

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770216

研究課題名(和文) 器官培養法を用いたマウス精子形成に必要な液性因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of essential growth factors for mouse spermatogenesis using organ culture method.

研究代表者

佐藤 卓也 (SATO, Takuya)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：70599505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、精子形成不全モデルマウスの精巣に対し器官培養法を用いることで、遺伝子操作を加えることなく、不妊を治療することを試みた。不妊モデルマウスSl/Sldマウスは、c-Kit ligand (Kitl)の機能不全により、精巣内にわずかな精原細胞が生存するのみで、精子形成が進行しないマウスである。Sl/Sldの精巣をKITLとCSF-1を培地に追加し器官培養すると、精子形成が進行し精子まで分化することを見いだした。また、CSF-1が精子形成に関与することが示唆されたため、その詳細な役割を調べるため、CSF-1受容体ノックアウトマウスの精子幹細胞移植実験を行った。

研究成果の概要(英文)：In the present study, using a testis tissue culture method, we challenged to treat a spermatogenic defect mutant without any genetic manipulations. The Sl/Sld mouse has only a few primitive spermatogonia as germ cells in the testis, lacking any sign of spermatogenesis, due to mutations of the c-Kit ligand gene (Kitl) which cause the loss of membrane-bound-type KITL from the surface of Sertoli cells. We succeeded in inducing the complete spermatogenesis of Sl/Sld mutant mice by culturing their testis tissues in culture media containing KITL and colony stimulating factor-1 (CSF-1). To elucidate the mechanism of CSF-1's effect on spermatogenesis, we performed transplantation experiment of spermatogonial stem cells derived from CSF-1 receptor knock out mouse.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：精子形成 器官培養 精子幹細胞 男性不妊 Stem cell factor

1. 研究開始当初の背景

哺乳類における精子形成機構の分子レベルでの詳細は、今なお未解明の領域である。最近、我々は、器官培養法で、新生仔マウスの精巣中の精原細胞から精子形成を進行させ、*in vitro* で妊孕能のある精子を得ることに、哺乳類では初めて成功した。それは気相液相境界面培養法に準じた方法で、新生児マウスの精巣組織片を培養液に半分を浸したアガロースゲルにのせ培養する簡便な方法である。それにより、生体外で精子形成過程を解析することが可能となった。例えば精子形成を促進あるいは抑制する因子を培地に加え評価するような実験が、容易に行えるようになることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、不妊モデルマウス (SI/SId マウス) の精巣を器官培養することで、培養下で不妊症を治療し、不妊モデルマウスの精子幹細胞から精子を産生する方法を開発することを目的とする。さらに、この不妊モデルマウス精巣の培養系を用いて、精子形成に必要な液性因子の探索をおこなう。

3. 研究の方法

精巣において Kit ligand (KitL) は、セルトリ細胞によって産生・供給される一方で、そのレセプターである c-Kit は、A 型精原細胞から精母細胞のパキテン期まで発現が認められる精子形成の進行に必須の成長因子である。不妊モデルマウス SI/SId マウスは、KitL の機能不全により、精巣内にわずかな精原細胞が生存するのみで、精子形成が全く進行しないマウスである。SI/SId マウスの精巣組織片を器官培養し、精子形成を誘導する培養条件を検討した。さらに、その培養法を用いることで、精子形成の進行に影響する成長因子を探索した。

4. 研究成果

SI/SId マウス (4.5 ~ 11.5dpp) の精巣を、aMEM+10%KSR 培地で器官培養し、培養開始 43 日後に PAS 染色をおこなった。精細管内はセルトリ細胞とわずかな精原細胞のみであり、精子形成の兆候は見られなかった。次に、soluble factor である recombinant KitL (rKitL) を添加した培地で SI/SId の仔マウスの精巣を器官培養した。50ng/ml を加えた培地では、精子形成は認められなかったが、驚いたことに rKitL 100ng/ml を添加した培地では、精母細胞と少数の円形精子細胞が観察された (図 1)。

