

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18592

研究課題名(和文)1細胞RNA-sequenceを用いた停留精巣精子幹細胞ニッチの遺伝子発現解析

研究課題名(英文)Gene expression analysis of spermatogonial stem cell niche in undescended testis by single cell RNA-sequence

研究代表者

守時 良演 (Moritoki, Yoshinobu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：50595395

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): [停留精巣モデルマウスの開発]これまでのラットの手法を踏襲して妊娠マウスにフルタミドを投与しても、停留精巣は作成困難であった。そこで外科的な手法を用いて、思春期前に相当する生後3週のマウスで停留精巣作成を行った。体格の小さなマウスで皮膚小切開を行い、鼠径管を直視下に結紮し埋没縫合を行うことで安定的なモデルマウスの作成に至った。[微量なmRNAの増幅]1細胞に相当する10pg当量のGC-1細胞(typeB spermatogonia) mRNAからのcDNA増幅を行い、増幅効率をqPCRで検証した。SC3-seqでは、40コピー/細胞相当のmRNAまで、約80%の再現性で増幅可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、不妊症のカップルが全体の10-15%と増加しており、そのうち約50%に男性側の要因が関与している。男性不妊症の70-75%は、染色体や内分泌学的・解剖学的に異常がない原因不明の特発性であり、メカニズムの全体像は明らかになっていない。生殖補助医療(ART)の発展に伴い、精子が存在しさえすれば、その運動能や受精能の障壁は乗り越えることができる。しかし精子形成の前段階である精子幹細胞の生存・分化障害を克服する術は、現時点では存在しない。これらの克服には、幹細胞の生存や正常な減数分裂のメカニズムを解明する必要がある。そのため本研究ではまず、幹細胞の維持や精子までの分化に必要な分子を同定する。

研究成果の概要(英文): [Development of a mouse model for undescended testes] Even when flutamide was administered to pregnant mice following the conventional rat technique, it was difficult to create undescended testes. Therefore, we performed surgery to create undescended testes in 3-week-old mice, which correspond to prepubertal age. A small skin incision was performed, and the inguinal canal was ligated and sutured under direct vision to robustly create a mouse model for undescended testes. [Amplification of small amounts of mRNA] cDNA was synthesized and amplified from 10 pg mRNA of GC-1 cells (type B spermatogonia), equivalent to a single cell, by two methods (SC3-seq vs. Quartz-seq). Amplification efficiency was compared by qPCR. SC3-seq achieved 80% of reproducibility.

研究分野：男性不妊症

キーワード：精子幹細胞 男性不妊症

1. 研究開始当初の背景

近年、不妊症に悩むカップルが全体の 10-15%と増加しており、そのうち約 50%に男性側の要因が関与している。男性不妊症の 70-75%は、染色体や内分泌学的・解剖学的に異常がない原因不明の特発性であり、メカニズムは全く明らかになっていない。

生殖補助医療(ART)の発展に伴い、精子が存在しさえすれば、その運動能や受精能の障壁は乗り越えることができる。しかし精子形成の前段階である精子幹細胞の生存・分化障害を克服する術は、現時点では存在しない。これらを克服するには、幹細胞の生存や正常な減数分裂のメカニズムなどを解明する必要がある。そのため本研究ではまず、幹細胞の維持や精子までの分化に必要な分子を同定する。究極的には男性不妊症研究の治療に貢献できると考える。

精子幹細胞は、自己複製と分化を繰り返すことで、精子の生涯に渡る供給源として機能する組織幹細胞である。停留精巣では、早期(~2歳)に精巣固定術を施行したとしても、手術時に精子幹細胞数が低下している症例では、妊孕性も低下することが示されている。現時点ではそれらに対する術後の追加治療は存在せず、幹細胞の維持メカニズムの解明が求められる。

精子幹細胞数を維持・増殖させる因子として、げっ歯類では GDNF、FGF2、CSF-1 が知られ、それらは全て周囲の体細胞から傍分泌される。そのため、精子幹細胞の維持・増殖機構を解明するには、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞を含めた精子幹細胞ニッチを詳細に捉える必要がある。現在マウスを中心に、幹細胞ニッチの解析として live cell imaging、器官培養法などの報告がある。しかし、これらはいずれもあくまでニッチ内の精子幹細胞の動態に着目した研究であり、周囲の体細胞に着目した詳細な研究はほとんどされていない。

