

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780267

研究課題名（和文） 哺乳類の安定的な精子形成を支える幹細胞集団の特定

研究課題名（英文） Identification of stem cells in mouse spermatogenesis

研究代表者

原 健士朗 (HARA KENSHIRO)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教

研究者番号：60551546

研究成果の概要（和文）：

マウスの精子幹細胞を特定することを目的として、in vivo ライブイメージングとパルスラベル法を用いて組織非侵襲的に GFR α 1 発現精原細胞の運命を単一細胞レベルで解析した。その結果、形態の異なる不均一な細胞集団がマウス精子形成を支える幹細胞であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify stem cells in mouse spermatogenesis, I analysed the fate behaviour of GFR α 1-expressing spermatogonia and their progeny at single-cell resolution by combining in vivo live-imaging with pulse-labeling studies. Data suggest that the morphologically heterogeneous population of GFR α 1-expressing spermatogonia together comprise a stem cell pool.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：形態・精巣

1. 研究開始当初の背景

精巣は、繁殖期間を通して恒常的に配偶子を生産し続けるという点で興味深い器官である。この高い生産性は、精子幹細胞システムの存在によって支えられていると考えられる。

精巣内にコンパクトに折り畳まれた精細管の基底膜上には、未分化型精原細胞（以下、Aundiff）と呼ばれる細胞集団が存在する。この細胞群は、幹細胞能を有することが実験的に示されている最小の集団であった。形態的に Aundiff は、単独で存在する A single (As)、2 個連結した A paired (Apr)、4 個以上の細胞が連結した A aligned (Aal) に分類される。これまで、細胞の形態に基づいた観察から、As が唯一の幹細胞であるというモデルが提唱されてきたが、時間を超えた細胞系譜の解析に基づく同モデルの検証が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、マウス生体内で精子の幹細胞としてふるまう細胞群を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、細胞運命を組織非侵襲的に追跡する方法として *in vivo* ライブイメージングおよびパルスラベル法を用いた。

これらの研究方法の一部は、当初の計画と異なるものであった。以下に方法を変更した理由を述べる。

多くの先行研究において、最も幹細胞としての可能性が高い細胞種は、全ての As、もしくは As の亜集団であることが想定されてきた。本研究計画も当初は、As の亜集団が幹細胞であることを想定した実験計画を立案していた。しかし、2010~2011 年に最初の実験として取り組んだライブイメージングによ

って、As のみが幹細胞として機能することは考えにくく、むしろ As に加えて合胞体である Apr と Aal をまとめた細胞集団がまとまって幹細胞として働くという新仮説が浮かび上がった（詳細は研究成果の項に記載）。よって、2011 年以降、当初の計画を変更し、As、Apr、そして Aal を含む集団全ての細胞運命を追跡する実験系である GFR α 1 発現細胞のパルスラベル法を用いてこれらの細胞集団が幹細胞として機能するか否かの実験的検証を行うこととした。

4. 研究成果

2010~2011 年、*in vivo* ライブイメージング法を用いて、幹細胞候補と考えられた GFR α 1 を発現する As が、細胞分裂時の不完全分裂によって娘細胞同士が細胞間橋で連結した Apr や Aal と呼ばれる合胞体構造になること、そして失われた As は合胞体 (Apr および Aal) の細胞間橋の断片化によって新たに補われることを明らかにした。以上の結果は、形態的に不均一な GFR α 1+ As、Apr、Aal が分裂に伴う合胞体の伸長と断片化を繰り返しながら集団として維持される可能性を示唆するものであった。しかし、技術的な限界から、ライブイメージングは個々の細胞を 2-3 日間しか連続観察することができず、同法だけでは長期間の幹細胞機能の実験的検証は不可能であった。これを克服するため、2011 年度に GFR α 1+ As、Apr、Aal 集団を標識し、その運命を追跡する系を確立した（パルスラベル法）。2011~2012 年度においては、同法を利用して、GFR α 1+ As、Apr、Aal 集団が、長期間の精子形成を支える幹細胞集団であるか否かを検証した。その結果、同細胞集団は、1 年以上の間、自己の数を一定に保ちながら、精子生産を継続する集団であることが示された。以上の 3 年間の結果から、マウ

スの精子幹細胞は、GFR α 1 遺伝子を発現した As、Apr、Aal によって構成される細胞集団であるという結論を下すに至った。よって、精子形成を支える幹細胞の特定という当初の研究目的を達成することができたと考えている。

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3件)

1. Uemura M, Ozawa A, Nagata T, Kurasawa K, Tsunekawa N, Nobuhisa I, Taga T, Hara K, Kudo A, Kawakami H, Saijoh Y, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M and Kanai Y. Sox17 haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice. *Development* 140: 639-648, (2013)
2. Koyanagi S, Hamasaki H, Sakiguchi S, Hara K, Ishii Y, Kyuwa S and Yoshikawa Y. Effects of ubiquitin C-terminal hydrolase -L1 deficiency on mouse ova. *Reproduction* 143(3): 271-279, (2012)
3. Sato T, Aiyama Y, Ishii-Inagaki M, Hara K, Tsunekawa N, Harikae K, Uemura-Kamata M, Shinomura M, Zhu XB, Maeda S, Kuwahara-Otani S, Kudo A, Kawakami H, Kanai-Azuma M, Fujiwara M, Miyamae Y, Yoshida S, Seki M, Kurohmaru M and Kanai Y. Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of sertoli cells in mouse and hamster testes. *PLoS ONE* 6(12): e28367 (2011)

[学会発表] (計7件)

1. 原健士朗、吉田松生. マウス精巣におけ

る幹細胞のふるまい, 獣医解剖学会(招待講演), 2013/3/29, 東京大学(東京都)

2. Hara K, Yoshida S. Population Asymmetric Self-renewal of GFR α 1-expressing Stem Cells Supports Steady-state Spermatogenesis in Mouse Testis. 2012 0 Cold spring harbor laboratory Meeting on Germ Cells, 2012/10/2-6, NY, USA.

3. Hara K, Yoshida S. Direct observation of the behaviors of undifferentiated spermatogonia in mouse testis, ISSCR 10th annual meeting, 2012/6/16, Pacifico Yokohama (神奈川県)

4. Hara K, Yoshida S. Identification of behaviors of GFR α -expressing Asingle spermatogonia in mouse spermatogenic stem cell system. 1st NIBB-Princeton meeting "Proteomics, Matabolomics, and Beyond", 2011/11/1-2, Okazaki conference center (愛知県)

5. 原健士朗 吉田松生 マウス未分化型精原細胞群の振る舞いを明らかにし, 新たな精子幹細胞モデルの構築を目指す. 第104回繁殖生物学会, 2011/9/16, アイーナ(岩手県)

6. 原健士朗、稲田加奈、榎本秀樹、吉田松生. 成体マウス精巣における GFR α 1 を発現する Asingle 型精原細胞の移動について. 第44回日本発生生物学会, 2011/5/20, 沖縄コンベンションセンター(沖縄)

7. Hara K, Yoshida S. Active Migration of the GFR α 1-Expressing Asingle Spermatogonia in Mouse Seminiferous Tubules. 2010 Cold spring harbor laboratory Germ cell meeting 2010/10/5-8, NY, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原健士郎 (HARA KENSHIRO)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教

研究者番号：60551546

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者