

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02935

研究課題名(和文) ヒト精子幹細胞の長期培養系の確立

研究課題名(英文) Long-term culture of human spermatogonial 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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞は持続的に自己複製分裂し精細管内に移植すると精子を産生できる。本研究では新しい不妊症治療の開発を目指し、ヒト精子幹細胞の操作技術を検討した。ヒト精原細胞の表面抗原を検索しCXCR4の発現を見出した。また小分子化合物ライブラリーを用いて精原細胞の分裂を促す化合物の検索や、精子幹細胞の自己複製因子GDNFのファミリー分子であるARTN、NRTN、PSPNなどや、FGFのファミリー分子、精原細胞の生存に関わるとされるBMPファミリー分子などの検索を行った。これらの結果をもとに、GFRA3のリガンドARTNなどを加え培養したところ試験管内で2ヶ月以上持続するコロニー形成が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児悪性腫瘍患者の生存率は近年向上したが、放射線治療や薬物療法の副作用として不妊になるケースが多い。精子凍結ができない小児患者の妊孕性を担保する方法として、あらかじめ精子幹細胞を凍結保存し治療後に精細管内へ移植する試みが海外にて進められている。しかし小児精巣から採取できる精子幹細胞は極めて少なく、試験管内にて増幅する技術が必要とされている。また培養を行うことで悪性腫瘍細胞の混入を防ぐことができるといった利点もある。本研究の成果はヒト精子幹細胞の試験管内増幅技術の確立のために不可欠であるヒト精子幹細胞のマーカー分子や増殖を促す因子を同定した点で、学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Spermatogonial stem cells (SSCs) continuously proliferate by self-renewal division and produce sperm after injection into the seminiferous tubules of testes. This study aimed at the development of new infertility treatment, and tried to develop a method to manipulate human SSCs. CXCR4 was identified as a marker of human SSCs, through screening of cell surface antigens. Factors which promote proliferation of spermatogonia were examined by screening of small molecule chemical libraries and ARTN, NRTN, PSPN, the family molecules of GDNF, the self-renewal factor of SSCs, as well as FGF family molecules, and BMP family molecules, which are considered to be involved in survival of spermatogonia. Using culture conditions modified from the conventional culture condition of mouse SSCs by adding ARTN, a ligand for GFRA3, human testes cells produced colonies in vitro, which were maintained for > 2 months period.

研究分野：生殖医学

キーワード：精子 幹細胞 生殖 不妊症

1. 研究開始当初の背景

近年がん治療が発展したことにより小児悪性腫瘍患者の8-9割が生存できるようになった。しかし放射線治療や薬物療法の副作用として不妊になるケースが多い。成人患者の場合は精子凍結により妊孕性を担保できるが、精子形成が始まっていない小児患者には適用できない。そのようなケースに対し、治療前に精子形成の源である精子幹細胞を凍結保存し、治療後に精細管内へ移植すれば不妊を回復させる試みが海外にて進められていた。精子幹細胞は精巣内に極めて低い頻度で存在する細胞であるが(マウスの場合0.02-0.03%)、持続的に自己複製分裂することでほぼ一生に渡って精子を産生する。小児悪性腫瘍患者から採取できる精巣サンプルは少量であるため、特に試験管内で精子幹細胞を増幅する技術の確立が期待されていた。また、培養を行うことによりサンプル回収時に混入している可能性のある悪性腫瘍細胞を除去できるという利点も期待できた。

また、近年のヒト初期胚や生殖細胞での遺伝子編集研究の進展に伴い、ヒト精子幹細胞研究への関心が高まっていた。その理由として、Crispr-Cas9技術の開発で多くの動物種で遺伝子編集が可能となったが、ヒト初期胚を用いることは倫理的問題が大きいこと、さらに初期胚にCrispr-Cas9技術を用いると遺伝子改変がモザイク状態になることが挙げられる。精子幹細胞は生後の精巣から採取できるため倫理的ハードルが低く、モザイク胚の問題を回避できると期待されていた。

研究代表者らは2003年にマウス精子幹細胞の長期培養系を確立し、この細胞をGermline Stem(GS)細胞と命名した。その後、ラットやハムスターなどのげっ歯類でGS細胞の樹立に成功した。そこで、培養技術を含めヒト精子幹細胞の操作技術の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

ヒト精子幹細胞の操作技術を確立するためには、様々な課題がある。まず、精子幹細胞はヒト精巣細胞の中で0.01%以下と極めて頻度が低く、培養系を確立するためには濃縮することが必須である。しかし濃縮に有効なマーカー分子がヒト精子幹細胞では報告されていない。

また、得られた細胞が精子幹細胞であることを機能的に判定する方法が欠如している。マウスでは精細管内に移植し、精子形成を伴うコロニー形成能をもって精子幹細胞であることを判定できる。しかしこの方法を用いる場合、ホストマウスは予めアルキル化剤を投与し内因性精子形成を除去することが必要となり、ヒトにおいて同様の処置を行うことは不可能である。また免疫学的にもアロ移植であるため拒絶される可能性が高い。一方、精子幹細胞は異種移植が可能であり、ヌードマウスのホストに対し比較的類縁であるラットやハムスターなどのげっ歯類は移植により精子の分化を伴うコロニー形成をする。ウサギなどの非げっ歯類では精子への分化は見られないが生着は観察される。ヒト精子幹細胞をヌードマウス精巣へ移植した場合、精子への分化は期待できないがコロニー形成をもって精子幹細胞の活性を判定することは可能である。しかしその場合必要となるのがヒト精子幹細胞へのドナーマーカーの導入である。ヒト精子幹細胞への遺伝子導入法の確立も重要な課題である。

移植による精子幹細胞の判定は機能的であり重要であるが、スクリーニングには適さない。移植以外の方法としてマウスでは精子幹細胞の*in vitro*アッセイ系も確立されている。この方法はセルトリ細胞を播種して作成したフィーダーの上に精子幹細胞を播種するとフィーダー細胞の下へ潜り込み、数石上のコロニーを形成するものであり、その頻度が移植によって判定される幹細胞活性と相関することに基づいたものである。移植アッセイに比較して精度が低い、確立できればヒトの精子幹細胞のマーカー分子の検索や培養条件の検討においてスクリーニングの手段として、有用性が期待できる。マウス精子幹細胞はGDNFおよびFGF2を含有する培地にて長期間試験管内で増幅することができるが非げっ歯類の精子幹細胞では難しく、精子幹細胞の自己複製分裂に必要な未知の因子を同定することが必要である。

本研究では、最終的にヒトGS細胞培養系の確立することを目的として、上記のような課題を克服することを目指した。

3. 研究の方法

本研究ではヒト精子幹細胞マーカーのスクリーニング、ヒト精子幹細胞への遺伝子導入法の開発、ヒト精子幹細胞の*in vitro*アッセイ系の開発、さらにヒト精子幹細胞の増殖を促す因子の検索を行なった。

4. 研究成果

(1) ヒト精子幹細胞マーカーの検索

ヒト精子幹細胞の表面抗原マーカーのスクリーニングを行なった。通常細胞の遊離に用いられ

ているトリプシンは多くの表面抗原を破壊するため、酵素処理を用いない方法（cell dissociation buffer など）や dispase など他の酵素を用いる条件を検討した。その結果、Cell dissociation buffer のみで細胞を遊離することは難しく、Collagenase 処理と組み合わせた方法が有効であることが分かった。そこでヒト精巣の組織片の凍結サンプルを解凍し、細胞を遊離し、げっ歯類や霊長類の精子幹細胞で発現していることが知られている候補抗原（GFRA1, Integrin, EPCAM, CDCR4, SSEA-4, FGFR3, CD9 など）を中心にフローサイトメトリーにてスクリーニングを行ったが、精原細胞で発現することを明確に示す結果は得られなかった。

一方、ヒト精巣の組織片の免疫組織染色にて精原細胞に発現するマーカーをスクリーニングしたところ、抗 CXCR4 抗体にて精原細胞の一部が染色されることが分かった。

（2）ヒト精子幹細胞の in vitro アッセイ系の開発

マウスの精子幹細胞はセルトリ細胞上へ精子幹細胞を播種するとセルトリ細胞の下へと潜り込み敷石状コロニーを形成する。この活性を利用して精子幹細胞の in vitro アッセイが可能である。そこでマウスセルトリ細胞をあらかじめ播種して作成したフィーダー細胞や、骨髄細胞の培養に用いられる様々なストローマ細胞株の上にヒト精巣細胞を遊離して播種し、敷石状コロニーを形成するか否かを調べた。その結果、いくつかのストローマ細胞株にて敷石上コロニーの形成が認められた他、ヒト精巣細胞のみを gelatin もしくは laminin にてコーティングしたプレートに播種した場合でも、頻度は低いが精巣由来の間葉系細胞の増殖により形成される細胞のシートの下に敷石上コロニーが一過性に形成された。

（3）ヒト GS 細胞培養系の開発

ヒト精巣組織を酵素処理にて細胞を遊離し、試験管内培養を行なった。げっ歯類の GS 細胞は胎児線維芽細胞の上で培養されるほか、ラミニンへの接着性が高いためフィーダーフリーでの長期培養も可能である。GDNF と FGF2 の二つのサイトカインを含有する 1%程度の低血清培地にて長期培養できるほか、増殖効率は低下するが Knockout serum replacement を用いた無血清培地でも長期培養が可能である。ヒト精子幹細胞をヌードマウス精巣に移植すると数ヶ月にわたり生存するため、増殖条件がげっ歯類と近い可能性が高いと考え、GDNF, FGF2 含有培地をベースに候補因子を添加して増殖を促進する培養条件を検討した。

Selleck chemical (476 個)、calbiochem (65 個)、Prestwick 社(1120 個)由来の小分子化合物ライブラリーなどを用いて精原細胞の分裂を促す化合物を検索し培地の改変を行った。また、GDNF ファミリー分子である ARTN, NRTN, PSPN などや、FGF ファミリー分子、精原細胞の生存に関わるとされる Bone morphogenetic protein (BMP) ファミリー分子などのサイトカインのスクリーニングを行った。その結果をもとに、GFRA3 のリガンドである ARTN を加えた培地にて培養したところ、試験管内で GS 細胞のコロニーと類似したコロニー形成が認められた。げっ歯類 GS 細胞と比較し増殖が遅いため更なる培養条件の改善が必要であるが、2ヶ月以上培養を継続することが可能となった。

培養細胞について精子幹細胞の機能的活性の有無を調べるためには、ヌードマウスの精巣へ移植する必要がある。そこで遺伝子導入によるマーキングを試みた。げっ歯類ではレンチウイルスにより効率よく遺伝子導入が行えるが、同じ方法をヒト培養細胞に試したところ外来遺伝子の発現は得られなかった。この点については、今後新規の遺伝子導入法を開発することが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mori Y, Ogonuki N, Hasegawa A, Kanatsu-Shinohara M., Ogura A, Wang Y, McCarrey JR, Shinohara T.	4. 巻 104(3)
2. 論文標題 OGG1 protects mouse spermatogonial stem cells from reactive oxygen species in culture.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Reprod.	6. 最初と最後の頁 706-716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa216.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Morimoto H, Yamamoto T, Miyazaki T, Ogonuki N, Ogura A, Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M., Yabe-Nishimura C, Zhang H, Pommier Y, Trumpp A, Shinohara T.	4. 巻 35(3-4)
2. 論文標題 An interplay of NOX1-derived ROS and oxygen determines the spermatogonial stem cell self-renewal efficiency under hypoxia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Dev.	6. 最初と最後の頁 250-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.339903.120.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Matoba S., Ogura A., Shinohara T.	4. 巻 117(14)
2. 論文標題 Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 7837-7844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1914963117.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M, Chen G, Morimoto H, Shinohara T.	4. 巻 66(4)
2. 論文標題 CD2 is a surface marker for mouse and rat spermatogonial stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 341-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara T, Kanatsu-Shinohara M.	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Transgenesis and genome editing of mouse spermatogonial stem cells by lentivirus pseudotyped with Sendai virus F protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 447-461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.02.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto H., Kanatsu-Shinohara M., Orwig K.E., Shinohara T.	4. 巻 102(1)
2. 論文標題 Expression and functional analyses of ephrin type-A receptor 2 in mouse spermatogonial stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Reprod.	6. 最初と最後の頁 220-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz156.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M., Yamamoto T., Toh H., Kazuki Y., Imoto J., Ikeo K., Oshima M., Shirahige K., Iwama A., Nabeshima Y., Sasaki H., Shinohara T.	4. 巻 116(33)
2. 論文標題 Aging of spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 16404-16409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904980116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe S., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara T.	4. 巻 100(2)
2. 論文標題 Sendai virus-mediated transduction of mammalian spermatogonial stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Reprod.	6. 最初と最後の頁 523-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iory192.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Watanabe S., Shinohara T.	4. 巻 64(6)
2. 論文標題 Reversible inhibition of the blood-testis barrier protein improves stem cell homing in mouse testes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Reprod. Dev.	6. 最初と最後の頁 511-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-093.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 篠原美都・林悠
2. 発表標題 睡眠構築の変化が精子形成に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 AMED - CREST機能低下 領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原美都・篠原隆司
2. 発表標題 精子幹細胞の老化機構の解明
3. 学会等名 京都大学・医薬系研究交流サロン メディカルイノベーション卓越大学院プログラム キックオフ企画
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原美都
2. 発表標題 精子幹細胞の自己複製と維持のメカニズムの解明
3. 学会等名 第23回日本女性科学者の会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原美都
2. 発表標題 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
3. 学会等名 新学術領域「幹細胞老化と疾患」第5回領域会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原美都
2. 発表標題 長期培養における精子幹細胞の老化
3. 学会等名 第1回AMED-CREST機能低下・睡眠グループ分科会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原美都
2. 発表標題 精子を作る幹細胞とその操作技術
3. 学会等名 日本女性科学者の会 60周年記念シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------