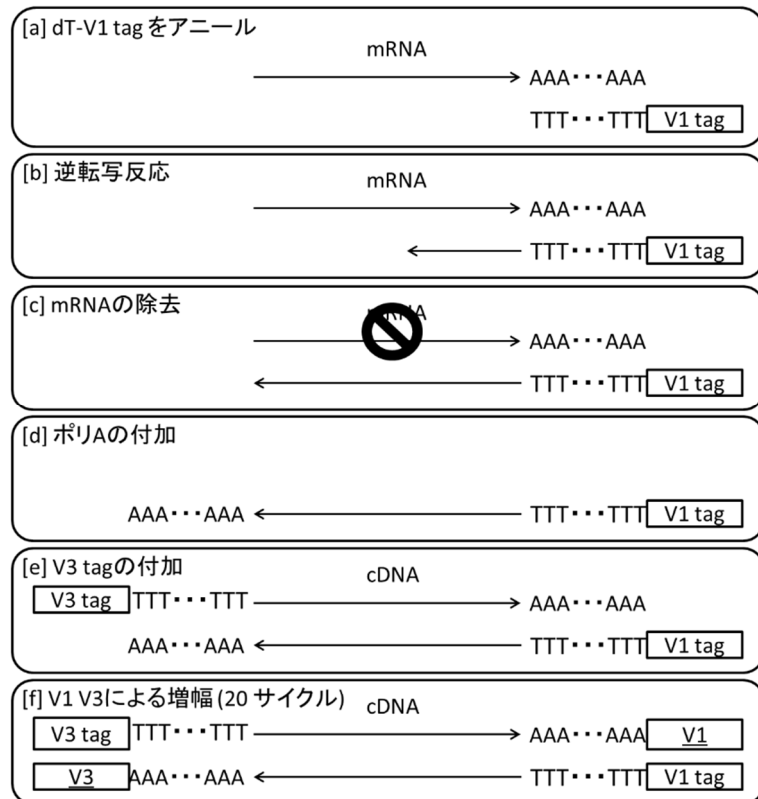
2. 研究の目的

本研究の目的は、造精機能障害のモデルとして停留精巣を用いて男性不妊症の原因を解明することである。停留精巣に着目した理由は、精細管内が比較的同等に障害されており、モデル動物の作成が可能で、かつヒトでの疾患頻度が高いためである。

研究の障壁となるのは、1) 精子幹細胞数が精巣構成細胞中の 0.2~0.3%と非常に少ないため、回収が困難であること 2) 同一の精細管でも、隣接する精子幹細胞ニッチごとで精子分化の段階が異なり、非常に多様性の高い組織であること 3) 幹細胞ニッチを構成する細胞の種類が多岐に渡ること、などが挙げられる。1細胞の RNA-sequence は、組織内での少数細胞の解析に適しており、かつ多種類の細胞を同時に解析できるため、上記 1)-3)を克服できる利点がある。私たちは臨床の観点から生物学を捉える独自性を活かし、最終的にヒト停留精巣での解析を行うことを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、まずマウス ES 細胞を用いて、3' -RNA 増幅を行う。方法の概要は、ES 細胞をトリプシン処理によりシングルセルに分離、次いで 1 細胞から RNA を抽出する。次に右図のように、V1 タグを付けた dT プライマーを用いて、逆転写反応を行う [a][b]。ついで mRNA の除去を行う [c] とともに cDNA の 3' 側にポリ A を付加する [d]。最後に PCR による増幅を行うが、PCR の



際の 1 サイクル目では、3' 側に V3 タグを付けた dT プライマーを用いて増幅し [e]、2 サイクル目移行に dTV1 プライマーを加えて PCR をかける [f] ことで、両側に V1, V3 が付いた PCR プロダクトのみを増やすことができる。この方法では、これまでの 1 細胞からの RNA 増幅とは異なり、逆転写の時間を短くしている。さらに PCR 増幅用プライマーと競合する逆転写用プライマーを、[c] の過程で加えるエキソヌクレアーゼを用いて除去することで PCR 効率を上げている。また 2 種類のタグ (V1/V3) を利用することで、転写産物の strand 情報を維持したまま cDNA 増幅を可能にしている。できた cDNA サンプルを粗二ヶーション後にサイズセレクションを行い、RNA シーケンスを行う。これにより、1 細胞あたり 20 コピーレベルの低発現量の mRNA まで、再現性良く検出できる。注意点すべき点としては、逆転写時間を短くしているため、逆転写産物の評価の qPCR の際に、プライマーの設計できる範囲が限られてしまうことである。逆転写および増幅のポジティブコントロール、及びコピー数の算出には、ERCC-RNA spike を用いる。

