

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06462

研究課題名（和文）トランスジェニックヌードマウスを利用した精原幹細胞異種移植法の開発

研究課題名（英文）Development of spermatogonial stem cell xenotransplantation method using transgenic nude mice

研究代表者

垣内 一恵（Kakiuchi, Kazue）

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：90509184

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）：本研究課題では、精原幹細胞の分化誘導因子の種特異性に着目した異種移植法の確立を目指し、ブタをモデルに、ドナー動物種由来分化因子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、精原幹細胞の異種移植により継続的な他動物種由来の精子形成の再構築を試みた。分化因子の過剰発現マウスは、脱毛症や色素沈着などの異常が報告されているため、セルトリ細胞で限定的に機能するプロモーター下流で発現を試みた。セルトリ細胞マーカータンパク質であるRhoxb5プロモーターが性成熟期のマウス精巣とセルトリ細胞株において安定して機能することを見出し、この下流でブタ由来分化因子を発現するトランスジェニックヌードマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精原幹細胞は、自己複製して雄個体の生涯の精子形成を維持することから、遺伝情報を継ぐことができる成体に存在する唯一の幹細胞として知られている。不妊マウス精巣の精細管内移植による精子形成の再構築により、幹細胞活性の測定ツールが確立されている。非げっ歯類である動物種の精原幹細胞株の樹立は、優良家畜や希少動物の種の保存に貢献するだけでなく、ヒトの男性不妊治療へも応用が期待できるが、不妊レシビエント雄個体の作製が困難なため継続的な精子形成を立証することができず研究の妨げになっている。本研究課題は、研究室レベルで非げっ歯類動物種由来の精原幹細胞活性を測定するツールを提供できる可能性を示す。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a xenotransplantation method that focuses on the species-specificity of differentiation-inducing factors for spermatogonial stem cells. Using pigs as a model, we created transgenic mice that express differentiation factors derived from the donor animal species, and we attempted to continuously reconstruct spermatogenesis derived from other animal species by xenotransplantation of stem cells. Since abnormalities such as alopecia and pigmentation have been reported in mice overexpressing differentiation factors, we attempted to express them downstream of a promoter that functions only in Sertoli cells. We found that the Rhoxb5 promoter, a Sertoli cell marker protein, functions stably in sexually mature mouse testes and Sertoli cell lines, and created transgenic nude mice that express a pig-derived differentiation factor downstream of this promoter.

研究分野：精原幹細胞

キーワード：精原幹細胞 異種移植 精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精原幹細胞は、自己複製して雄個体の生涯の精子形成を維持することから、遺伝情報を継ぐことができる成体に存在する唯一の幹細胞として知られている。研究分担者である久保田博士が Brinster らと開発した長期培養系により体外での増殖が可能であり、また彼らが開発した不妊マウス精巣の精細管内移植により、幹細胞活性の測定ツールが確立されている。

精原幹細胞の増殖因子と分化因子は動物種で保存されているのか否か、という問いは 20 年以上前から議論されており、ヒト、家畜やサルなどの様々な動物種の精巣細胞が不妊マウス精細管へ移植された。移植された異種細胞は、精細管内への定着は認められたため、増殖因子はある程度保存されていることが示唆されたが、精子へと分化した動物種はマウスと同じげっ歯類のラットとハムスターのみであり、分化のメカニズムは動物種で大きく異なると考えられている。申請者らは、非げっ歯類であるウサギの精原幹細胞の増殖因子と分化因子の探索を行った結果、増殖因子はマウスやラットと共通であることを解明したが、ウサギ精原幹細胞をマウス精巣内に移植しても精子形成は再構築されず、ウサギの分化因子は異なることを明らかにしてきた (Kubota H., et al., *Biol Rep.* 2011)。

非げっ歯類である動物種の精原幹細胞株の樹立は、優良家畜や希少動物の種の保存に貢献するだけでなく、ヒトの男性不妊治療へも応用が期待できる。近年、様々な動物種由来の精原幹細胞培養法に関する研究が報告されているが、不妊レシピエント雄個体の作製が困難なため継続的な精子形成を立証することができないことから、精原幹細胞の存在が証明できずに研究の妨げになっている。これも偏に動物種で大きく異なる分化のメカニズムが不明だからである。

