

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650108

研究課題名(和文) in vitro 3次元培養系によるマウス精巣の再構築

研究課題名(英文) Reconstruction of mouse testis by in vitro 3-D culture

研究代表者

安部 眞一 (Abe, Shin-ichi)

熊本大学・事務局・理事・副学長

研究者番号：90109637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウス生後精巣の再凝集3次元培養系にKnockout Serum Replacement (KSR)を加えると、精巣構造のほぼ完全な再構築に成功したので、そのメカニズムを解明することを目的とした。阻害剤等の効果から、筋様細胞の伸長と精巣索様構造の周りへの正常な分布にはDesert hedgehogシグナリングが、また精細管様構造の形成にはTGFbeta family受容体の1種であるAlk5シグナリングが関わっていることが示唆された。また、セルトリ細胞特異的にEGFPを発現するtransgenic mouse精巣を用いて再凝集過程を観察したところ、セルトリ細胞の動的な挙動が観察された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the mechanism underlying the reconstruction of seminiferous tubule-like structure, using 3-D culture system that we have successfully established. Addition of an inhibitor of Alk5 which is a receptor of TGFbeta super family, to the culture medium supplemented with Knockout Serum Replacement (KSR) inhibited the reconstruction of seminiferous tubule-like structure. Also Cyclopamine, an inhibitor of Desert hedgehog (Dhh) signaling, suppressed elongation and normal distribution of peritubular myoid cells around seminiferous cord-like structure. These results indicate that Alk5 and Dhh signalings play important roles in the reconstruction of seminiferous tubule-like structure. Observation of the behavior of live Sertoli cells (SCs) expressing GFP in the 3-D culture showed dynamic behavior of SCs.

研究分野：生物学

キーワード：細胞・組織 発生・分化 精巣 セルトリ細胞 再構築 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精巣は、チューブ状の精細管とその外側の間組織から成る。精細管は生殖細胞とその増殖や分化を助けるセルトリ細胞から成り、精細管の外側を基底膜、その外側を筋様細胞が取り巻いている。間組織はホルモン産生のライディッヒ細胞や血管等から成る。

この精巣形成のメカニズムを調べるために、多くの研究者が胚や生後の精巣の培養を行い、*in vitro* で精巣再構築を試みてきた(Gassei and Schlatt, 2007)。プラスチック培養皿でラットセルトリ細胞を培養すると、扁平な形になってしまうが、再構成基底膜(Matrigel)の中に埋め込んで培養すると、セルトリ細胞が密着結合で互いに結合する球状の精巣索へ分化する(Hadley et al., 1985; Gassei et al., 2010)。しかし、それ以上の形態形成や分化は起こらず、ヌードマウスの皮下に移植することによって初めて精細管構造と内腔の形成やセルトリ細胞の分化が見られる(Gassei et al., 2010)。

我々は、マウス生後精巣を解離、再凝集させ、コラーゲン内に包埋して培養し、FSH、レチノイン酸、あるいは neuregulin を加えると、精原細胞から精母細胞まで分化するという結果を報告した(Zhang et al., 2011)。一方、横浜市大の佐藤ら(2011)は、器官培養に Knockout Serum Replacement (KSR; 通常 ES 細胞の培養に添加される成分未発表の添加物)を加えると成熟精子まで分化する、という結果を報告した。そこで我々は、我々の培養系に KSR を加えて精巣が再構築できないか、また成熟精子が分化するかどうかを調べた結果、精巣構造のほぼ完全な再構築を達成したので、そのメカニズムを解明することとした。

2. 研究の目的

我々は、これまでに樹立した精巣の再構築系を改良して完全な精子分化を再現することを目指すとともに、現在のユニークな培養系を用いて、また特異的に蛍光タンパク質を発現する(transgenic mouse 由来の)セルトリ細胞を用いて、セルトリ細胞の sorting や極性化の機構、セルトリ細胞—筋様細胞間の相互作用、セルトリ細胞の伸長と分化機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 再凝集培養

生後 6 日目(6-dpp) ~10 日目(10-dpp)のマウス精巣をコラーゲナーゼとヒアルロニダーゼによって解離した後、旋回して再凝集し、コラーゲンや Matrigel に埋め込んで培養した。RPMI 培養液、34C、5% CO₂ を基本とし、10% KSR や FGF9, VEGF, HGF, PDGF 等の成長因子や阻害剤を添加した。

2) 抗体等を用いた阻害実験

セルトリ細胞凝集塊の外側にラミニンを分泌するようなセルトリ細胞の極性化のメカニズムを調べるため、integrin の抗体やペプチド等を加えた。

3) transgenic mouse 精巣の再構築

イ) Acrosin-GFP transgenic mouse を用いた再凝集培養

精細胞特異的に Acrosin-GFP を発現する transgenic mouse (Nakanishi et al., 1999)を用いて、培地、KSR 濃度、温度、酸素分圧、コラーゲンや Matrigel の濃度や量、等の諸条件を変えて、再凝集培養条件下で精細胞や成熟精子が分化する条件を検討した。

ロ) GFP を発現するセルトリ細胞を用いた

live imaging

岐阜大の秋山らが開発したセルトリ細胞特異的な Sox9 promoter の下流に EGFP を発現する transgenic mouse を用いて再凝集培養実験を行い、生きた細胞の挙動をレーザー蛍光顕微鏡で観察・録画した。

4 . 研究の成果

1) 培養条件の検討

野生型マウスを用いて KSR の 10% と 20% を添加して再凝集培養を行い、比較したが、1 週間後、どちらも精細管様構造が形成され、その状態はほとんど変わらなかった。

6-dpp の精巣を再凝集し、コラーゲン内と Matrigel 内に埋め込んで培養したところ、コラーゲンでは 3 日目で KSR の有無によって差が出たが、Matrigel では 3 日目までは KSR の有無によらず精巣索を再構築した。これは Matrigel には、コラーゲン以外にラミニンや少量の増殖因子が含まれているためと考えられた。

O₂ が無い条件では再凝集塊が大きくなると中心部分が死ぬが、O₂ を 40% 以上入れることによって細胞死を抑制できることが分かった。

2) いろいろなステージの精巣の再構築能

生後 2 週目 (精母細胞まで分化) ~ 4 週目 (精細胞まで分化) の精巣でも再構築ができるかどうかを検討した。4 週令の精巣では、KSR を加えても再構築はうまくいかなかったが、10 日 ~ 2 週令の精巣では再構築は成功した。

また、6-dpp と 10-dpp の精巣の再構築能を比較したところ、6-dpp では培養 3 日目、KSR 添加培地ではセルトリ細胞凝集塊が大きくなり索様構造を形成するが、control 培地では形成しない。これに対し、10-dpp 精巣では、control 培地でも 3 日目に索様構造を形成した。しか

し、1 週間後、KSR 培地では精細管様構造が明確に形成されるのに対し、control 培地では 5 日目までは精細管様構造が形成されるが、その後 7 日目になると崩壊した。このように 6-dpp と 10-dpp では再構築能や KSR 依存性に違いがあることが分かった。

3) Acrosin-GFP transgenic mouse を用いた精子分化の条件の探索

精細胞特異的に Acrosin-GFP を発現する transgenic mouse を用いて、培地、KSR 濃度、温度、酸素分圧、コラーゲンや Matrigel の濃度や量、等の諸条件を変えて、再凝集培養条件下で精細胞や成熟精子が分化する条件を検討した。いずれの条件でも KSR があれば、精母細胞までは容易に分化したが、精細胞はまれにしか見られなかった。減数分裂を完了するためにはさらに条件を検討する必要がある。

4) 種々の増殖因子等の効果

胚の生殖腺の器官培養において、FGF9, VEGF, HGF, PDGF 等が精巣索形成に関わることが報告されている (review; Gassei and Schlatt, 2007)。KSR 中の何がセルトリ細胞の sorting や極性の同一化、筋様細胞のセルトリ細胞凝集塊への付着・伸展やセルトリ細胞の伸長・分化機構に効いているのかを調べる手がかりを得るために、まず上記の成長因子の効果を調べた結果、いずれも単独、あるいは組み合わせても精細管様構造の形成は見られなかった。

5) 抗体等を用いた阻害実験

培地に KSR を入れると、セルトリ細胞の凝集塊の外側に integrin やラミニンを発現した。これは、セルトリ細胞が精巣索の外側に向けて並び、極性化することを意味する。そこで、極性化のしくみを調べるため、6-dpp 精巣の再凝集培養に、integrin の阻害剤である RGD ペ

プチド(1 mg/ml)や、ラミニンペプチド(YIGSR) (10ug/ml)、N-cadherin 抗体(40ug/ml) (いずれも再凝集塊内と培地の両方に入れた) による効果を調べたが、KSR による精巣索再構築能の阻害効果は見られなかった。

6) desert hedgehog (Dhh) シグナリングと Alk5 シグナリング

10-dpp の精巣の再凝集培養に、Dhh シグナリングの阻害剤である Cyclopamine を KSR 添加培地に投与すると、筋様細胞の伸長と精巣索様構造の周りへの正常な分布に対して阻害効果があることが示された。

また、TGFbeta family 受容体の 1 種である Alk5 の阻害剤(Alk5i)を KSR 添加培地に投与すると、精細管様構造の形成に対して阻害効果が示された。

これらの結果は、Dhh シグナリングと Alk5 シグナリングが、再凝集培養における精細管様構造の再構築に重要な働きをしていることを示唆する(論文準備中)。

7) GFP を発現するセルトリ細胞を用いた live imaging による解析

セルトリ細胞特異的な Sox9 promoter の下流に EGFP を発現するトランスジェニックマウスを用いて live imaging を行った。

その結果、KSR 存在下ではセルトリ細胞凝集塊がお互いに融合して拡大して行く様子が観察された。

8) 今後の展望

我々は、3次元培養系を確立し、KSR により精細管様構造が再構築することを明らかにした。生殖細胞の精子への分化に付いてはさらに条件検討を続ける必要があるが、体細胞による精巣の再構築については、TGFbeta 系や DHH 系のシグナリングが関わることを明らかにした。

今後は、KSR の精細管様構造再構築促進作用について調べるため、RNA sequencing 等によって詳しく解析を進める予定である。

主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Zhang J, Hatakeyama J, Eto K, Abe S.-I. 2014. Reconstruction of a seminiferous tubule-like structure in a 3 dimensional culture system of re-aggregated mouse neonatal testicular cells within a collagen matrix. **Gen Comp Endocrinol**, 205:121-32. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.03.030 査読有

Yamada S, Marutsuka M, Inoue M, Zhang J, Abe S.-I., Ishibashi K, Yamaguchi N, Eto K. 2014. The interaction of the ErbB4 intracellular domain p80 with a-enolase in the nuclei is associated with the inhibition of neuregulin1-dependent cell proliferation. **Int J Biochem Mol Biol**, 5(1):21-9. 査読有

Eto K, Shiotsuki M, Abe S.-I., 2013. Nociceptin induces Rec8 phosphorylation and meiosis in postnatal murine testes. **Endocrinology**, 154(8), 2891-2899. DOI: 10.1210/en.2012-1977 査読有

[学会発表] (計 11 件)

張継東、原田昌朋、押川弘毅、江頭恒、安部眞一 「再凝集マウス精巣細胞の 3 次元培養系による精細管様構造の再構築～collagen と matrigel の比較～」第 85 回日本動物学会(仙台) 2014 年 9 月 11 ~ 13 日

原田昌朋、張継東、畠山淳、江頭恒、安部眞一 「再凝集マウス精巣細胞の 3 次元培養系による精細管様構造の再構成 II～精母細胞ステージからの再凝集培養～」第 84 回日本動物

学会 (岡山) 2013 年 9 月 26 ~ 28 日

Abe, S.-I. et al. (2013) “Reconstruction of seminiferous tubule-like structure in 3-D culture system of re-aggregated mouse testicular cells in vitro.” **Invited speech** in the symposium “Molecular mechanisms of sex determination and differentiation”, The 17th Int Cong Comp Endocrinol (ICCE), July 15–19, Barcelona, Spain.

Zhang J, Hatakeyama J, Eto K, Abe S.-I.
Reconstruction of seminiferous tubule-like structure in 3-D culture system of re-aggregated mouse testicular cells in vitro. 第 46 回日本発生生物学会 (松江) 2013 年 5 月 28 ~ 31 日
他 7 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 真一 (ABE, Shin-ichi)

熊本大学・理事・副学長

研究者番号 : 9 0 1 0 9 6 3 7

(2) 研究協力者

張 継東(ZHANG, JiDong)

安部 和子(ABE, Kazuko)