

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700436

研究課題名(和文)末梢血由来幹細胞を用いた造精機能障害新規治療方法の開発

研究課題名(英文) Reconstitution of the mouse spermatogonial progenitor cells from peripheral blood stem cells.

研究代表者

本杉 奈美 (MOTOSUGI, Nami)

東海大学・実験動物センター・特定研究員

研究者番号：70465251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：採取が容易なマウス末梢血から分離した単核細胞の培養に様々な因子を添加し、得られた細胞を雄性生殖器へ移植することにより、雄性幹細胞様細胞の作成を試みた。GFP陽性マウス末梢血由来単核細胞に、様々な因子を添加した培地を用いて細胞培養試験を行い、生存率、増殖能の検討および最適条件の探索を行った。また培養によって得られた細胞は、薬剤投与により内在性の精子幹細胞を除去した雄マウスの精巣および皮下に移植し、その増殖、分化を観察した。安定した細胞培養系は確立できなかったが、細胞移植では、基底膜と間質細胞にGFP陽性を示す細胞が観察された。また皮下移植では腫瘍が得られ、上皮細胞、間葉系細胞などを含んでいた。

研究成果の概要(英文)：Some transgenic mice show male infertility, thus such strains have been limited for large-scale analyses. Recent studies have reported that the inclusion of monoclonal mouse anti-human HLA class II antigen to well-established culture conditions, mononuclear cells obtained from peripheral blood cells are converted into undifferentiated stem cells. The objective of this study is to investigate the differentiation potential of mouse peripheral blood cells into spermatogonial progenitor cells. We study the optimal culture condition to establish undifferentiated cells that mononuclear cell are cultured in alpha-MEM with monoclonal mouse anti-human HLA class II antigen and some factors. The cultured cells are transferred into immunodeficient mice to confirm the undifferentiated stem cells. After transplantation in vivo, the GFP-positive cells were observed at the basement lamina and stromal cells. Also the teratoma was formed which was contained mesoderm and endoderm.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：遺伝子改変マウス 雄性不妊 系統維持

### 1. 研究開始当初の背景

特定の遺伝子の機能を解析するのに必要不可欠なトランスジェニックマウスなどの遺伝子改変マウスは、各種疾患のモデル動物として医学・医療分野あるいは生命科学分野の研究にも必須な存在である。また作出された遺伝子改変マウスの解析には長期間を要するため、系統を維持するための繁殖が必要となる。しかし、日本人に多く、また難治性疾患克服研究事業の対象であるA群色素性乾皮症(XPA)のモデルとなるXPA遺伝子欠損マウスや、第1腰椎が頭側にある第13胸椎のように変化して本来生じない肋骨が生じることを示すHoxA10遺伝子欠損マウス、肥満・糖尿病の病態における脂肪分解の役割を明らかにするために作出されたホルモン感受性リパーゼ(Hormone Sensitive Lipase; HSL)欠損マウスなど、近年、ヒト疾患モデルとして作製された遺伝子改変マウスにて、造精機能障害による雄性不妊を示すことが多く報告されており、そのような系統を維持することは難しい。

雄性不妊の原因は、精子の形成や成熟ができない造精機能障害、精子の輸送経路が障害されている精路通過障害などがあり、特に造精機能障害は雄性不妊の原因全体で70~80%を占めるといわれているにも関わらず大半は未だ原因不明である。また生殖工学技術で最も研究の進んでいるマウスでは、始原生殖細胞、胚性幹細胞、人工多能性細胞から精子幹細胞、雄性生殖細胞への分化過程や分化誘導の研究により、先天性疾患の解明、不妊症の原因解明、さらに系統維持には、人工授精、体外受精および顕微授精等の技術が利用されているが、それらは造精機能障害の根本的な解決にはならず、有効な治療方法は確立されていない。

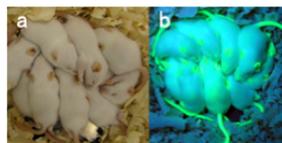
そこで本研究では、採取が容易なマウス末梢血から分離した単核細胞に様々な因子を添加しての培養、得られた培養細胞を雄性生殖器へ移植することにより、雄性幹細胞様細胞の作成を試みた。

### 2. 研究の目的

近年、ヒト疾患モデルとして作製された遺伝子改変マウスにて、造精機能障害による雄性不妊を示すことが多く報告されている。このようなマウスでは系統維持が不可能となるが、有効な解決方法は確立されていない。そこでマウスを用いて、採取が容易な末梢血から精子幹細胞の樹立を試み、さらには雄性生殖細胞へ分化誘導する至適条件を探索し、造精機能の回復も目指す。本研究で得られる知見は、がんや精巣腫瘍の化学療法後の造精機能の回復や、幹細胞や生殖細胞の分子メカニズムの解明、分化誘導後の細胞を用いた創薬のための薬理、毒性試験への利用、不妊治療への応用などに大きく貢献できると期待される。

### 3. 研究の方法

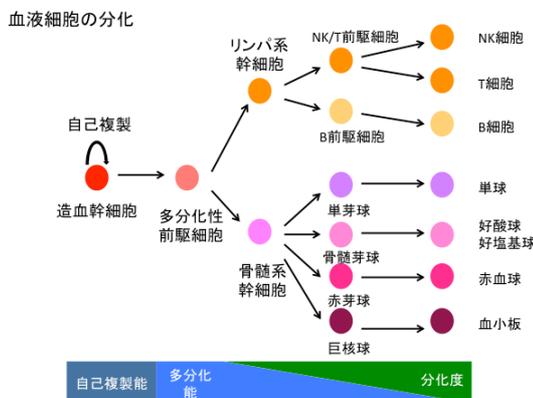
本実験で末梢血の採取に使用するマウスは、培養細胞の観察や細胞移植後の動態を追跡しやすくし、再現性がよく、客観的に評価できる方法の確立のために、緑色蛍光蛋白質GFP遺伝子が組み込まれたマウスを使用した。マウスから採取した全血は、密度1.077g/mlに調整されたポリスクロースとジアトリゾ酸ナトリウムを含む溶液と重層し、遠心処理により単核細胞を分離した。分離した単核細胞は、FACSでGFP陽性細胞の割合を測定し、約90%でGFPの発現が認められた。



a. 明視野 b. 暗視野

#### 1) 各因子を添加した末梢血由来単核細胞の培養

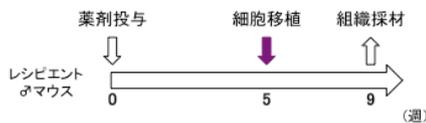
採取が容易な末梢血から単核細胞を分離し、抗MHCクラスII抗体で処理することでES細胞様幹細胞の樹立や、ES細胞からエピプラスト様幹細胞を経て生殖細胞への分化誘導実験などの報告を元に、マウスでも同様に末梢血より雄性幹細胞様細胞を樹立することが出来るのか試みた。10%FBS添加αMEM培地に抗マウスMHCクラスII抗体(3.5μg/ml)、分化抑制作用のある白血病抑制因子であるLIF(10<sup>7</sup>U/ml)、精子形成の促進をするアクチビン(20ng/mL)、細胞の成長と増殖の調節に重要なEGF(100ng/mL)などの因子を添加し、培養実験を3回繰り返して行った。培養細胞の計測は、5日ごとに各ウェル(3ウェル/培養条件)から細胞浮遊液を調整し、実験動物用血球分析装置を用いて行った。MHCクラスII抗原は、樹状細胞、単球・マクロファージおよびB細胞などの抗原提示細胞、胸腺上皮細胞、造血系前駆細胞の一部に発現している。



## 2) 培養単核細胞の精巣への移植による多分化能解析

マウスでは、薬剤投与により雄性生殖器内の精子幹細胞の除去が可能であり、再現性と効率の高い細胞移植方法が確立されている。そこで、腹腔内への Busulfan 投与 (40mg/kg) により内在性の精子幹細胞が除去されたレシピエントマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) の精巣に、各因子を添加して 30 日間培養した細胞を移植した。細胞移植は、薬剤処理後 5 週間目に、精子形成が行われる精細管、精巣網、輸精管から調整した細胞浮遊液 ( $1 \times 10^8$  cell/ml) を精巣一個あたり  $20 \mu\text{l}$  注入した。細胞移植後 4 週間目に摘出した精巣は、4% PFA で固定後にパラフィン包埋切片を作成し、抗 GFP 抗体および HE での染色により、移植した細胞が精巣内のどこへ、どのように生着しているか観察を行った。

### 細胞移植スケジュール



## 3) 培養単核細胞の皮下への移植による多分化能解析

末梢血から回収した単核細胞は各因子を添加して 30 日間培養したのち、細胞濃度を  $2 \times 10^7$  cell/ml に調整した細胞浮遊液とマトリゲルを 1 : 2 で懸濁し、マウス皮下 (5 匹/実験区、2 カ所/1 匹、 $100 \mu\text{l}$ /1 カ所) へ注入した。皮下への細胞移植後 4 週間目に形成された腫瘍を摘出し、4%PFA で固定後にパラフィン包埋切片を作成し、抗 GFP 抗体および HE での染色により、腫瘍を構成する組織を観察した。

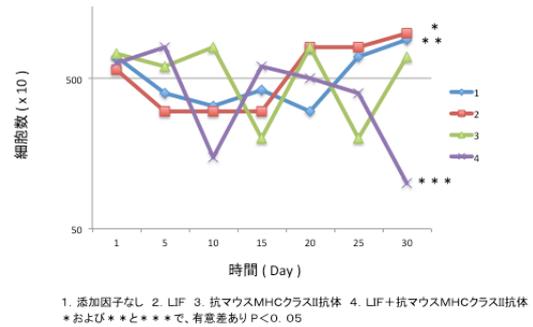
## 4. 研究成果

### 1) 各因子を添加した末梢血由来単核細胞の培養

GFP 陽性マウスから採取した末梢血より単核細胞を分離し、10%FBS 添加 DMEM 培地、胚性幹細胞 (ES 細胞) 培養培地、10%FBS 添加  $\alpha$  MEM 培地、10%FBS 添加 RPMI1640 培地を用い、さらに様々な因子を加えた培地での細胞増殖試験を行い、生存率および増殖能の検討を行った結果、EGF、アクチビンを添加して培養したグループでは細胞数は徐々に減少し、20 日目以降で測定が出来なくなったが、LIF を添加して培養したグループは、培養期間 30 日で、LIF + 抗マウス MHC クラス II 抗体を添加したグループとの間に有意差がみられ、長期培養期間で単核細胞の増加が観察された。また抗マウス MHC クラス II 抗体を

