

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791127

研究課題名（和文）ヒト精子幹細胞の同定及び機能解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of human spermatogonial stem cells

研究代表者

小林 秀行 (KOBAYASHI HIDEYUKI)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：10408875

研究成果の概要（和文）：

マウス精子幹細胞の分離でThy-1 (CD90)が用いられている。この手法を真似て、ヒト精巣組織より、ヒト精子幹細胞が分離できないかどうか、検討を行った。精巣細胞混濁液を抗Thy-1抗体磁気ビーズと混ぜて、Thy-1陽性細胞の分離を行った。各種の実験を行ないThy-1陽性細胞群にヒト精子幹細胞が含まれている可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Isolated cells from testicular tissues were maintained in serum-free medium, selected growth factors, and STO feeder layer for 1 week. We found that magnetic-activated cell sorting (MACS) was an efficient method to obtain Thy-1⁺ cells from testis cell suspensions. Enriched Thy-1⁺ cells were present among unretained cells. Thy-1⁺ cells were expressed human embryonic stem cell genes. Sixteen weeks after transplanting the Thy-1⁺ cells into nude mice, there was no evidence of teratoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：アンドロロジー

キーワード：再生医学、細胞・組織、幹細胞、男性不妊、精子

1. 研究開始当初の背景

精巣における精子幹細胞 Spermatogonial stem cells (SSCs) の自己複製または精子への分化は、正常な造精機能を維持するために

緻密に調節されている。しかし、その機構は、不明な点が多く、全容は明らかではない。哺乳類における造精機能は精細管で行われ、マウスにおける Spermatogonial stem cells

(SSCs)に関しては、国内外を通じて研究が進められている。特に、ドナーマウスの Spermatogonial stem cells (SSCs)を、レシピエントとして、busulfan を投与して作成した不妊マウスの精細管に移植することによって、造精機能が回復したという報告は画期的であり、以後の精子幹細胞の研究を大きく飛躍させる結果となった。(Brinster RL et al Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:11298-11302, 11303-11307) この Male germ cell transplantation という方法は、マウスだけでなく、ウシ、ヒツジ、ブタなどの大型の家畜でも同様に成功しており、さまざまな種の精子幹細胞を自在に操る強力なツールである。また、絶滅危機品種における種の保存に応用できる方法である。マウス Spermatogonial stem cells (SSCs)に関しては、すでに研究が進んでおり、マウス Spermatogonial stem cells (SSCs)を分離するために、これまでにさまざまな細胞表面発現マーカーが発見されている。その中でも、hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells や、ES cell の表面に発現している glycosyl phosphatidylinositol-anchored surface antigen である CD90(Thy-1)は、マウス Spermatogonial stem cells (SSCs)において、key molecule であることがすでに報告されている。(Kubota H et al Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:6487-6492) また、マウス Spermatogonial stem cells (SSCs)を長期間培養させることができる serum-free 培養液に関するもすでに開発されている。(Kubota H et al Biol Reprod 2004;71:722-731) 我々も CD90(Thy-1)を用いたマウス Spermatogonial stem cells (SSCs)の分離及び培養に関してはすでに成功している。(未発表データ)しかしながら、ヒト Spermatogonial stem cells (SSCs)に関しては、殆ど研究が行われておらず、不明な点が多い。我々は、これまで、原因不明の男性不妊症の症例を多数経験してきた。将来的に男性不妊症の原因解明および新たな治療方法を獲得する目的にて、ヒト Spermatogonial stem cells (SSCs)の解析に着目した。

2. 研究の目的

現在、不妊治療として卵細胞質内精子注入法 (ICSI)が盛んに行なわれており、乏精子症の他、無力精子症や奇形精子症の治療を可能にしている。ICSI は、数個の生存精子があれば妊娠の可能性を生み出す画期的な治療である反面、男性不妊症として、全く成熟精子がみられない無精子症の症例が浮き彫りとなってきている。無精子症例から成熟精子を効率よく採取する方法として、現在、精巣から

