

令和元年5月27日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11067

研究課題名(和文)1細胞RNAシーケンスを用いたヒト精子幹細胞ニッチの遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Gene expression analysis of human spermatogonial stem cell niche using single cell RNA-sequence

研究代表者

守時 良演 (MORITOKI, yoshinobu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50595395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：[停留精巣モデルマウスの開発]近年のげっ歯類の精子幹細胞研究は、ほとんどがマウスをモデルとして用いている。そのため、ヒト停留精巣の前に、マウスの停留精巣モデルでRNA-sequenceを行うこととした。最終的には経腹腔アプローチ若年の停留精巣を作成できた。これを用いて停留精巣の萎縮過程の精巣を用いた解析が可能になった。

[微量なmRNAの増幅]1細胞mRNAからcDNAを合成し増幅することを主に行ってきた。最終的に1細胞あたり20copy以上のmRNAは安定的に増幅可能となった。しかしRNA-sequenceを安定的に運用するには残念ながら至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト停留精巣では手術時の精子幹細胞数が、将来の妊孕性と相関している。しかし幼少期になぜ精子幹細胞数が著明に減少するかは明らかではない。私たちのグループはラット停留精巣モデルを開発したが、これまでは精巣全体での大規模解析に留まっている。その理由は、精子幹細胞が精巣の中で0.2～0.3%と非常に少なく、機能的な解析が極めて困難であるためである。精子幹細胞の研究は、妊孕性の改善など臨床に直結するにも関わらず、研究は遅れている。私たちは近年開発された1細胞RNA-seqを用いれば、サンプル量が限られるヒト精巣においても、精子幹細胞維持のメカニズムが解明できるのではないかと考えた。

研究成果の概要(英文)："Development of mouse model for undescended testes". We have established robust undescended testes model by rats. However, rodent model for spermatogonial stem cell research has been performed using mainly mice, not rats. Therefore, as a preliminary experiment before running RNA-sequence for human testis, we decided to perform RNA-sequence for mouse testis. We established robust mouse undescended testis model, not by hormonal deprivation, by surgical approach. Using this model, we will next perform molecular analysis of atrophic process of undescended testis.

"Amplification of tiny volume of mRNA". We have developed robust mRNAs amplification method in the laboratory. Finally we have amplified as small as 20 copies per cell of mRNAs. We next tried to run RNA-sequence, but have not yet established stable protocol.

研究分野：精子幹細胞

キーワード：精子幹細胞 RNA-sequence

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は、自己複製と分化を繰り返すことで、精子の生涯に渡る供給源として機能する組織幹細胞である。停留精巣では、早期(~2歳)に精巣固定術を施行したとしても、手術時に精子幹細胞数が低下している症例では、妊孕性も低下することが示されている。現時点ではそれらに対する術後の追加治療は存在せず、幹細胞の維持メカニズムの解明が求められる。

精子幹細胞数を維持・増殖させる因子として、げっ歯類では GDNF、FGF2、CSF-1 が知られ、それらは全て周囲の体細胞から傍分泌される。そのため、精子幹細胞の維持・増殖機構を解明するには、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞を含めた精子幹細胞ニッチを詳細に捉える必要がある。現在マウスを中心に、幹細胞ニッチの解析として live cell imaging、器官培養法などの報告がある。しかし、これらはいずれもあくまでニッチ内の精子幹細胞の動態に着目した研究であり、周囲の体細胞に着目した詳細な研究はほとんどされていない。