次いで、ES 細胞から抽出・増幅した cDNA を用いて、RNA-sequence を行う。

最後に、マウス精巢の各種細胞を、1 細胞ずつ単離し、RNA 抽出・増幅と RNA-sequence を行う。当教室ではマウス精巢の単一細胞化は行ったことがないため、コラゲナーゼ、ディスパーゼ等の酵素処理について、これまでのラットの的方法にもとづいて条件検討を行う。その際に細胞ごとに viability が異なることが予測されるため、全ての細胞の生存ができる条件を特定する必要がある。また細胞を回収する時点では、細胞種の同定は困難である。次いで上記 1. の方法を用いて 1 細胞ごとに cDNA を合成・増幅し RNA-シーケンスを行う。qPCR で、増幅のバリデーションを行い、cDNA の質の担保が取れ次第、既報の精子幹細胞の細胞表面マーカー (cKIT, THY1, GFR 1)、セルトリ細胞マーカー (SOX9)、ライディッ

ヒ細胞マーカー(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase)の発現量を元に、RNA シーケンスの結果から、各細胞腫の推定を行う。この段階で、これまで確たるマーカーが報告されていない、筋様細胞のマーカーの同定ができればと考えている。

4 . 研究成果

[停留精巣モデルマウスの開発]これまでのラットの手法を踏襲して妊娠マウスにフルタミドを投与しても、停留精巣は作成困難であった。そこで外科的な手法を用いて、思春期前に相当する生後 3 週のマウスで停留精巣作成を行った。体格の小さなマウスで皮膚小切開を行い、鼠径管を直視下に結紮し埋没縫合を行うことで安定的なモデルマウスの作成に至った。[微量な mRNA の増幅]1 細胞に相当する 10pg 当量の GC-1 細胞 (typeB spermatogonia) mRNA からの cDNA 増幅合成を、2 つの方法 (SC3-seq vs Quartz-seq) で行い、増幅効率を qPCR で比較した。SC3-seq では、40 コピー / 細胞相当の mRNA まで、約 80% の再現性で増幅可能であった。[マウス精巣細胞の dissociation]精巣細胞を物理的、化学的方法で dissociation したが、再現性が得られず、現在化学的方法での dissociation を条件検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Ando Ryosuke, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Disorganization of claudin-11 and Dysfunction of the Blood-Testis Barrier During Puberty in a Cryptorchid Rat Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1398-1408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.12788.	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 Chaya Ryosuke, Okamura Takehiko, Yanase Takahiro, Nagai Takashi, Moritoki Yoshinobu, Kobayashi Daichi, Akita Hidetoshi, Yasui Takahiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Initial treatment outcome and feasibility of low-dose cabazitaxel against docetaxel- and castration-resistant prostate cancer in a Japanese hospital	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Rural Med	6. 最初と最後の頁 25-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2185/jrm.2019-004	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 Yanase Takahiro, Moritoki Yoshinobu, Kondo Hajime, Ueyama Daigo, Akita Hidetoshi, Yasui Takahiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Myocarditis and myasthenia gravis by combined nivolumab and ipilimumab immunotherapy for renal cell carcinoma: A case report of successful management	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Urology Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.eucr.2020.101508	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 守時 良演、秋田 英俊、柳瀬 貴弘、杉野 輝明、金本 一洋、安井 孝周
2. 発表標題 2mm 針型鉗子を使用したReduced Port Surgeryによる尿管摘除術の初期経験
3. 学会等名 第34回日本泌尿器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守時 良演、柳瀬 貴弘、杉野 輝明、小林大地、岡村 武彦、秋田 英俊、安井 孝周
2. 発表標題 尿管皮膚瘻造設術後の尿管カテーテル選択の検討～シリコンカテーテルとポリウレタンカテーテルの比較～
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020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