この結果は、精子形成においては、多量の rKitL (sKitL) が膜結合型 KitL の機能を補うことが出来る事を示唆した。さらに KitL の濃度を上げて培養したところ、500ng/ml では、精母細胞および円形精子細胞を含む精細管は、精巣組織中の全体の精細管当たり、それぞれ 3.1% から 4.0% と 0.1% から 0.4% に上昇し、

それらの出現頻度は、KitL の濃度依存的に上昇する傾向が見られた (図 1)。

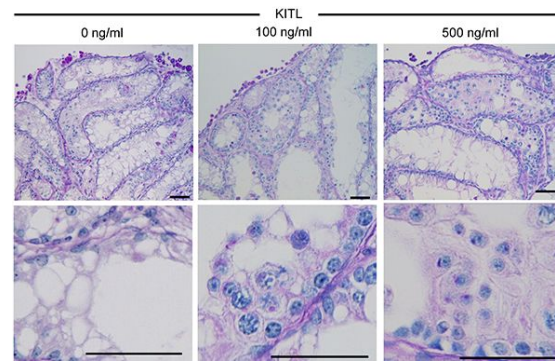


図 1: 器官培養した 10.5 日齢の SI/SId マウスの精巣を PAS 染色した組織像。左から 0ng/ml, 100ng/ml, 500ng/ml の KitL を添加した培地で 43 日間培養した精巣組織。

SI/SId マウスの精母細胞および円形精子細胞の産生効率と KitL の添加量との間には、比例関係が見られ、より高濃度の KitL を添加すれば、さらなる効率の向上も見込まれた。しかし、KitL の濃度を 500ng/ml まで上げて、産生される円形精子細胞の数はわずかで、しかも伸長精子細胞や精子は見られなかった。そこで、我々は KitL には、他の成長因子とのシナジー効果があることに注目した。血球系の細胞の増殖・分化・生存に対する KitL の効果は、他のサイトカインと組み合わせることによって、相乗的に増大することが知られている。それらのサイトカインとしては、Colony stimulating factor-1, -2, -3 (CSF-1, CSF-2, CSF-3), Interleukin-3 (IL-3), Erythropoietin (EPO) などがある。それらを KitL と一緒に添加して培養し、精子形成への効果を検討した。その結果、CSF-1 (別名 macrophage colony stimulating factor) を KitL と一緒に添加した場合には、精母細胞と円形精子細胞の出現頻度が、11.2%, 2.1% にそれぞれ上昇しただけでなく、伸長精細胞が 0.7% の tubule で産生されるようになった (図 2)。その時の精細管内の精子形成細胞の密度も、KitL のみの時に比べ高い傾向があった。CSF-3 または EPO を KitL と組み合わせて培養した場合は、逆に精母細胞や円形精子細胞の出現頻度は減少した。また、CSF-2 (別名 Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) または IL-3 を KitL と組み合わせて培養した場合は、まったく精子形成は見られなかった。

さらに CSF-1 の KitL 効果の増強作用をより定量的に確認するために、培養した SI/SId の精巣組織から細胞を分離し、フローサイトメトリーで半数体の細胞数を調べた。無添加条件では、2N が 93.4% と大部分を占めており、4N の割合は 4.1% だった。それに対して、

KitL や KitL+CSF-1 を加えて培養した場合の 4N の割合は、それぞれ 15.7%、17.1%、に増加し、コントロールのアダルト精巢の状況 (23.6%) に近づいていた。このことは、KitL と KitL+CSF-1 が精原細胞の分化増殖を促進し、精母細胞となり減数分裂に入ったことに対応していると思われる。ここで注目すべき点は、KitL だけでは、減数分裂への誘導はされているが、半数体形成に関しては、十分ではないという点である。3 回の FACS 実験の平均値では、KitL だけで SI/Sld の精巢を培養した時は、1N 細胞は 0.2% であり、無添加 (コントロール) と差が無かった。一方、KitL+CSF-1 を加えた場合は、半数体の割合は 1.9% に増加し、半数体細胞の産生が有意に増加した。この結果は、これまでの結果と一致し、CSF-1 が KitL の効果を増強し、SI/Sld の半数体産生を促進する機能を持つことを支持している。

