

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2012 年 6 月 18 日現在

機関番号：32660
 研究種目：若手(B)
 研究期間：2010 年度～2011 年度
 課題番号：22780264
 研究課題名（和文） 精原幹細胞の維持ならびに分化におけるホメオドメイン転写因子 Meis1 の役割
 研究課題名（英文） Role of homeodomain transcription factor Meis1 on the maintain and differentiation of spermatogonial stem cell
 研究代表者 河合 康洋
 (YASUHIRO KAWAI) 東京理科大学・生命科学研究所・助教
 研究者番号：00416281

研究成果の概要（和文）：精子形成は、精子の幹細胞である精原幹細胞の維持および分化、精母細胞の減数分裂、精細胞の変態と一連の過程を経て進行して行く複雑な過程であるが、精原幹細胞の維持および分化制御過程に関わる転写制御機構は未だに知見が乏しい状況である。本研究では、造血幹細胞ならびに他の組織幹細胞の維持に関与する事が知られているホメオドメイン転写因子である Meis1 ならびに pKnox1 が、精原細胞の分化ならびに増殖に重要な機能を果たしている事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The maintenance, self-renewal, and differentiation of spermatogonial stem cells (SSCs) are tightly regulated processes that are critical for normal spermatogenesis. However, molecular mechanisms controlling these processes remain largely unclear. TALE family homeodomain transcription factors, including Meis1 and pKnox1, are demonstrated to be essential for hematopoietic stem cell maintenance and self-renewal. In this study, our results indicated that these transcription factors were required for differentiation and proliferation of spermatogonia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：発生

1. 研究開始当初の背景

成体における組織幹細胞は、1) 自己複製(self-renewal)する能力を持ち、2) 組織を構成する全ての子孫細胞への分化能を有するという二つの鍵となる機能的性質によって定義され、その組織の恒常性の維持や再生に関与している。生涯にわたって膨大な数の精子が産生される精子形成過程においても、自己複製し、成熟

した精子への分化能を有する幹細胞の存在が明らかにされてきている。

成体マウスの精巣において、幹細胞は、精原細胞の中で未分化型精原細胞($A_{undifferentiation}$: A_{undiff})に含まれていると考えられている。未分化型精原細胞は精細管周囲の基底膜に接して存在し、最も未分化な単一細胞である A_{single} (A_s)、それが不完全分裂して、2個の娘細胞の細胞質

が連結された状態である A_{paired} (A_{pr})、さらに、 A_{pr} が分裂して、4, 8, 16, 32 個の細胞が連結した状態である $A_{aligned}$ (A_{al})に分類される。 A_{al} 精原細胞は、減数分裂に入る前に 6 回分裂を行い、その過程で、幹細胞機能を失った $A1, A2, A3, A4$, そして、Intermediate, B精原細胞へと分化していく。その後、精子形成は、減数分裂を行う精母細胞を経て、半数体の精子細胞、機能的な精子への形態変化、と進行していく。

近年、未分化型精原細胞の維持や分化に関わる $Plzf$, $Neurogenin3$ ($Ngn-3$), $Nanos2$, $Sox3$ などの分子が遺伝子欠損マウスを用いた解析により同定されており、未分化型精原細胞における幹細胞性（自己複製能や分化能）の不均一性が指摘されてきているが、未分化型精原細胞における幹細胞性維持や分化の制御に関する分子メカニズムについては、未だに明らかになっていない状況である。

2. 研究の目的

本申請研究では、未分化型精原細胞から精子形成に至る過程でのホメオドメイン転写因子 $Meis1$ の発現ならびにその機能について、 $Meis1$ コンディショナル欠損マウスならびに $Meis1$ -EGFP レポーターマウスを用いて解析し、未分化型精原細胞における幹細胞性の不均一性との関係、さらには、精原幹細胞の維持・分化の転写制御ネットワークを、 $Meis1$ の観点から解明する。以下に、具体的な3項目を挙げる。

- (1) **精原細胞における $Meis1$ 発現細胞の特定**：精子形成における $Meis1$ の機能を解明する上で、未分化型精原細胞における分化段階の異なる細胞集団 (A_s , A_{pr} , A_{al}) における $Meis1$ の発現を明らかにする必要がある。そこで、 $GFR\alpha 1$, $Plzf$, $Nanos2$, $Ngn-3$, $c-Kit$ などの既知の精原細胞分化マーカー（抗体）を用いて $Meis1$ レポーターマウスの精細管を免疫組織学的に解析することで、精原細胞における $Meis1$ の発現ならびに既知の分化マーカーとの発現様式の差異について明らかにする。
- (2) **精原細胞の維持ならびに分化における $Meis1$ の機能の解明**：生殖系列特異的ならびに精原細胞特異的に $Meis1$ を欠失するマウス ($TNAP$ -cre- $Meis1^{lox}$, $Ngn-3$ -cre- $Meis1^{lox}$) を作製し、それらマウスにおける精子形成異常について、免疫組織学的ならびにフローサイトメトリーを用いて解析し、精原細胞の維持ならびに分化における $Meis1$ の役割を明らかにする。

かにする。

- (3) **精原細胞における $Meis1$ の標的遺伝子ならびに転写因子間相互作用の解明**： $Rosa26$ -CreER^{T2}- $Meis1^{lox}$ マウスを作製し、タモキシフェン投与により薬剤誘導的に精原細胞において $Meis1$ を欠失させ、 $Meis1$ 欠失による遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法により解析し、精原細胞における $Meis1$ の標的遺伝子ならびに他の精原細胞維持・分化に関与することの知られている転写因子($Plzf$, $Sox3$, $Ngn-3$ など)との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) **精原細胞における $Meis1$ 発現細胞の特定**
分化段階の異なる精原細胞 (A_s , A_{pr} , A_{al}) における $Meis1$ の発現ならびに既知の分化マーカーとの発現様式の差異について、申請者の研究室で維持している $Meis1$ -EGFP レポーターマウスならびに $Meis1$ 遺伝子座に $LacZ$ 遺伝子をノックインした $Meis1^{LacZ}$ ヘテロマウス（癌研究所発がん研究部 中村卓郎部長より供与）を用いて解析する。すなわち、精細管のホールマウントX-Gal染色、EGFP 蛍光検出と $GFR\alpha 1$, $Plzf$, $Nanos2$, $Ngn-3$, $c-Kit$ などの分化・未分化精原細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫染色を行い、各精原細胞集団における $Meis1$ の発現様式を明らかにする。
- (2) **精原細胞の維持ならびに分化における $Meis1$ の機能の解明 (I. 精原細胞特異的 $Meis1$ 欠損マウスを用いた解析)**
生殖系列特異的ならびに精原細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する $TNAP$ -cre (Prof. Andras NagyとMTAを交わし、遺伝研 佐々木裕之先生より供与) および $Ngn-3$ -cre マウス（基生研 吉田松生 先生の了承のもと、理研BRCより導入済）を、 $Meis1$ 遺伝子の第八エクソンを $flox$ したコンディショナルアレルをもつマウス ($Meis1^{lox}$ マウス) と交配し、精原細胞で $Meis1$ を欠失するマウス ($TNAP$ -cre- $Meis1^{lox}$, $Ngn-3$ -cre- $Meis1^{lox}$) を作製する。それらマウスにおける精子形成異常について、病理組織学・免疫組織学的ならびにフローサイトメトリー ($\alpha 6$ -integrin, $c-kit$, $EpCAM$, $CD9$) を用いて解析し、精原細胞の維持ならびに分化における $Meis1$ の役割を明らかにする。
- (3) **精原細胞の維持ならびに分化における $Meis1$ の機能の解明 (II. 精子形成不全マウスへの移植法を用いた解析)**
精原細胞の自己複製能ならびに分化能における $Meis1$ の機能をより詳細に解析するために、精子形成不全である W/W^v マウス精巣への精原細胞移植による精子形成再構成の実験系を用いる。すなわち、タモキシフェ

ン誘導性にCreリコンビナーゼの機能発現を誘導可能なRosa26-CreER^{T2}マウス (Prof. LudwiczekとMTAを交わし、理研 河本宏先生より供与) とMeis1^{fllox}マウスならびにMeis1-EGFPレポーターマウスを交配することにより、Meis1-EGFP-Rosa26-CreER^{T2}-Meis1^{fllox}マウスを作製する。また、実験によっては移植細胞の追跡・同定を行うためにCreリコンビナーゼによってLacZを発現するCAG-CAT-Zアレル (大阪大学宮崎純一先生より供与) も導入する。本マウス精巣からMeis1を発現した精原細胞をセルソーターにより単離し、W/W^vマウス精巣に移植する。移植細胞が定着した後、腹腔内にタモキシフェンを投与することによりMeis1の欠失を誘導し、精子形成再構築について免疫組織学的に解析する。

(4) 精原細胞におけるMeis1の標的遺伝子ならびに転写因子間相互作用の解明

実験計画(2)および(3)で作製したTNAP-cre-Meis1^{fllox}またはNgn-3-cre-Meis1^{fllox}マウスならびにRosa26-CreER^{T2}-Meis1^{fllox}マウスを用いて、精原細胞におけるMeis1欠失による遺伝子発現変化についてマイクロアレイ法により網羅的に解析する。発現変動の認められた遺伝子については定量的PCRおよび免疫組織学的解析を行い、確認する。さらに、精原細胞の維持・分化に関与することが明らかになっている転写因子(Plzf, Sox3, Ngn-3など)については、精細管の特異抗体を用いたホルマウント免疫染色を行い、これら転写因子の発現制御におけるMeis1の役割を解析し、精原細胞における転写制御ネットワークを明らかにする。

(5) 精原細胞の維持ならびに分化におけるMeis1の機能の解明 (III. GS細胞作製による解析)

精原細胞の維持におけるMeis1の機能をより詳細に解析するために、Rosa26-CreER^{T2}-Meis1^{fllox}マウス精巣を用いて、germline stem (GS)細胞を作製する。それらGS細胞をGDNF存在下で培養し、in vitroでタモキシフェン処理することにより、Meis1の欠失を誘導する。欠失誘導後のGS細胞の生存、GDNF依存性について解析し、実験計画2および3のin vivoの結果と合わせて、Meis1の機能について考察する。

当初の予定通り進まなかった場合の対応策
精巣にはMeis1と同じTALEファミリーに属するPknx1 (別名:Meis4, Prep1)が発現しているため、機能的重複により、Meis1単独欠損では精子形成に表現系が現れない可能性が存在する。申請者はPknx1のコンディショナルアレルを有するマウス(Pknx1^{fllox})を作製しており、また、所属する研究室ではPknx1^{LacZ}マウス(名古屋大学 黒岩厚先生より供与)を系統維持して

いることから、Meis1単独欠損で当初の予定通り計画が進行しなかった場合は、Meis1-Pknx1 double-floxマウスを作製し、精原細胞におけるPknx1の機能をMeis1と合わせて解析していく予定である。

4. 研究成果

(1) 精原細胞の維持および分化へのMeis1の役割

まず、成体マウスの精子形成過程におけるMeis1発現細胞を詳細に解析するため、Meis1-EGFPマウスを用いたFACS解析を行った。その結果、精巣内においてMeis1がThy1陽性c-Kit陰性の未分化型精原細胞に強く発現していた(図1)。

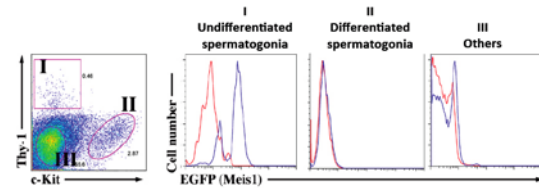


図1 精巣におけるMeis1発現細胞の同定

次に成体マウスの精子形成過程におけるMeis1の機能を解析するため、雄性生殖細胞特異的にMeis1を欠損する事の出来るNgn3-cre, Meis1^{fllox}マウスを用いて、精巣の組織学的解析を行った。その結果、4週齢では、コントロール精巣と比較して顕著な形態学的な差異は認められなかったが、7週齢の精巣においては、精細管が萎縮あるいは空胞化し、精子形成不全の精細管が散見された。また、空胞化した精細管内に精原細胞のマーカー蛋白質であるTRA98陽性細胞は認められず、萎縮した精細管では異常な精原細胞の蓄積が認められ、これらの細胞はTUNEL陽性反応、つまりアポトーシスを起こしている事が明らかとなった。また16週齢のNgn3-cre, Meis1^{fllox}マウス精巣においては、ほぼ全ての精細管において空胞化が認められ、精細管内に精原細胞は存在せず、TUNEL陽性細胞もほとんど認められなかった(図2、3、4)。

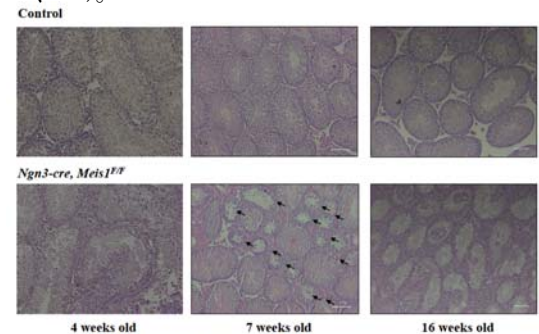
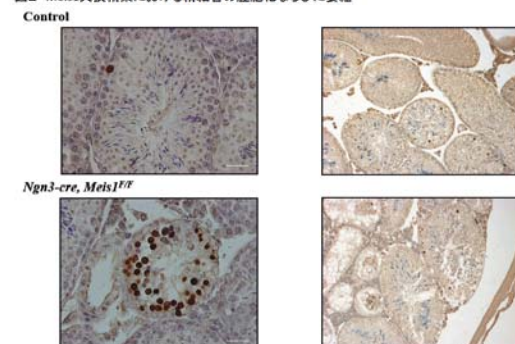


図2 Meis1欠損精巣における精細管の空胞化ならびに萎縮



以上の結果より、精原細胞において *Meis1* を欠損することにより精原細胞が分化を停止し、異常増殖が起こり蓄積したと考えられた。また、蓄積した精原細胞は、最終的にアポトーシスにより精細管内から排除され、精細管が空砲化したと考えられた。本研究結果より、*Meis1* は精原細胞の分化に寄与している事が示唆された。

(2) *pKnox1* は *c-kit* 陽性精原幹細胞の増殖に寄与する

精子形成過程における *pKnox1* 発現を調べるため、出生後各日齢の精巣における *pKnox1* 発現を判定的PCRにより行った。また、成体精巣における *pKnox1* 発現細胞を同定するため、anti-*pKnox1* および *c-kit* 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。

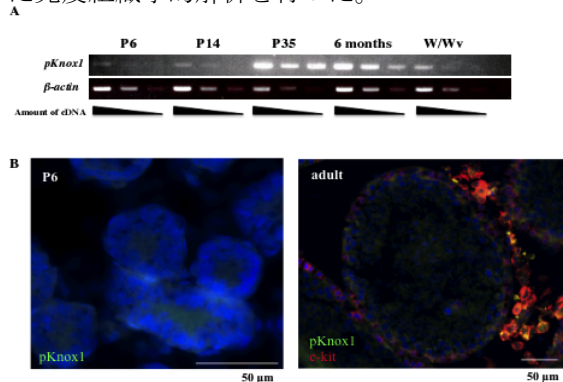


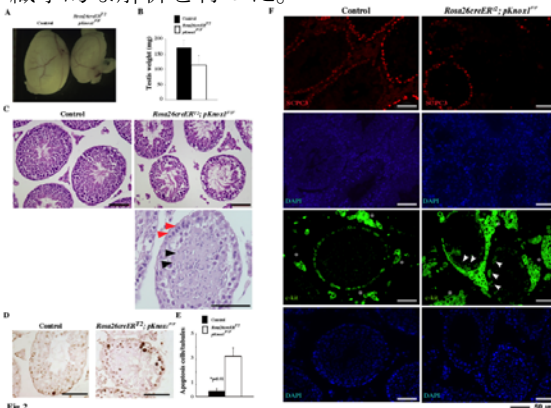
Fig.1 *pKnox1* expression on the spermatogenesis

精原幹細胞が基底膜上に定着し増殖し始める出生 6 日目より *pKnox1* の発現は検出された。その後、加齢に伴い *pKnox1* 発現量は増加し、最初の精子形成が終了し、恒常的な精子形成が開始される出生 35 日目に *pKnox1* 発現量はプラトーに達し、成体精巣においても *pKnox1* 発現は高い状態で維持された。また、

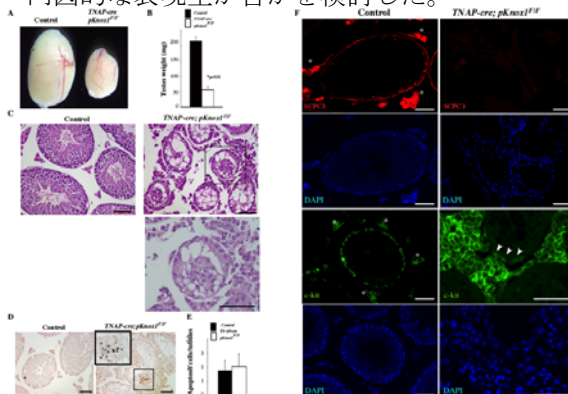
成体精巣において、*pKnox1* 陽性細胞 (緑) は未分化精原細胞を含む精原細胞集団のマーカータンパク質である *c-kit* 陽性細胞 (赤) と共局在している事が確認された (Fig. 1 A, B)。

精子形成過程における *pKnox1* 発現パターンおよび成体精巣における *pKnox1* 発現細胞の局在より、精子形成に寄与する可能性が強くしされたため、*pKnox1* コンディショナルノックアウトを作製し、精子形成に及ぼす影響の解析を行った。

まず、成体精巣における *pKnox1* の機能を解析するためタモキシフェン誘導性に全身において *pKnox1* を欠損する事の出来る *Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{F/F}* マウスを用いて組織学的な解析を行った。



タモキシフェン投与 3 週間後、*pKnox1* 欠損マウスの精巣は顕著に収縮し、萎縮或は空砲化した精細管が散見された。また、萎縮した精細管内には TUNEL 陽性細胞が著しく多く存在し、精母細胞のマーカーである SCP3 陽性細胞が著しく減少した (Fig. 2)。これらの結果より、成体精巣の精子形成過程において *pKnox1* が精母細胞までの分化あるいは増殖に寄与する可能性が示唆された。*Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{F/F}* マウスは全身性に *pKnox1* を欠損した結果であるため、次に生殖細胞特異的に *pKnox1* を欠損しうる *TNAP-Cre-pKnox1^{F/F}* マウスを用いて、生殖細胞内因的な表現型か否かを検討した。



その結果、*TNAP-Cre-pKnox1^{F/F}* マウスにおいて、*Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{F/F}* マウスより重篤な表現型が観察された (Fig. 3)。

TNAP-Cre-pKnox1^{f/f}マウスでは、始原生殖細胞よりpKnox1が欠損されるため重篤化した物と考えられたが、生殖細胞内因的な表現型である事が確認された。つまり、pKnox1は精子形成過程における精母細胞までの分化過程に異常がある可能性が再度確認された。

そこで、pKnox1欠損精巣における精子形成の初期過程を精原幹細胞のマーカである抗GFRα1およびc-kit抗体を用いた精細管のホルンマウント免疫染色を行った。

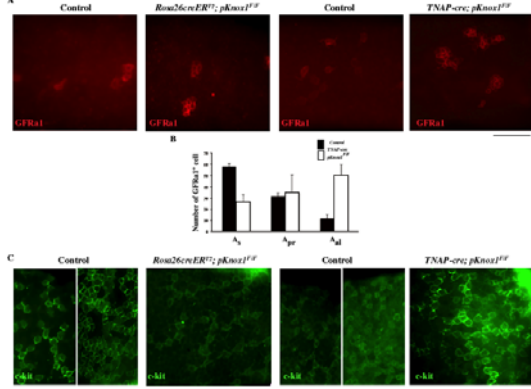


Fig. 4

pKnox1欠損精巣において、A₁₈以降の分化段階のc-kit陽性細胞がほとんど存在せず、正常個体ではシングル細胞あるいはペア細胞で観察されるGFRα1陽性細胞が、異常に凝集している事が明らかとなった。

c-kit/SCF経路は、精原細胞において増殖および生存に有用なシグナルであり、c-kit陽性細胞における増殖活性を精原細胞において増殖活性のマーカである抗PCNA抗体を用いて免疫組織学的に解析を行った。その結果、pKnox1欠損c-kit陽性細胞においてPCNA陽性反応は認められ無かった(Fig. 5)。

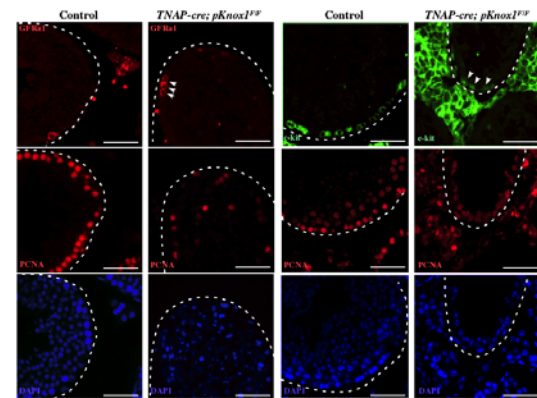


Fig. 5

以上の結果から、pKnox1はc-kit陽性精原細胞の増殖を正に制御する転写因子である事が明らかとなった。

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)

Kawai Y, Noguchi J, Akiyama K, Takeno Y, Fujiwara Y, Kajita S, Tsuji T, Kikuchi K, Kaneko H, Kunieda T. A missense mutation of the Dhh gene is associated with male pseudohermaphroditic rats showing impaired Leydig cell development. (2010) *Reproduction*, 141(2) 217-225. 査読有り

[学会発表] (計3件)

河合康洋、後飯塚僚 精子形成過程におけるMeis1の役割 2010年7月30日 日本アンドロロジー学会 日本獣医生命科学大学

河合康洋、小池絃子、青木悠亮、後飯塚僚 卵子形成過程におけるホメオドメイン転写因子pKnox1の発現と機能 2011年9月15-17日 日本繁殖学会 いわて県民情報交流センター

Kawai Y, Aiyama Y, Kanai Y, Goitsuka R Homeodomain transcription factor pKnox1 is required for the differentiation of spermatogonia 2011年12月13-16日 日本分子生物学会 パンフィコ横浜

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号：

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：