顕微鏡を用いて選択的に精細管を採取する顕微鏡下精巣内精子採取法 (MD-TESE)が行われている。しかし、その結果は、良好ではなく、成熟精子を採取することは容易ではない。当施設での MD-TESE を行って、成熟精子を採取できる割合は、約 30%である。(未発表データ)ゆえに、MD-TESE は、無精子症の治療としては限界であり、これまでとは異なった斬新な治療方法の開発が求められている。本研究におけるヒト Spermatogonial stem cells (SSCs)の研究は、男性不妊症のメカニズムの解明に貢献するだけでなく、成熟精子に分化可能となれば、これまでの方法とは全く異なった、きわめて新しい治療につながると考えている。申請者は、リプロダクションセンターという男性不妊症専門外来を有する点と、ヒト Spermatogonial stem cells (SSCs)の研究を行うことができる実験系を有する点で、他では類を見ない極めて優位な立場であること自負している。

3. 研究の方法

(1) ヒト精巣組織の採取および取り扱い

東邦大学医療センター大森病院リプロダクションセンターを受診する患者を対象とする。その中でも精巣生検が必要な患者に限定し、口頭および書面を用いて、採取した精巣組織の一部を研究に用いる旨の説明を行なう。同意を得た患者からの精巣組織を研究に用いる。採取した精巣組織は、HEPES 溶液または、1XHBSS 溶液に浸し、迅速に実験に用いるか、液体窒素にて凍結保存する。

(2) ヒト精巣組織からの Thy-1 陽性細胞の分離

マウス Spermatogonial stem cells (SSCs)を分離する方法と同様に、Magnet Activated Cell Sorting (MACS) を用いる。(Kubota H et al Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:6487-6492) あらかじめコラゲナーゼ処理及び DNase 処理したヒト精巣組織溶液を 30% percoll を用いて分離させた後、抗 Thy-1 抗体が結合した磁気マイクロビーズ (30-H12;Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) を用いて、Thy-1 陽性細胞を分離する。Thy-1 陽性細胞を分離するプロトコールに関しては、マニュアルに多少の変更を加えて行う。また、磁気マイクロビーズに結合できなかった細胞群に関するも、Thy-1 陽性細胞が含まれていないかどうか検討する。

(3) Thy-1 陽性細胞の培養

マウス Spermatogonial stem cells (SSCs)の培養方法と同様に、フィーダー細胞としてはマイトマイシンCにて不活性化した ST0 (SIM mouse embryo-derived thioguanine

and ouabain resistant)細胞を用いる。Thy-1陽性細胞を分離する実験の2日前に12well plateの中央の4wellに 2×10^5 /wellになるように細胞を調整しておく。培養液は、7%FBS・DMEMを用いる。

プロトコールに従って分離したThy-1陽性細胞を、あらかじめマイトマイシンCにて不活性化したSTO細胞が敷いてあるplateに入れる。Thy-1陽性細胞の培養液に関しては、まずは、マウスと同様の組成であるserum-free培養液を用いる。(Kubota H et al Biol Reprod 2004;71:722-731) さらに、成長因子として、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), basic fibroblast growth factor (bFGF)及び、soluble GDNF receptor family alpha 1 (GFRalpha1)を加える。しかし、培養液に関しては、マウスと同様な組成では、ヒトSpermatogonial stem cells (SSCs)を増殖させるには、不十分であることが予想される。なぜなら、ラットSpermatogonial stem cells (SSCs)の培養液に関して、これまでのマウスにおける培養液ではラットSpermatogonial stem cells (SSCs)が増殖しなかったと報告されている。(F. Kent Hamra et al Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:17430-17435) ヒトとマウスでは、進化の上で相当の隔たりがあり、ヒトSpermatogonial stem cells (SSCs)を増殖させることができる培養液の開発に関しては、完成までに長期間を有することが予想される。

