

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15333

研究課題名（和文）血液精巣関門の構造と真の生理機能

研究課題名（英文）Structures and physiological functions of the blood-testis barrier

研究代表者

菅原 太一（Sugawara, Taichi）

熊本大学・大学院先導機構・助教

研究者番号：30758412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳動物の精巣では、セルトリ細胞が互いに接着し、タイトジャンクションを主要構造とする血液精巣関門を形成する。しかし、精子形成における血液精巣関門の働きについては十分に理解されていない。本研究では、3細胞結合領域において形成されるトリセルラータイトジャンクションの構成分子をセルトリ細胞において欠損させたマウスを作製した。本研究で作製した遺伝子欠損マウスを詳細に解析することにより、血液精巣関門が形成される生理的意義の解明に役立つことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症のおよそ半数は男性側に原因があるとされており、その原因の大半が造精機能障害である。しかし、その病態発症メカニズムについて不明な点が多い。これまでの研究により、男性の精子形成障害と血液精巣関門の形態・機能異常との関連性が示唆されている。本研究で作製した血液精巣関門の破綻モデルマウスは、男性不妊症の発生機序を理解し、改善するための研究に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the testes of mammals, Sertoli cells form the blood-testis barrier which is mainly composed of tight junctions. However, the roles of the blood-testis barrier in spermatogenesis is poorly understood. In the present study, we deleted a component of tricellular tight junctions, which are formed at tricellular contacts where the vertices of three cells meet, in Sertoli cells of mice. Detailed analyses of the conditional knockout mice would help to elucidate the physiological significance of the blood-testis barrier formation in spermatogenesis.

研究分野：生物学

キーワード：精巣 セルトリ細胞 血液精巣関門 タイトジャンクション トリセルラータイトジャンクション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の精巣においてセルトリ細胞は、生殖細胞系列である造精細胞の支持細胞として働き、精子形成をサポートする。セルトリ細胞は互いに接着し、タイトジャンクション (Sertoli cell tight junction: SCTJ) を主要構造とする血液精巣関門を形成する (図 1; Dym and Fawcett et al., *Biol. Reprod.*, 1970)。SCTJ は細胞間隙における物質透過を制限するバリアとして働き、精細管内を傍腔区画と基底区画に分ける (図 1)。SCTJ のバリア機能によって傍腔区画内に形成される特殊な微小環境が精子形成において重要であるとされている。これまでに、SCTJ の構成分子を欠損させた遺伝子改変マウスが作製され、造精機能における SCTJ の役割について調べられてきた (Gow et al., *Cell*, 1999; Saitou et al., *Mol. Biol. Cell*, 2000; Sakaguchi et al., *Mol. Cell Biol.*, 2006; Shao et al., *Dev. Biol.*, 2008; Chakraborty et al., *Mol. Endocrinol.*, 2014)。しかし、それらの遺伝子欠損マウスの精子形成に関する表現型は多様であり、SCTJ によるバリア機能がどのように精子形成に寄与するのかについて十分な理解が得られていない。

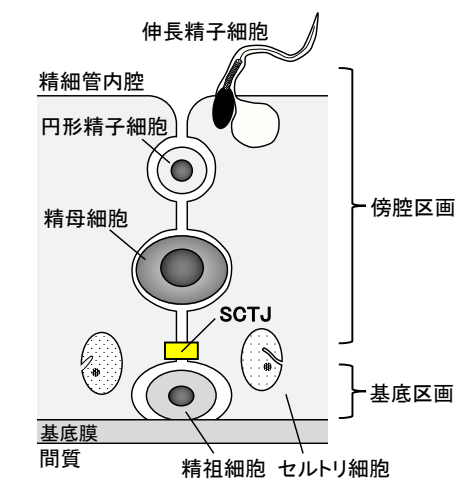


図1: 哺乳動物における精細管内の模式図

2. 研究の目的

上皮シートが十分なバリア機能を形成するためには、2 細胞間に生じるすき間だけでなく、3 つの細胞が接する領域 (3 細胞結合領域) におけるすき間を同時に塞ぐ必要がある。3 細胞結合領域では、トリセルラーTJ (Tricellular TJ: tTJ) が細胞間隙バリアを形成する。tTJ を構成する膜貫通タンパク質として、アンギュリンファミリー (アンギュリン-1/LSR、アンギュリン-2/ILDR1、アンギュリン-3/ILDR2) とトリセルリンが報告されている (Masuda et al., *J. Cell Sci.*, 2011; Higashi et al., *J. Cell Sci.*, 2013; Ikenouchi et al., *J. Cell Biol.*, 2005)。本研究では、新たな血液精巣関門の破綻モデルマウスとして、tTJ の構成分子を欠損させたマウスを作製・解析することにより、精子形成における血液精巣関門の働きを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 精巣における tTJ 構成分子の発現解析

性成熟した野生型雄マウスの精巣に発現する tTJ の構成タンパク質 (アンギュリン-1、アンギュリン-2、アンギュリン-3、トリセルリン) を調べた。無固定の精巣を OCT コンパウンドに包埋し液体窒素で凍結後、厚さ 8 μm の切片を回収した。回収した切片を室温で風乾後、氷上において 95% エタノールで 30 分間固定した。その後、室温で 1 分間アセトンを用いて洗浄し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し、ブロッッキング (5% ウシ血清アルブミン、10% ウシ胎児血清、0.1% Tween 20 を含む PBS を使用) を室温で 30–60 分間行った。その後、各種抗体を用いて免疫蛍光抗体法を行った。また、セルトリ細胞特異的に発現する遺伝子群の同定を目的としたバルクの RNA-seq により得られたデータとマウス精巣細胞を用いたシングルセル RNA-seq により得られたデータをもとに (Soffientini et al., *BMC Genomics*, 2017; Hermann et al., *Cell Rep.*, 2018)、セルトリ細胞が発現する tTJ 構成分子について解析した。

(2) セルトリ細胞特異的なアンギュリン-1 欠損マウス (アンギュリン-1 cKO マウス) の作製

LSR^{+/+}; Amh-Cre マウスと LSR^{lox/lox} マウスを交配し (LSR^{+/+} マウスと LSR^{lox/lox} マウスは生理学研究所の古瀬幹夫教授から譲受)、LSR^{lox/+}; Amh-Cre 雄マウス (アンギュリン-1 cKO マウス) を作製した。

(3) アンギュリン-1 cKO マウスの精巣を用いた組織学および免疫組織化学的解析

4% PFA/0.1 M リン酸緩衝液 (PB) で一晩固定した精巣を脱水し、パラフィンに包埋後、厚さ 4 μm の切片を回収した。精細管の組織構造を調べるために、脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、免疫組織化学的解析の際には、脱パラフィン後、抗原賦活化処理 (20 mM Tris-HCl [pH 9.0]、95°C、15 分) を行った。さらに、室温で 30–60 分間ブロッッキングを行い、造精細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫蛍光染色により、アンギュリン-1 cKO による精子形成への影響を調べた。

既知の TJ 構成分子に対する抗体を用いて、精巣切片の免疫蛍光染色を行い、アンギュリン-1 cKO による SCTJ 形成への影響を光学顕微鏡レベルで調べた。

(4) 電子顕微鏡法による SCTJ の微細構造観察

SCTJ およびセルトリ細胞によって構築される tTJ の形成において、セルトリ細胞のアンギュリン-1 が果たす役割を明らかにすることを目的として、凍結切断レプリカ法および超薄切片法による電子顕微鏡観察を行った。両手法において、細切した精巣を冷やしたハーフカルノフスキー固定液 (2.5%グルタルアルデヒド+2% PFA/0.1 M PB) で固定した。精細管を材料とした凍結切断レプリカの作製は、福井大学の深澤有吾教授の協力を得て行った。超薄切片法ではその後、1%酸化オスミウムによる後固定、ブロック染色、脱水等を経て試料を樹脂に包埋し、硬化させた。

4. 研究成果

(1) 精巣における tTJ 構成分子の発現解析

精巣凍結切片を用いて免疫蛍光染色を行った結果、既知の tTJ 構成分子のうち、アンギュリン-1 が精細管内に発現することがわかった。また、アンギュリン-1 は SCTJ を構成する膜貫通タンパク質オクルディンの一部と共局在していた。

ジフテリア毒素依存的にセルトリ細胞を除去できる遺伝子改変マウスに、ブスルファン (精子幹細胞に作用し、造精細胞を精巣から除去する抗悪性腫瘍剤) あるいはブスルファンとジフテリア毒素を投与後に回収した精巣を使って行ったバルクの RNA-seq データを再解析すると (Soffientini et al., *BMC Genomics*, 2017)、アンギュリン-1 がセルトリ細胞特異的に発現することが示唆された。さらに、性成熟したマウスの精巣細胞を用いて得られたシングルセル RNA-seq データを再解析した結果 (Hermann et al., *Cell Rep.*, 2018)、精細管内においてアンギュリン-1 は造精細胞ではなくセルトリ細胞に高発現することが示唆された。また、両解析において、精巣におけるアンギュリン-2、アンギュリン-3、トリセルリンの発現はアンギュリン-1 に比べて極めて低いことが示唆された。

(2) セルトリ細胞特異的なアンギュリン-1 欠損マウス (アンギュリン-1 cKO マウス) の作製

アンギュリン-1 cKO マウスの精巣から作製したパラフィン切片を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、コントロールマウスにおいて観察された ZO1 (TJ の裏打ちタンパク質) とアンギュリン-1 の共局在が消失することがわかった。

(3) アンギュリン-1 cKO マウスの精巣を用いた組織学および免疫組織化学的解析

アンギュリン-1 cKO マウスの精巣から作製したパラフィン切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ、エオジン好性で細胞核を含まない球状の構造体が精細管内腔に形成されていた。その構造体が造精細胞あるいはセルトリ細胞のどちらに由来するのかを明らかにするために、造精細胞 (精母細胞/精子細胞) マーカーとして VASA、セルトリ細胞マーカーとしてビメンチンを用いて免疫組織化学的に調べた。その結果、VASA がエオジン好性の構造体内に含まれていることが明らかとなり、造精細胞に由来する構造体であることが示唆された。また、ビメンチンはその構造体の外縁部に局在していた。

アンギュリン-1 cKO マウスの精巣から作製したパラフィン切片において、VASA と SCP3 (精母細胞マーカー) を免疫蛍光抗体法により検出したところ、精母細胞および精子細胞の数がコントロールマウスに比べて減少していることが示唆された。以上より、セルトリ細胞のアンギュリン-1 が造精機能において必要であることが示された。

パラフィン精巣切片の免疫蛍光染色を行ったところ、コントロールマウスの精細管において、ZO1 は基底膜近傍に局在していたのに対して、アンギュリン-1 cKO マウスではその局在範囲が精細管内腔にまで広がっていた。よって、アンギュリン-1 cKO が SCTJ 形成に影響を与える可能性が示された。

(4) 電子顕微鏡法による SCTJ の微細構造観察

マウス精細管を材料として凍結切断レプリカを作製する過程で、切断が精細管外縁部で生じやすいことがわかった。また、作製したレプリカを透過型電子顕微鏡で観察すると、カベオラ様の構造が頻繁に観察された。精細管外周を覆っている筋様細胞ではカベオラがよく発達しているとの報告がある (Oliveira et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 2016)。よって、本条件においては、筋様細胞の細胞膜において切断が起こりやすい可能性がある。一方で、SCTJ を構築していると思われる TJ ストランド (膜貫通タンパク質クローディングが重合することによって形成されるひも状の構造体) も稀に観察することができた。今後、SCTJ における TJ ストランドを効率よく観察するために、精細管内部で切断が起こりやすくなる条件を検討する必要があるとの結論に至った。現在、固定条件等を検討している。また、超薄切片法による電子顕微鏡観察では、2つのセルトリ細胞の細胞膜が密着する構造と、その細胞質側に位置するアクチン線維束および小胞体を捉えることができた。しかし、セルトリ細胞によって構築される tTJ については、超薄切片上での出現頻度が SCTJ よりも低いこともあり、明確な記述ができるほど十分に観察することができていない。今後、より適切なレプリカ作製条件を検討しつつ、アンギュリン-1 cKO が SCTJ およびセルトリ細胞によって構築される tTJ 形成に与える影響を形態学的に解析していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arunothai Wanta, Kazuhiro Noguchi, Taichi Sugawara, Kayoko Sonoda, Suthat Duangchit, Tomohiko Wakayama	4. 巻 71
2. 論文標題 Expression of Protein Markers in Spermatogenic and Supporting Sertoli Cells Affected by High Abdominal Temperature in Cryptorchidism Model Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The journal of histochemistry and cytochemistry	6. 最初と最後の頁 387-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/00221554231185626	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 Mikio Furuse, Daiki Nakatsu, Wendy Hempstock, Shiori Sugioka, Noriko Ishizuka, Kyoko Furuse, Taichi Sugawara, Yugo Fukazawa, Hisayoshi Hayashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Reconstitution of functional tight junctions with individual claudin subtypes in epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell structure and function	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.22068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomohiko Wakayama, Satoshi Yokota, Kazuhiro Noguchi, Taichi Sugawara, Kayoko Sonoda, Arunothai Wanta	4. 巻 157
2. 論文標題 Quantitative evaluation of spermatogenesis by fluorescent histochemistry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and cell biology	6. 最初と最後の頁 287-295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-022-02080-6	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 Taichi Sugawara, Kyoko Furuse, Tetsuhisa Otani, Tomohiko Wakayama, Mikio Furuse	4. 巻 220
2. 論文標題 Angulin-1 seals tricellular contacts independently of tricellulin and claudins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of cell biology	6. 最初と最後の頁 e202005062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202005062	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Taichi Sugawara, Kayoko Sonoda, Mikio Furuse, Tomohiko Wakayama
2. 発表標題 CLDN11 regulates spermatogonial differentiation via SCF
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Taichi Sugawara, Kayoko Sonoda, Mikio Furuse, Tomohiko Wakayama
2. 発表標題 Claudin-11 regulates the first wave and adult steady-state spermatogenesis
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅原太一、若山友彦、古瀬幹夫
2. 発表標題 トリセルラータイトジャンクションの膜タンパク質アンギュリン-1によるタイトジャンクション形成の制御
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原太一、古瀬京子、大谷哲久、若山友彦、古瀬幹夫
2. 発表標題 上皮のトリセルラーコンタクトにおける透過バリア形成機構
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------