2. 研究の目的

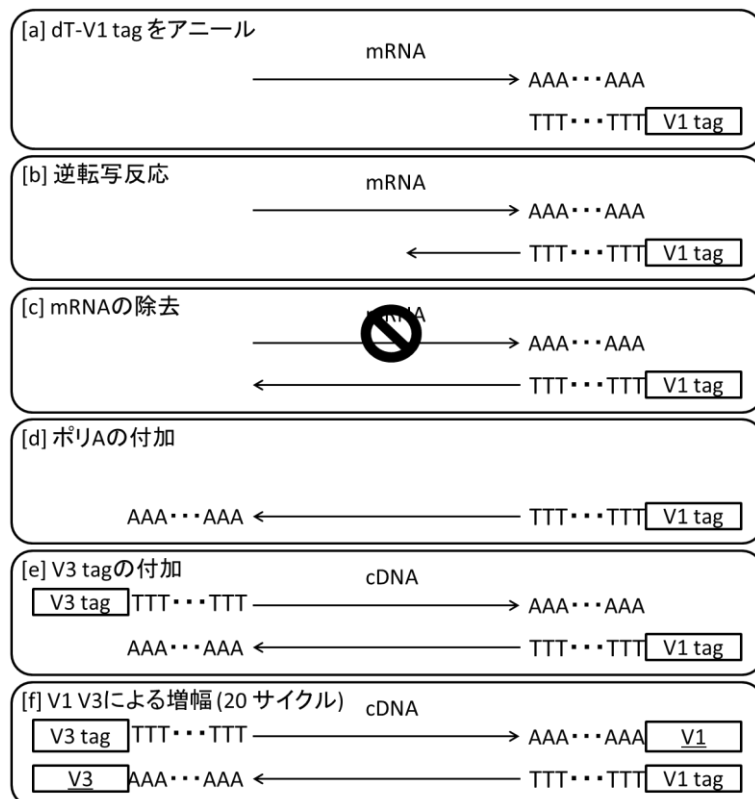
ヒト停留精巣では、高温環境が持続すると精子幹細胞が減少する。そのメカニズムはいまだ不明であり、その原因が幹細胞そのものの維持メカニズムの破綻に起因するか、あるいは幹細胞周囲の体細胞(幹細胞ニッチ)に起因するか明らかではない。一方、近年 1 細胞からの cDNA を正確に抽出・増幅する技術が普及しつつある。本研究では、ヒト停留精巣の精子幹細胞ニッチを構成している全細胞を分離し、1 細胞ごとの mRNA 発現量を次世代シーケンサーにより定量(RNA シーケンス)する。それらを細胞種ごとに遊走精巣を比較することで、停留精巣における精子幹細胞数減少のメカニズムを解明し、精巣固定術後の追加治療の開発を研究の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まずマウス ES 細胞を用いて、3' -RNA 増幅を行う。方法の概要は、ES 細胞をトリプシン処理によりシングルセルに分離、次いで 1 細胞から RNA を抽出する。次に右図のように、V1 タグを付けた dT プライマーを用いて、逆転写反応を行う

[a] [b]。ついで mRNA の除去を行う [c] とともに cDNA の 3' 側にポリ A を付加する [d]。最後に PCR による増幅を行うが、PCR の際の 1 サイクル目では、3' 側に V3 タグを付けた dT プライマーを用いて増幅し [e]、2 サイクル

目移行に dTV1 プライマーを加えて PCR をかける [f] ことで、両側に V1, V3 が付いた PCR プロダクトのみを増やすことができる。この方法では、これまでの 1 細胞からの RNA 増幅とは異なり、逆転写の時間を短くしている。さらに PCR 増幅用プライマーと競合する逆転写用プライマーを、[c] の過程で加えるエキソヌクレアーゼを用いて除去することで PCR 効率を上げている。



また2種類のタグ(VIV3)を利用することで、転写産物の strand 情報を維持したまま cDNA 増幅を可能にしている。できた cDNA サンプルを粗ニケーション後にサイズセレクションを行い、RNA シーケンスを行う。これにより、1細胞あたり 20 コピーレベルの低発現量の mRNA まで、再現性良く検出できる。注意点すべき点としては、逆転写時間を短くしているため、逆転写産物の評価の qPCR の際に、プライマーの設計できる範囲が限られてしまうことである。逆転写および増幅のポジティブコントロール、及びコピー数の算出には、ERCC-RNA spike を用いる。

次いで、ES 細胞から抽出・増幅した cDNA を用いて、RNA-sequence を行う。

最後に、マウス精巣の各種細胞を、1細胞ずつ単離し、RNA 抽出・増幅と RNA-sequence を行う。当教室ではマウス精巣の単一細胞化は行ったことがないため、コラゲナーゼ、ディスパーゼ等の酵素処理について、これまでのラットの手法にもとづいて条件検討を行う。その際に細胞ごとに viability が異なることが予測されるため、全ての細胞の生存ができる条件を特定する必要がある。また細胞を回収する時点では、細胞種の同定は困難である。次いで上記 1. の方法を用いて 1細胞ごとに cDNA を合成・増幅し RNA-シーケンスを行う。qPCR で、増幅のバリデーションを行い、cDNA の質の担保が取れ次第、既報の精子幹細胞の細胞表面マーカー(cKIT, THY1, GFR α 1)、セルトリ細胞マーカー(SOX9)、ライディッヒ細胞マーカー(3-hydroxysteroid dehydrogenase)の発現量を元に、RNA シーケンスの結果から、各細胞種の推定を行う。この段階で、これまで確たるマーカーが報告されていない、筋様細胞のマーカーの同定ができればと考えている。