(4)Thy-1陽性細胞群にヒトSpermatogonial stem cells (SSCs)が含まれていることの証明

ヒト精巣組織から分離してきた細胞がThy-1陽性細胞であるかどうか確認するために、いくつかの手法を組み合わせる解析を行う。第一にRT-PCR法によって、*thy-1*遺伝子の発現を確認する。第二にウエスタンブロッティング法にてThy-1蛋白質の発現に関して確認を行う。第三に免疫染色法にて、Thy-1の発現および局在を共焦点レーザー顕微鏡にて解析する。以上の実験手法を組み合わせることにより、分離してきた細胞がThy-1陽性細胞であることが強く示唆されると思われる。また、Thy-1陽性細胞群にヒトSpermatogonial stem cells (SSCs)が含まれていることを証明するために、マウスSpermatogonial stem cells (SSCs)の細胞表面に発現している多能性分化を示すマーカーを検索する。マウスSpermatogonial stem cells (SSCs)では、Alkaline phosphataseやOct3/4が発現していることがすでに報告されている。(Kubota H et al Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:6487-6492) しかし、マウスのように、in vivoの解析方法として、

Male germ cell transplantation法にて、分離してきた細胞を不妊患者の精細管に移植する方法は倫理的に行うことはできない。そのため、ヒトにおけるThy-1陽性細胞群に、確かに、ヒトSpermatogonial stem cells (SSCs)が含まれていることの証明は困難であるが、多能性分化マーカーを検索することにより、推測はできると思われる。さらに、ヌードマウスやSCIDマウスのような免疫不全マウスの皮下にThy-1陽性細胞を注射し、in vivoでの動態を検討する。マウスSpermatogonial stem cells (SSCs)の場合は、腫瘍などは形成されないと報告されている。(Kubota H et al Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:6487-6492) このように、in vitro及びin vivoでの実験を組み合わせ、Thy-1陽性細胞群にヒトSpermatogonial stem cells (SSCs)が含まれていることを証明する。

4. 研究成果

精巣組織内に含まれるThy-1陽性細胞群に精子幹細胞が含まれている可能性を示唆した。しかし、培養方法もまだ確立されておらず、継続的な研究が必要である。最近、ヒト精巣組織より培養条件を変えることにより、多能性幹細胞が誘導できたとの報告がある。今後は、多能性幹細胞の研究も行なっていく次第である。

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1件)

Kobayashi H, Nagao K, Nakajima K, Miura K, Ishii N

Thy-1+ cells isolated from adult human testicular tissues express human embryonic stem cell genes *OCT3/4* and *NANO G* and may include spermatogonial stem cells

Reproductive Medicine and Biology

査読有 Volume 8 2009 71-77

[学会発表] (計6件)

小林 秀行

The characterization and function of male germline stem cells

obtained from human testicular tissue

64th Annual meeting of the American Society for Reproductive Medicine 2008年11

月11日 サンフランシスコ (アメリカ)

2 小林 秀行

The isolation, characterization, and function of male germline stem cells obtained from human testicular tissue

67th Annual meeting of the Japanese Cancer Association 2008年10月29日 名古屋

3 小林 秀行

ヒト精巣組織からのヒト精子幹細胞 human spermatogonial stem cells(SSCs)の分離の試み及び機能解析

第53回日本生殖医学会総会 2008年10月23日 神戸

4 小林 秀行

ヒト精巣組織からのヒト精子幹細胞 human spermatogonial stem cells(SSCs)の分離の試み

第27回日本アンドロロジー学会総会 2008年7月4日 京都

5 小林 秀行

The isolation, characterization, and function of male germline stem cells obtained from human testicular tissue

103th Annual meeting, of the American Urological Association
2008年5月21日 オーランド (アメリカ)

6 小林 秀行

ヒト精巣組織からのヒト精子幹細胞 human spermatogonial stem cells(SSCs)の分離及び培養の試み

第96回日本泌尿器科学会総会 2008年4月27日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 秀行 (KOBAYASHI HIDEYUKI)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：10408875

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし