

令和元年6月12日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07688

研究課題名(和文) 季節繁殖動物における精原幹細胞ニッチシステムの解析

研究課題名(英文) Spermatogonial stem cell niche in seasonal breeding mammals

研究代表者

恒川 直樹 (TSUNEKAWA, Naoki)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50431838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：精子の幹細胞である精原幹細胞は、曲精細管内の微小環境(ニッチ)に存在し、セルトリ細胞によって構成されるニッチシステムにより巧みに制御されることが知られている。本研究課題では、季節によって精巣重量を大きく変動させるハムスターを材料に、季節繁殖動物の精原幹細胞ニッチシステムについて組織学的な解析を行った。その結果、曲精細管と精巣網を接続する弁様構造(セルトリバルブ)においてGDNFの局在が認められ、その領域にはGFR α 1陽性精原幹細胞が多数認められた。すなわち、ハムスターでは、セルトリバルブ領域においても精原幹細胞ニッチシステムが備わり、精原幹細胞の安定供給に役立っていると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種の連綿を支える生殖細胞は、体細胞とは異なる特殊なシステムで制御されている。精子の生産においては、巧妙な細胞分裂様式によって大量生産を可能にしている。その源泉となる細胞が精原幹細胞であり、その細胞が宿る特殊環境をニッチと呼ぶ。本研究課題では、季節によって精巣に大きな変動が認められるハムスターを材料に解析を行ったところ、新たなニッチの発見に至った。これにより、精原幹細胞が局在する新たな領域が明らかとなったことから、精原幹細胞を利用した生殖医療や発生工学的的手法による希少動物の保全等、応用利用に必要な基礎的な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a valve-like terminal segment of the seminiferous tubules, the Sertoli valve, adjacent to the rete testis as new niche system for GFR α 1-positive spermatogonia in seasonally breeding hamsters. The Sertoli valve epithelium constitutively expresses GDNF, a major niche factor for SSCs, and supports the stable proliferation and selective maintenance of an A-single subpopulation of GFR α 1-positive spermatogonia in hamsters. The Sertoli valve region of hamster seminiferous tubules has features that are similar to the stem cell niche in invertebrate gonads. We therefore propose that the Sertoli valve may be a novel niche for A-single GFR α 1-positive spermatogonia potentially including a SSC population, at the terminal segments of the seminiferous tubules in hamsters.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精原幹細胞 ニッチ 季節繁殖 精子発生 セルトリ細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種の連綿を支える生殖細胞は、体細胞とは異なる特殊なシステムで制御されている。将来の精子に分化することができる細胞は精原細胞(精祖細胞)であり、体細胞分裂によりその数を増やし、その結果大量の精子の供給を可能にしている。その根源を司る幹細胞は、(Spermatogonial Stem Cells; SSCs) もしくは配偶子幹細胞と呼び、精巣内の精細管の微小環境、すなわちニッチ内に位置する。精子の幹細胞である精原細胞には未分化型と分化型が存在し、このうち未分化型がニッチに宿る。その分裂はセルトリ細胞により構成されたニッチシステムにより制御され、マウスを材料にして動態が少しずつ明らかになってきた。しかし、周年繁殖動物のマウスは、常に精子発生の活性が高く、このためニッチシステムが機能的に簡略化されている可能性がある。本質的な制御機構を明らかにするためには、生殖細胞の数を季節によって激しく変動させる季節繁殖動物を対象にして、ニッチシステムの普遍性について調べてみる必要性が生じた。

2. 研究の目的

(1) ニッチは主にセルトリ細胞によって形成され、セルトリ細胞は SSCs の定着、増殖、および分化を支持することが明らかとなっている。精細管の基底区画、すなわち基底膜と隣接するセルトリ細胞間の tight junction (血液精巣関門) に囲まれた空間には精原細胞が位置し、この一部がニッチを形成して SSCs が宿る。SSCs は未分化性を維持した状態で SSCs 自身に分裂する他、分化型の精原細胞に分化することができる。分化型精原細胞は、その後、精母細胞、精子細胞を経て精子になる。これまでの研究で、ニッチを形成するセルトリ細胞は GDNF を分泌し、また SSCs はその細胞質全体が GFR 1 (GDNF family receptor 1) 陽性を示すことが明らかとなっている。

(2) 本研究課題に先立ち、正常な精子発生状態において、セルトリ細胞の各分化段階における GDNF 局在の時空間的な変化を解析した結果、GDNF の発現は、精上皮周期(ステージ)依存的に変化し、spermiation (精子離脱) 期に高レベルとなること、GDNF のセルトリ細胞特異的な発現開始は、セルトリ細胞分化のマスター遺伝子である SOX9 の比較的直下で制御されていること、分泌された GDNF は、セルトリ細胞の細胞間隙に集積していること、GDNF 陽性領域では、抗 GFR 1 抗体による陽性細胞の細胞質突起が、GDNF 陰性領域に比べて極めて伸展した形状を示すことなどを明らかにしてきている。しかしながら、依然として GDNF の発現と GFR 1 陽性細胞の関連性など不明な点が数多く、周年繁殖動物のマウスを材料にした解析では、ニッチシステムによる SSCs の制御機構の全容を解明するには至らない。一方、ニッチシステムはデリケートなので、薬剤処理などの人為的措置は必ずしも正確な情報が得られるものではないと思われる。そこで本研究では、季節繁殖動物であるハムスターを用い、これまで着手することができなかった点の解決を試みた。非繁殖期に誘導により分化した精細胞は、精上皮から排斥され、GFR 1 陽性の SSCs を高頻度に探し当てることができ、さらに非繁殖期から繁殖期を材料にすることにより、GDNF 発現と GFR 1 陽性細胞の関連性を明確にすることにより、周年繁殖動物のマウスでは解析できないニッチシステムの制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 非繁殖期ハムスターの作出と評価: 長日条件(12L:12D)にて飼育された性成熟個体(生後8週齢)のシリアンハムスター(*Mesocricetus auratus*; Slc 系統)を材料として用いた。冬眠様非繁殖期(Hibernation-like-non-reproductive period; Hib 期)への誘導は、ハムスターの性質を利用し、短日条件(6L:18D)で2週間の慣らし飼育後(Hib0~1)、短日条件、低温(室温18以下)によって誘導を行い、2~23週間後(Hib2~23)に採血および精巣の採材を行った(Hib 群)。血中の LH、FSH 値は、ELISA 法にて測定し、繁殖期の評価を行った。摘出後の精巣はブアン固定あるいは4%PFAで固定し、パラフィン切片もしくは精細管の全載標本を作製した。精巣組織は、HE による一般染色の他、種々の分子マーカーである GFR 1(SSCs)、SCP3(精母細胞)、GATA4(セルトリ細胞)、GDNF(自己複製因子)、HIF1 (低酸素誘導因子)および PH3 (細胞分裂)による免疫組織化学的解析によって、評価を行った。

(2) GDNF、GFR 1 の分布パターンの解析: 採材された精巣組織から精細管を単離し、常法に従い固定後、whole mount 標本において、GDNF、GFR 1 の二重染色を施し、両因子の分布パターンを調べた。特に、活発な精子発生が認められる8週齢を比較対象として、非繁殖期へと至る過程を追って比較検討し、精細管上での分布の相違点を明らかにした。同時に、精巣組織を常法に従い固定、包埋を施し、切片を作製後に、GDNF、GFR 1 の二重染色を施し、より局所的な GDNF、GFR 1 の分布パターンの相違点を明らかにした。

(3) 形態計測による比較解析

精細管における GDNF 陽性および陰性領域の割合、それらの領域に存在する GFR 1 陽性細胞の割合、シグナル活性化の度合い、GFR 1 陽性の細胞質突起の数値(細胞の長軸/短軸の比率、突起の長さ)を形態計測により定量化を行った。

4. 研究成果

(1) 冬眠様非繁殖期への誘導系の確立: Hib5 より体温の低下を伴う睡眠 (2~5 日おきの睡眠・覚醒の反復) が観察された。睡眠時には、体温 10 前後(正常時 37)、呼吸数 0~6 回/分(正常時: 30~32 回/分)まで低下し、血清中の LH・FSH 濃度は繁殖期と比較し Hib 群で有意に低下していた。精巣は、Hib3 より退縮が始まり、Hib11 になると、繁殖期の約 1/10 に低下した。その後 Hib13 以降になると、精巣重量は増加し、精子発生の回復が始まった。精巣の組織学的解析では、精巣重量の低下に伴って精細管の直径が縮小し、精細胞の脱落像が観察された。なかでも精巣重量が最低値を示した Hib9~11 の個体では精細管の管腔が閉鎖し、セルトリ細胞の他、ごく少数の SSCs が観察されるのみとなった。さらに細胞レベルでの冬眠状態をモニタリングするため、低酸素状態の指標となる HIF1 により、免疫組織化学的な検討を行ったところ、繁殖期に比べて陽性細胞が多く観察された。以上の結果から、本法により冬眠様非繁殖期への誘導が示唆された。