申請者は、幹細胞因子 stem cell factor (SCF)として知られている Kit ligand(KITL)に着目した。マウスでは、精巣内基底膜に存在し精原幹細胞のニッチと考えられているセルトリ細胞で発現している。KITL は膜結合型と分泌型の 2 種が存在し、精原細胞に発現する KIT 受容体に結合して精子形成を促すことが知られている。特に膜結合型 KITL を発現しない変異マウスは、精子形成不全を引き起こす (Ogawa T. et al. *Nature*, 2000)。様々な動物種における KITL のホモロジーは約 80%とある程度保存されているが、古くから研究者の間では KITL の活性に種特異性があることが知られている。特に造血幹細胞の生存には、ヒト KITL はマウスに対して活性を示さないが、マウスおよびラット KITL はヒトに対して活性を示すことが明らかとなっている。そこで申請者は、KITL の種特異性こそ、分化のメカニズムが動物種で異なる原因ではないかと考察した。

2. 研究の目的

本研究では、既以前精原幹細胞(精原幹細胞の前駆細胞)の精製法が確立し、体外受精や受精卵の体外培養による胚発生能の有無を解析できるブタをモデルに、ブタ由来膜型 KITL (以下 pKITL) を発現する免疫不全トランスジェニックマウスを作製し、ブタ前精原幹細胞の異種移植後の継続的な精子形成の再構築を目指す。これにより、これまで長らく不明であった動物種で異なる分化のメカニズムを明らかにするとともに、様々な動物種由来の精原幹細胞活性の測定ツールを提供する。

3. 研究の方法

(1) マウス精巣組織およびセルトリ細胞株におけるセルトリ細胞特異的プロモーター活性の解析

ヒト KITL を過剰発現するトランスジェニックマウスは、脱毛症や色素沈着などの皮膚に異常が認められているため、pKITL はセルトリ細胞で限定的に機能するプロモーター下流で発現を試みる必要がある。そのため、セルトリ細胞で特異的に長期に渡り機能するセルトリ細胞特異的プロモーターの検討を行った。まず、マウス精巣とマウスセルトリ細胞株において、セルトリ細胞特異的マーカータンパク質である AMH と RHOXb5 の発現解析を行った。14 日齢、3 カ月齢及び 11 カ月齢のマウス精巣と、異なる週齢のマウス精巣より樹立したセルトリ細胞株である MSC-1 (15 週齢)、15P-1 (6 カ月齢)において、AMH と *Rhox5* の発現を qRT-PCR 解析した。次に、プロモーター領域の活性を評価するために、プロモーター領域下流にレポーター遺伝子 EGFP を組み込んだ発現プラスミドを作成し、セルトリ細胞株に遺伝子導入し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

(2) セルトリ細胞特異的プロモーターを利用した pKITL-FLAG 発現系の構築

Rhox5 プロモーター下流に pKITL-FLAG を組み込んだ発現プラスミドを作成し、セルトリ細胞株である MSC-1 と 15P-1 へ遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体による蛍光免疫染色法により発現解析を行った。

(3) トランスジェニックマウスの作成

pRhox5-pKITL-FLAG 発現プラスミドをインジェクションした KSN/Slc ノードマウス由来受精卵を偽妊娠マウスへ移植しトランスジェニックマウスを作製した。ファウンダーマウスは野生型 KSN/SLC ノードマウスと掛け合わせ F1 マウスを得て、ジェノタイプング及び精巣組織の抗 FLAG 抗体による蛍光免疫染色法により発現解析を行った。

4. 研究成果

(1)雄マウス性成熟期におけるセルトリ細胞特異的プロモーター活性の加齢変動

前性成熟期の14日齢、性成熟期の3、11か月齢精巣におけるセルトリ細胞マーカーの発現解析を行った。*AMH*の発現量は生後14日齢が最も高く、性成熟期である生後3か月齢以降には発現量が非常に低いことがわかった。一方、*Rhoxb5*は性成熟期に関わらず発現量が安定していることがわかった(図1)。

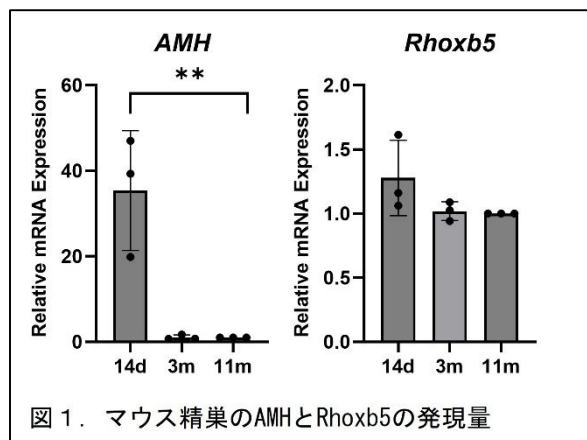


図1. マウス精巣のAMHとRhoxb5の発現量

(2)セルトリ細胞株におけるセルトリ細胞特異的プロモーターの活性

セルトリ細胞株では、*AMH*の発現量はMSC-1細胞株(15週齢精巣より樹立)に比べて15P-1細胞株(6か月齢精巣より樹立)では減少したが、*Rhoxb5*の発現量は細胞株で変動しないことがわかった(図2)。