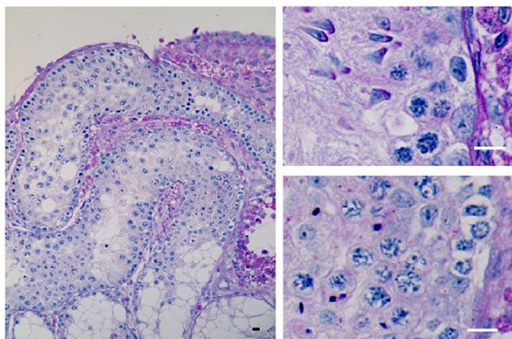


図 2: 器官培養した SI/Sld マウスの精巢を PAS 染色した組織像。10.5dpp の SI/Sld マウスの精巢を KitL (100ng/ml) と CSF-1 (20ng/ml) を添加した培地で 43 日間培養した。

得られた精子細胞の妊孕能を調べるために、顕微授精をおこなった。6.5 ~ 9.5dpp の SI/Sld マウス精巢を培養し、得られた円形精子細胞と精子で round spermatid injection (ROSI) および intracytoplasmic sperm injection (ICSI) を行った。49 日間培養した組織から得られた円形精子細胞を 27 個の oocyte に ROSI を行ったところ、1 匹のメスの産仔を得ることに成功した (図 3A)。その産仔は正常に育ち、SI/+ や Sld/+ の特徴である、腹部正中の体毛に淡い白線が見られた (図 3B)。顕微授精は、B6D2F1 の oocyte に対し行ったので、産仔の遺伝子型は、SI/+ か Sld/+ のどちらかである。SI/+ と Sld/+ を識別できる PCR を行ったところ、産仔は Sld/+ であることが判明した (図 3C)。また、この産仔の生殖能は正常で、自然交配で出産し、その次世代も健康に育った (図 3D)。以上の結果から、SI/Sld マウス精巢から、in vitro において機能的な半数体が産生され得ることが明らかとなった。

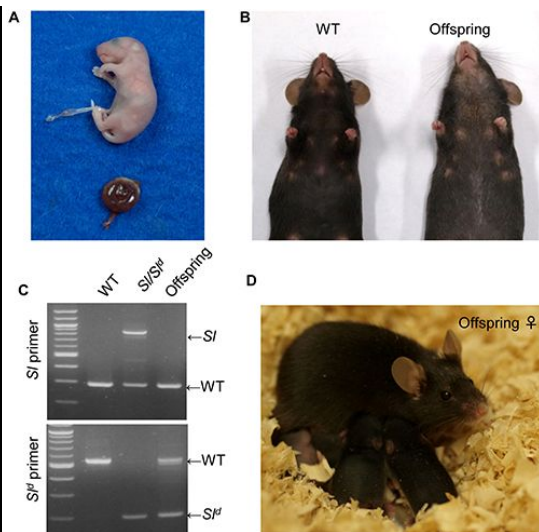


図 3: SI/Sld マウスの精子からの産仔獲得。A: SI/Sld マウス由来の産仔。SI/Sld マウスの精巢を KitL+CSF-1 を含む培地で 49 日間培養し、得られた円形精子細胞を ROSI し、得られた。B: ROSI により得られた産仔と野生型のマウスの体毛色の違い。C: ROSI により得られた産仔の PCR による genotyping。SI primer set は、294bp (野生型) と 839bp (SI gene) のバンドが検出される。Sld primer set は、206bp (Sld gene) と 540bp (野生型) のバンドが検出される。左のレーンは 100bp ラダー。D: 産仔 (雌) は wild type 雄と自然交配し、出産した。授乳する産仔とその仔マウスたち。

これらの結果は、精巢内環境異常により精子形成不全となっている不妊症の場合には、その精巢組織を適切な条件で培養することにより、精子産生できる可能性があることを意味している。現段階では、ヒトの精巢組織の培養自体が難しいため、この技術をそのままヒトへ適用することはできないが、将来的な不妊治療への道筋を示したことは、非常に意義深いものと考えられる。

一方、以上の研究過程で、CSF-1 が精子形成に關与する可能性が示唆された。それに加え CSF-1 欠損マウス op/op マウスや CSF1 レセプター (CSF1R) ノックアウトマウスにおいて、精子産生が減少するとの報告が過去にあったことから、CSF1 シグナルが精子形成へ關与することが強く示唆された。そこで、CSF1R ノックアウトマウスを入手し、CSF1 シグナルが、生殖系列細胞に直接働きかけるのか、あるいは間接的に近傍の体細胞へ働きかけることにより間接的に精子形成に影響を及ぼすのかどうかを調べた。そのために CSF1R ノックアウトマウスを全身性に GFP を発現するグリーンマウスを交配実験し、GFP ラベルした CSF1R ノックアウトマウスを得た。そのマウスから精子幹細胞株を樹立し、それらの細胞株を正常なマウスへ精細管内移植

し、移植された CSF1R ノックアウトマウス由来の精子形成がどのように変化するか調べた。その結果は、現在も解析中である。

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 10件)

佐藤卓也・横西哲広・小川毅彦 精子幹細胞と精子形成: *ex vivo* culture の可能性 実験医学 Vol.32 No.6 859-864 2014 (査読無)

Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Ogawa T. In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. 927, 479-488. 2013 (査読無)

Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Komeya M, Kubota Y, Ogawa T. In vitro reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation. *Biol Reprod.* 89, 1-6. 2013 (査読有)

DOI: 10.1095/biolreprod.113.108613

Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Ogawa T. In vitro sperm production from murine spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. *Nature protoc.* 8, 2098-2104. 2013 (査読有)

DOI:10.1038/nprot.2013.138

DOI: 10.1007/978-1-62703-038-0_41

Shiura H, Ikeda R, Lee J, Sato T, Ogonuki N, Hirose M, Ogura A, Ogawa T, Abe K. Generation of a novel germline stem cell line expressing a germline-specific reporter in the mouse. *Genesis* 26, 1-8. 2013 (査読有)

DOI: 10.1002/dvg.22391

佐藤卓也・小川毅彦 目で見る生殖幹細胞 - 精子幹細胞 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY Vol.20 No.3 4-7 2013 (査読無)

佐藤卓也・小川毅彦 新生仔マウス精巣からの試験管内精子産生 BIO Clinica vol. 28 80-84 2013 (査読無)

横西哲広・古目谷暢・佐藤卓也・小川毅彦 精巣組織の凍結 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY Vol.20 No.2 169-175 2013 (査読無)

佐藤卓也・小川毅彦 精子形成不全マウスの精巣組織から培養下での精子産生細胞工学 Vol.32 No.2 212-213 2013 (査読無)

Sato T, Yokonishi T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Matoba S, Ogonuki N, Ogura A, Yoshida S, Ogawa T. Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 16934-16938. 2012 (査読有)

DOI: 10.1073/pnas.1211845109.

[学会発表](計 2件)

— 佐藤卓也・他 9 名、器官培養法をもちいた c-Kit ligand 変異不妊マウスの精子形成誘導、日本分子生物学会年会、福岡、2013 年 12 月 12 日

— Sato T., Katagiri K., Yokonishi T., Komeya M., Kubota Y., Ogawa In vitro spermatogenesis in cultured adult mouse testes. The 46th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Montreal, Canada, 2013 年 7 月 23 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 卓也 (SATO, Takuya)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号: 70599505

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: