)

2 Abe S-I, Abe K, Zhang J, Akiyama H, Shimamura K
Live Cell Imaging Shows Dynamic Behavior of Sertoli Cells and Other Types of Testicular Cells in 3-D Culture of Re-Aggregated Cells from Neonatal Mouse Testis.
18th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE18) Chateau Lake Louise, Canada, June 2017

3 Abe S-I, Zhang J, Harada M, Oshikawa H, Akiyama H, Shimamura K, Abe K
Roles of ALK5 signaling in the reconstruction of seminiferous tubule-like structures in 3-D culture.
第87回動物学会大会(沖縄)2016年11月

4 安部眞一、張継東、原田昌朋、安部和子
3次元培養による精細管様構造の再構築に対する Alk5 阻害剤の効果
第86回日本動物学会大会(新潟市朱鷺メッセ)2015年9月

[その他]

<https://acoffice.jp/khsuhp/KgApp?kyoinId=yimeiyybggy>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安部 眞一 (ABE, Shin-ichi)
熊本保健科学大学・保健科学部・教授
研究者番号: 90109637

(2)研究分担者

なし ()
研究者番号:

(3)連携研究者

工楽 樹洋 (KURAKU, Shigehiro)
特定国立研究開発法人理化学研究所生命機能科学研究センター・分子配列比較解析ユニット・ユニットリーダー
研究者番号: 40391940

(4)研究協力者

安部 和子 (ABE, Kazuko)
熊本保健科学大学・保健科学部・共同研究員