従って、性成熟期のセルトリ細胞においても安定な発現が期待できる*Rhoxb5*プロモーターを選択した。

次に、*Rhoxb5*プロモーターがセルトリ細胞株で機能し、タンパク質発現を誘導するか検討を行った。*Rhoxb5*プロモーター下流にレポーター遺伝子EGFPを組み込んだ発現プラスミドをMSC-1細胞株と15P-1細胞株へ遺伝子導入し、フローサイトメトリーでEGFP陽性細胞を解析したところ、それぞれ2.7%、5.0%の陽性細胞を検出したことから、*Rhoxb5*プロモーターはセルトリ細胞で活性を有することを確認することができた。

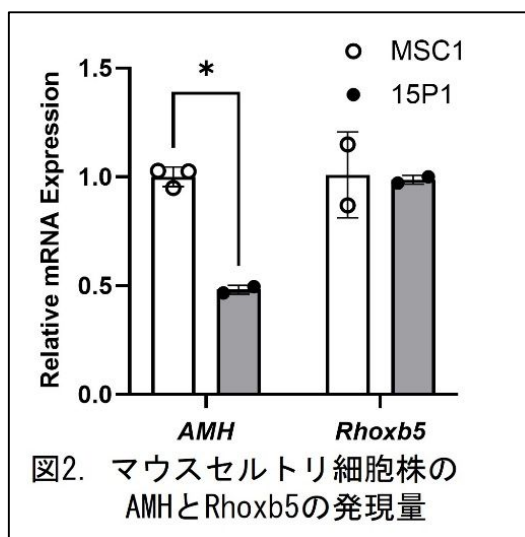


図2. マウスセルトリ細胞株のAMHとRhoxb5の発現量

(3)セルトリ細胞特異的プロモーターを利用したブタKITL-FLAG発現系の構築

トランスジェニックマウス作製のために、*Rhoxb5*プロモーターの下流でpKITL-FLAGを発現するプラスミドを構築した。pKITLを検出することができる抗体の入手が困難なため、FLAG融合タンパク質としてpKITLを発現することとした。pKITL-FLAGの活性については、既に他の実験にて検証済みであり、pKITL-FLAGが細胞の増殖に問題なく寄与することを確認している。この発現プラスミドをMSC-1と15P-1へ遺伝子導入して発現解析したところ、pKITL-FLAGの発現を蛍光免疫染色法により確認することができたため(図3)、次項のトランスジェニックマウスの作成に着手した。

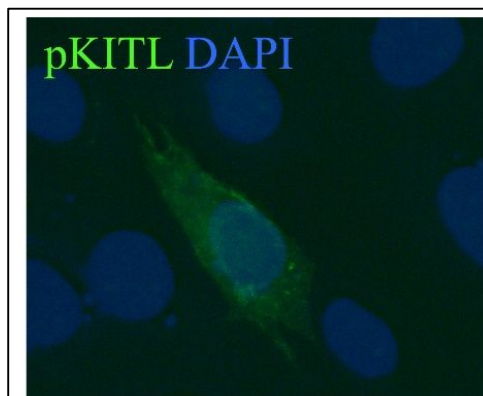


図3. 15P1細胞株におけるpKITL-FLAGの発現

(4)ブタKITL-FLAGトランスジェニックマウス作成ブタ前精原幹細胞の異種移植を実施するにあたり、レシピエントは免疫不全マウスである必要があるため、発現プラスミドをヌードマウス由来卵子にインジェクションし、トランスジェニックヌードマウスを作製した。精巣を摘出し、pKITL-FLAGがセルトリ細胞で発現しているか蛍光免疫染色法にて解析を行った結果、pKITL-FLAGは精細管基底膜近傍で発現し、セルトリ細胞マーカーであるGATA4陽性細胞においてpKITLの発現が確認できたため、セルトリ細胞でpKITL-FLAGを発現するトランスジェニックヌードマウスの作製に成功した。今後、ブタ前精原幹細胞の異種移植を実施し、ブタの精子形成の再構築を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	高岸 聖彦 (Takagishi Kiyohiko) (20216633)	北里大学・獣医学部・講師 (32607)	
研究分担者	久保田 浩司 (Kubota Hiroshi) (80263094)	北里大学・獣医学部・教授 (32607)	

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