

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15013

研究課題名(和文) Leydig幹細胞の試験管内増幅技術の確立

研究課題名(英文) Development of in vitro culture system for expansion of Leydig stem cells

研究代表者

篠原 美都 (Shinohara, Mito)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10372591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年生殖細胞だけでなくLeydig細胞も幹細胞システムから成ることが明らかになった。本研究ではLeydig幹細胞を試験管内で増幅する長期培養系の確立を目指した。Leydig 幹細胞を濃縮するためHoechst 色素の排出能に基づくside population (SP)分画を無血清培地にて培養したところ、2週間後にLeydig細胞マーカーPDGFRAの発現が一部に認められた。野生型マウス精巣の間質に、培養細胞(Green マウス由来)を注入し3ヶ月後にUV照射にて観察したところ、間質にEGFPを発現する細胞の生着が認められたが、Leydig細胞マーカーPDGFRA発現は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest a possibility that not only germ cell, but Leydig cells of testes is supported by stem cell system. This study aimed at the establishment of in vitro culture system to maintain and expand Leydig stem cell for a long-term period. To enrich Leydig stem cell population, we isolated side population (SP) fraction from testes cells, based on the ability of stem cells to effectively exclude the dye Hoechst 33342. After SP fraction was cultured with serum-free medium for 2 weeks, a part of the cultured cells expressed PDGFRA, a marker of Leydig cells. Cultured cells derived from Green mice, which ubiquitously express EGFP, were dissociated by enzyme digestion and injected into the interstitial space of wild-type mouse testes. At 3 months after injection, host testes had EGFP expressing cells, which was detected by UV light excitation, however, immunofluorescence study showed that Leydig cell marker PDGFRA was not detected in EGFP expressing cells.

研究分野：生殖医学

キーワード：幹細胞 生殖 精子

1. 研究開始当初の背景

精巣の精細管を構成する体細胞には、精子形成細胞に密に接し支持する主要な役割をもつ Sertoli 細胞と、精細管の外側にあたる間質に局在する Leydig 細胞、Myoid 細胞などがある。Sertoli 細胞についてはこれまでに幅広く研究が行われ、特異的に発現する遺伝子群の解明や様々な細胞株の樹立・精子形成細胞への作用の解析などを通して、近年その実体が明らかになりつつある。研究代表者らは 2003 年に試験管内でマウス精子幹細胞を増幅する長期培養系を確立し (Kanatsu-Shinohara et al. *Biol. Reprod.* 69, 612-6, 2003) また 2012 年には精子幹細胞の機能を支持する活性を保ったまま Sertoli 細胞を初代培養することに成功した (Kanatsu-Shinohara et al. *Cell Stem Cell* 11, 567-78, 2012)。一方、Leydig 細胞や Myoid 細胞については精巣中での数が極めて乏しく、また試験管内で解析する実験系がなかったため、その実体は殆ど明らかでない。それにも関わらず近年、精子幹細胞のニッチ (幹細胞の生息する微小環境) の局在を Leydig 細胞や Myoid 細胞が決めている可能性や、Leydig 細胞自体が幹細胞システムで維持されている可能性 (Leydig 幹細胞の存在) が提唱されるなど、これらの細胞は直接生殖細胞に接触していないにも関わらず、精子形成制御機構の上位にあり重要な働きをしている可能性が指摘されるようになった。

Leydig 細胞の試験管内培養については、これまで不死化した Leydig 細胞株の樹立は報告されているが、正常な Leydig 幹細胞としての活性を維持したまま長期に増幅・維持する実験系は未だ確立されていない。近年の研究から、精巣における数は極めて少ないものの Leydig 幹細胞の存在が指摘され、試験管内にて増幅できる可能性が出てきた (Lo et al. *Endocrinology* 145, 4011-5, 2004)。

2. 研究の目的

Leydig 細胞は精巣内での頻度が低いいため研究が難しく、試験管内での解析は不死化した Leydig 細胞株によるものが主であった。本研究では Leydig 幹細胞を試験管内で増幅する長期培養系の確立を目指した。

3. 研究の方法

一般に ATP-binding cassette (ABC) transporter による Hoechst 色素の排出能に基づきフローサイトメトリーにて解析すると、幹細胞集団が side population (SP) 分画に濃縮されるといわれている。精巣の Leydig 幹細胞もこの SP 分画に濃縮されるという報告があり (Lo et al. *Endocrinology* 2004)、本研究では SP 分画をソーティングにて採取し、細胞培養に用いた。生後 6-8 週齢の ROSA26 マウス (全身にて β -galactosidase を発現) Green マウス (全身にて EGFP 発現; 大阪大学・岡部勝博士より供与) の精巣、ま

たはこれらのマウスから実験的に作成した停留睾丸 (cryptorchid: haploid の生殖細胞がないため、より Leydig 細胞が濃縮されている) を用いた。精巣細胞を collagenase と DNase にて採取し、Hoechst 33342 にて染色し、セルソーターにて Hoechst red と Hoechst blue で展開し、色素取り込みの少ない SP 分画を回収した。さらに ABC transporter の阻害剤 Verapamil にて SP 分画が消失することも確認した。

濃縮した細胞集団を EGF, FGF2, PDGF などのサイトカインの存在下で培養した。研究代表者らが Sertoli 細胞の培養にて使用した無血清培地を改変する他 (Kanatsu-Shinohara et al. *Cell Stem Cell* 11, 567-78, 2012; Kanatsu-Shinohara M., et al. *Biol. Reprod.* 91(4), 88, 2014)、DMEM, IMDM, DMEM/F12, α MEM など各種の培地をベースに無血清培地を作成して試した。Tissue culture-coated plate に直接播種するか、または細胞外マトリクスとして laminin もしくは collagen にてコートしたプレートなどに播種するなど、様々な条件を組み合わせて試した。温度は 37 と精巣環境に近い 32 の両方を試した。

サイトスピンにより上記 Leydig 培養細胞を一部標本にし、ステロイド産生に関わる cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc) や、PDGF 受容体など Leydig 細胞のマーカーの発現の有無を免疫染色にて調べ、Leydig 細胞の形質を維持しているか確認した。

4. 研究成果

Leydig 幹細胞を濃縮するため Hoechst 色素の排出能に基づく、SP 分画を、停留睾丸から採取した。この細胞集団を様々な条件にて培養し、試験管内の増幅を目指した。「3. 研究の方法」に記載の通り、様々な培地および温度、細胞外マトリクス、温度などの組み合わせを試した結果、IMDM 培地をベースに無血清培地にて、laminin にてコーティングにプレートに細胞集団を播種し、37 にて培養した条件において、培養開始から 2 週間後に免疫染色にて調べたところ、Leydig 細胞のマーカーである PDGF 受容体の発現が一部の細胞に認められた。一方、発現レベルが低いもののステロイド産生に関わる cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc) の発現が、一部で認められた。

次に Leydig 培養細胞が試験管内で増幅しているか否かを調べるため、培養開始から 2 週間後と 4 週間後で PDGF 受容体の発現細胞の数を免疫染色により測定し比較を行ったところ、4 週間後では 2 週間後に比較してむしろ減少していた。

培養細胞が Leydig 幹細胞であるか否かを調べるため、野生型マウス精巣の間質に、Leydig 培養細胞 (Green マウス由来) を micropipette を用いて注入した。移植後 2-

3ヶ月で宿主精巣を摘出し UV 照射にて観察したところ、間質に EGFP を発現するドナー細胞の生着が認められた。しかし免疫組織染色により EGFP 発現細胞を調べたが、Leydig 細胞マーカー PDGFRA 発現は認められなかった。

<引用文献>

Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69:612-616 (2003)

Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Takashima S., Takehashi M., Ogonuki N., Morimoto H., Nagasawa T., Ogura A., Shinohara T. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell* 11:567-578 (2012)

Lo K.C., Lei Z., Rao Ch. V., Lamb D. J. De novo testosterone production in luteinizing hormone receptor knockout mice after transplantation of leydig stem cells. *Endocrinology* 145:4011-5 (2004)

Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Matoba S., Morimoto H., Ogura A., *Shinohara T. Improved serum- and feeder-free culture of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 91(4):88 (2014)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

Watanabe S., Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Matoba S., Ogura A., Shinohara T. In vivo genetic manipulation of spermatogonial stem cells and their microenvironment by adeno-associated viruses. *Stem Cell Reports* S2213-6711 (18): 30132-2 (2018) 査読有
doi: 10.1016/j.stemcr.2018.03.005

Kanatsu-Shinohara M., Naoki, N., and Shinohara, T. Nonrandom contribution of left and right testes to germline transmission from mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 92(6):902-910 (2017) 査読有
doi: 10.1093/biolreprod/iox141.

Shinohara T., Kazuki K., Ogonuki N., Morimoto H., Matoba S., Hiramatsu K., Honma K., Suzuki T., Hara T., Ogura A.,

Oshimura M., Kanatsu-Shinohara M., Kazuki Y. Transfer of a mouse artificial chromosome into spermatogonial stem cell generates transchromosomal mice. *Stem Cell Reports* 9(4):1180-1191 (2017) 査読有
doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.012.

Watanabe S., Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Matoba S., Ogura A., Shinohara T. Adeno-associated virus-mediated delivery of genes to mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 96(1):221-231 (2017) 査読有
doi:10.1095/biolreprod.116.143495.

Kanatsu-Shinohara M., Tanaka T., Ogonuki N., Ogura A., Morimoto H., Cheng PF., Eisenman RN., Trumpp A., Shinohara T. Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 30(23):2637-2648 (*equal contribution) (2016) 査読有
doi:10.1101/gad.287045.116.

Tanaka T., Kanatsu-Shinohara M., Lei Z., Rao CV., Shinohara T. The luteinizing hormone-testosterone pathway regulates mouse spermatogonial stem cell self-renewal by suppressing WNT5A expression in Sertoli cells. *Stem Cell Reports* 7(2): 279-91 (2016) 査読有
doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.005.

Kanatsu-Shinohara M., Naoki H., Shinohara T. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. *Dev. Cell* 38 (3): 248-61 (2016) 査読有
doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.011.

Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Shinohara T. Fertility of male germline stem cells following spermatogonial transplantation in infertile mouse models. *Biol Reprod.* 94(5):112 (2016) 査読有
doi: 10.1095/biolreprod.115.137869.

Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Shinohara T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by the stem cell dye CDy1. *Biol Reprod.* 94(1):13 (2016) 査読有
doi: 10.1095/biolreprod.115.135707.

Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara M., Hirose, M., Ogura, A., Shinohara, T. Pluripotent cell derivation from male

germline cells by suppression of Dmrt1 and Trp53. *J. Reprod. Dev.* 2015;61(5):473-84 査読有
doi: 10.1262/jrd.2015-059.

Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara, T. The CDKN1B-RB1-E2F1 pathway protects mouse spermatogonial stem cells from genomic damage. *J. Reprod. Dev.* 61, 305-316 (2015) 査読有
doi: 10.1262/jrd.2015-027.

Morimoto H., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. ROS-generating oxidase Nox3 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 92(6): 147 (2015) 査読有
doi: 10.1095/biolreprod.114.127647.

〔学会発表〕(計6件)

平成 29 年 8 月 19 日
第 7 回細胞再生医療研究会
篠原美都「精子幹細胞の寿命制御とアンチエイジング機構」
甲南大学フロンティアサイエンス学部 甲南大学ポートアイランドキャンパス

平成 29 年 6 月 28 日
新学術領域「幹細胞老化と疾患」第 4 回領域会議
篠原美都「精子幹細胞の老化において精巢支持環境が果たす役割の解明」
先端医療振興財団・臨床研究情報センター

平成 29 年 3 月 17-18 日
生命動態システム科学四拠点 合同シンポジウム
篠原美都「精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態解明」
理化学研究所 生命システム研究センター

平成 28 年 6 月 28-29 日
新学術領域「幹細胞老化と疾患」第三回領域会議
篠原美都「長期培養系を用いた精子幹細胞の老化メカニズムの解明」
東京大学 伊藤国際学術研究センター

平成 28 年 2 月 17 日
文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」による国際シンポジウム
Mito Kanatsu-Shinohara, Hiroko Morimoto, and Takashi Shinohara
“Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by a stem cell dye CDy1”
京都大学 百周年記念ホール

平成 27 年 6 月 19-20 日

新学術領域「幹細胞老化と疾患」第二回領域会議
篠原美都「長期培養系を用いた精子幹細胞の老化メカニズムの解明」
新潟グランドホテル

〔図書〕(計2件)

田中敬・篠原美都・篠原隆司 羊土社 実験医学 特集 「再発見! MYC の多機能性-グローバル転写因子として見直される古典的がん遺伝子」 2018 年 vol.36. No.4 p522-527
ISBN: 978-4-7581-2505-5

篠原美都・本田直樹・篠原隆司 羊土社 実験医学 特集 「臓器老化の本質に迫るステムセルエイジング: 幹細胞の変遷と加齢関連疾患のメカニズム」 2017 年 vol.35. No.8 p1297-1302
ISBN: 978-4-7581-0163-9

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

研究室ホームページ
http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~mogen/research_summary.html

京都大学広報
一つの幹細胞からできる精子の数は周期的に変動することを発見
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/160809_1.html

科学技術振興機構(JST)ホームページ
一つの幹細胞からできる精子の数は周期的に変動することを発見
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160809/index.html>

アウトリーチ活動
平成 28 年 9 月 18 日
「幹細胞が精子を作る活性には周期がある」
「京都大学アカデミックデイ 2016 -みんなで対話する京都大学の日-」
京都大学百周年時計台記念館

受賞
平成 30 年 5 月 27 日
第 23 回日本女性科学者の会奨励賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 美都 (SHINOHARA, Mito)

京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：10372591

- (2)研究分担者 該当なし
- (3)連携研究者 該当なし
- (4)研究協力者 該当なし