4. 研究成果

[停留精巣モデルマウスの開発] これまで当教室では、フルタミドを用いた先天的な停留精巣モデルラットを作成し、研究を重ねてきた。これは外科的な操作を加えていないため、安定的に停留精巣を作成できる利点があった。しかし精巣機能や遺伝子発現については、より知見が蓄積されているマウスでの解析に備えて、新たに停留精巣モデルマウスの開発を行った。現状では妊娠マウスにフルタミドを投与しても、尿道下裂こそできるが停留精巣は作成困難であった。そこで外科的な手法を用いて、思春期前に相当する生後3週のマウスで停留精巣作成を行った。コントロールとして行ったラットでの外科的停留精巣では、思春期後の精巣の上昇と精巣の萎縮が観察された。しかし体格の小さなマウスでは手技が安定せず体表からの外科的操作だけではロバスタなモデルの作成には至らなかった。最終的には皮膚切開を行い、鼠径管を直視下に結紮し埋没縫合を行うことで安定的なモデルマウスの作成に至った。[微量な mRNA の増幅] 1細胞に相当する 10pg 当量の GC-1 細胞(typeB spermatogonia) mRNA からの cDNA 増幅合成を、2つの方法(SC3-seq vs Quartz-seq)で行い、増幅効率を qPCR で比較した。SC3-seq では、40 コピー/細胞相当の mRNA まで、また 75%の再現性で増幅可能であった。しかし Quartz-seq では 100 コピー相当の mRNA でも増幅の再現性にばらつきがあり、今後細かな手技の見直しを行う予定である。主な遅れの主因は再現性の担保が得られなかったことによる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Association of syringomyelia with lower urinary tract dysfunction in anterior sacral meningocele with a tethered spinal cord: A case report and literature summary. Kato T, Moritoki Y, Mizuno K, Nakagawa M, Kondo G, Yasui T. Int J Urol. 2018 May;25(5):515-516. (査読あり)
- ② Unusual Cause of Acute Scrotal Pain-Inflammatory Noncommunicating Hydrocele: A

Pediatric Case Report. Moritoki Y, Mizuno K, Kato T, Yasui T, Hayashi Y. Case Rep Med. 2018 Feb 8;2018:2862514 (査読あり)

③Involvement of the bone morphogenic protein/SMAD signaling pathway in the etiology of congenital anomalies of the kidney and urinary tract accompanied by cryptorchidism. Mizuno K, Nakane A, Nishio H, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Kato T, Ando R, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y. BMC Urol. 2017 Dec 2;17(1):112. doi: 10.1186/s12894-017-0300-9. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

①American Urological Association 2017, San Francisco, MiR-135a is associated with cryptorchidism infertility through suppression of FOXO1 in spermatogonial stem cells. Yoshinobu Moritoki, Kentaro Mizuno, Hideyuki Kamisawa, Satoshi Kurokawa, Akihiro Nakane, Tetsuji Maruyama, Yutaro Hayashi, Takahiro Yasui

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：安井 孝周

ローマ字氏名：(YASUI takahiro)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40326153

研究分担者氏名：林 祐太郎

ローマ字氏名：(HAYASHI yutaro)

所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：40238134

研究分担者氏名：水野 健太郎
ローマ字氏名：(MIZUNO kentaro)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70448710

研究分担者氏名：西尾 英紀
ローマ字氏名：(NISHIO hidenori)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：10621063

研究分担者氏名：神沢 英幸
ローマ字氏名：(KAMISAWA hideyuki)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：研究員
研究者番号（8桁）：00551277

研究分担者氏名：中根 明宏
ローマ字氏名：(NAKANE akihiro)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：70464568

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。