添加して培養したグループでは、同じ培地条件での培養を 3 回繰り返して行ったが安定した細胞培養系は確立できず、培養の再現性は乏しかった。今後、培養で得られた細胞の分化段階の評価を、形態及び分化マーカーである細胞表面抗原の発現により行う。

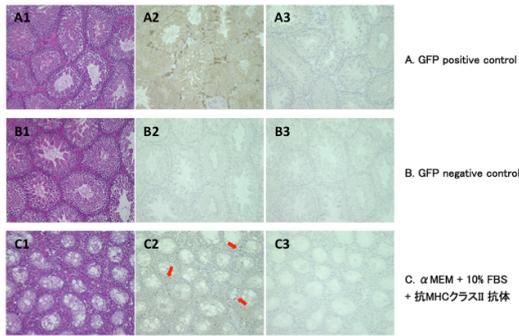
### 各因子を添加した末梢血由来単核細胞の培養



## 2) 培養単核細胞の精巣への移植による多分化能解析

腹腔内への Busulfan 投与により内在性の精子幹細胞が除去されたレシピエントマウスの精巣に、各因子を添加して 30 日間培養した細胞を精巣へ移植した。細胞移植は、薬剤処理後 5 週間目に、精子形成が行われる精細管から調整した細胞浮遊液を注入し、さらに 4 週間後に精巣を採材した。観察を容易にするため GFP 陽性マウスを使用したのだが、作成した凍結切片では、その発現が微弱なためか蛍光顕微鏡下で観察することはできなかった。そこで細胞移植後 4 週間目に摘出した精巣は、4%PFA で固定後にパラフィン包埋切片を作成し、抗 GFP 抗体および HE での染色により、移植した細胞が精巣内のどこへ、どのように生着しているか観察を行った。その結果、すべてのグループ、特に抗マウス MHC クラス II 抗体を添加して培養した細胞を移植したグループで、基底膜と間質細胞に GFP 陽性を示す細胞が観察された。精細胞は基底膜上に見られる精祖細胞から、成熟していくにつれ管腔側に移動していくので、移植した細胞が精細管壁に沿って増殖することを期待したが、基底膜およびその周辺領域以外では、GFP 陽性を示す細胞は認められなかった。今後、組織を採材する時期の間隔を延長し、移植した細胞が管腔内に向かって分化していくか観察する。精原細胞は、雄性ホルモンであるテストステロン濃度が低いと増殖能が高いことから、Busulfan 投与後のマウス精巣のテストステロン濃度を時間分解蛍光法で測定する。テストステロン濃度が高い場合は、その産生能を低下させる” gonadotropin-releasing hormone analogue” (GnRH analogue) の投与も検討する。

雄性生殖器官への細胞移植

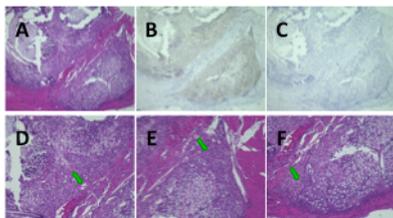


3) 培養単核細胞の皮下への移植による多分化能解析

細胞移植後のテラトーマ形成能は、多分化能を示す細胞の同定法として認識されており、ES細胞やiPS細胞のような多分化能を有する万能性細胞をマウス皮下に移植すると、内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉由来の組織を含む腫瘍が形成され、軟骨・平滑筋・粘液腺・呼吸器・消化器・神経組織などの構造が見られることが知られている。

そこで各因子を添加して30日間培養した細胞とマトリゲルで細胞懸濁液を調整し、マウス皮下へ移植した結果、αMEM + 10% FBS + LIF の条件で培養した細胞を移植したマウスで腫瘍が得られた。得られた腫瘍は、上皮細胞(内胚葉)、間葉系細胞(中胚葉)などを含んでいた。

皮下移植で得られた腫瘍の染色像



A. D-F. ヘマトキシリン・エオジン(HE) B. 抗GFP抗体 C. IgG抗体  
A-C. x10 D-F. x20

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① 本杉 奈美 雄性不妊を呈するヒト疾患モデルマウスでの造精機能回復の試み  
第36回日本分子生物学会  
2013年12月5日 神戸ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本杉 奈美 ( MOTOSUGI Nami )  
東海大学・実験動物センター・特定研究員

研究者番号：70465251