(2) 精子発生の抑制と SSCs の分裂: 曲精細管と精巣網を接続する弁様構造(セルトリバルブ)において GDNF の局在が認められ、その領域には GFR 1 陽性精原幹細胞が多数認められた。非繁殖期を継時的に観察したところ、Hib 群では Hib5~11 のすべての材料において GFR 1 陽性の SSCs が観察された。さらに、精細管が完全に閉鎖している Hib11 においても抗 GFR 1 抗体陽性細胞の中に抗 PH3 抗体陽性細胞が認められ、SSCs の細胞分裂が行われていることが明らかになった。また、抗 SCP3 抗体陽性の精母細胞が認められたが繁殖期に比べ低頻度となっており、その後の減数分裂後の精子細胞等は観察されなかった。これらの結果から、Hib 期では、精子発生は完全に停止しているのではなく初期の段階までは進んでいること、代謝活性が極端に低下した環境においても SSCs の分裂が行われていることが判明した。

(3) SSCs の数と形態の変化: Hib 群と繁殖期の比較を行うため、両者の精細管ホールマウント標本を用いた抗 GFR 1 抗体陽性細胞の分布様式について、定量解析により比較を行った。その結果、セルトリ細胞当りの陽性細胞の細胞数を経時的に解析したところ、Hib 群では繁殖期群より有意に増加していた。さらに GFR 1 陽性細胞の細胞形態を調べるため、長径と短径の比率を求めたところ、繁殖期群は長く細胞突起を伸ばしているのに対し、Hib 群では突起が短く、細胞レベルでの活動の低下が示唆された(図 1)。また、GDNF の発現は繁殖期群において精上皮周期に依存した発現パターンを示したが、Hib 群では導入後発現が低下し、その後 Hib5 から周期性が消失した。Hib9~11 で最も発現が低下していたが、ごくわずかなセルトリ細胞で強く発現していた。Hib18 以降は周期性が回復したことから、次の繁殖期に向けた回復期となっていると考えられる。SSCs は冬眠様非繁殖期において導入初期(Hib2~5)にその数を増やし、Hib5 を境に減少していくことが明らかとなった。その間、GDNF の発現が低下し、SSCs の細胞突起が短縮していったことと併せて考えると、Hib5 以降の SSCs の自己複製は抑制傾向にあると推察された。

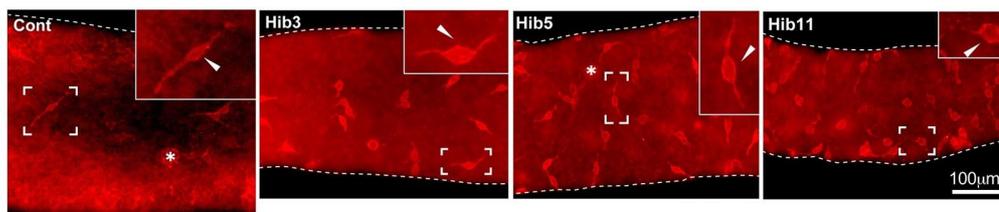


図 1: 抗 GFR 1 抗体による精細管 Whole mount 標本の免疫染色像を示す。陽性シグナルは、赤色蛍光で示され、矢頭は一部拡大された陽性細胞 (SSCs) を示す。Cont: 繁殖期、Hib3~11: 非繁殖期。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Kishi, K., Uchida, A., Takase, H.M., Suzuki, H., Kurohmaru, M., Tsunekawa, N., Kanai-Azuma, M., Wood, S.A., Kanai, Y., 2017. Spermatogonial deubiquitinase USP9X is essential for proper spermatogenesis in mice. *Reproduction* 154, 135-143. 査読有り

Uchida, A., Kishi, K., Aiyama, Y., Miura, K., Takase, H.M., Suzuki, H., Kanai-Azuma, M., Iwamori, T., Kurohmaru, M., Tsunekawa, N., Kanai, Y., 2016. In vivo dynamics of GFR α 1-positive spermatogonia stimulated by GDNF signals using a bead transplantation assay. *Biochem Biophys Res Commun* 476, 546-552. 査読有り

Aiyama, Y., Tsunekawa, N., Kishi, K., Kawasumi, M., Suzuki, H., Kanai-Azuma, M., Kurohmaru, M., Kanai, Y., 2015. A Niche for GFR α 1-positive spermatogonia in the

terminal segments of the seminiferous tubules in hamster testes. Stem Cells 33, 2811-2824. 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

安田拓央、杉山まどか、金澤朋子、森友忠昭、恒川直樹、ブタ精巣組織を用いた *in vitro* 精子発生の試み、第161回日本獣医学会学術集会(獣医解剖分科会)2018年9月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~kurashi/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：九郎丸 正道

ローマ字氏名：KUROHMARU, Masamichi

所属研究機関名：岡山理科大学

部局名：獣医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00148636

研究分担者氏名：金澤 朋子

ローマ字氏名：KANAZAWA, Tomoko

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：助手

研究者番号(8桁)：20748470

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。