

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22512

研究課題名(和文) ヒト精子幹細胞の機能解析および培養系確立

研究課題名(英文) Functional analysis and culture of human spermatogonial stem cells

研究代表者

篠原 隆司 (Shinohara, Takashi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト精巣を用いて精原細胞の培養を開始するために、精巣細胞を酵素処理により回収する方法の開発を行った。マウス精原細胞の発現する遺伝子データを参考にしてヒト細胞に対するモノクローナル抗体をスクリーニングした結果、Epha2遺伝子がヒト精原細胞にも発現することが確認し、効率よくヒト精原細胞を回収することに成功した。次に回収された細胞を用いて培養を行った結果、ヒト精原細胞マーカーを発現する細胞の増殖を二種類の培養条件で確認することが出来た。しかしながら、これらの細胞はトリプシン処理により細胞死を起こすために機能解析が困難であった。そこで我々は機能活性を調べるための新しい手法を現在検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療成績の向上に伴い、小児の約7-8割の患者が生存し、20代の若者250人に一人が癌治療の生存者である。ところが、治療の副作用として半分程度の患者が不妊となっている。ヒト精子幹細胞の培養が成功すれば、この細胞をがん治療前の患者さんの精巣から回収し、試験管内で増幅したのちに治療後の精巣に移植することで妊孕性を回復することができると期待されている。今回の研究によりヒト精子幹細胞の培養条件が改善し、近い将来ヒトへの応用も可能になると期待できる。

研究成果の概要(英文)：To set up a culture system for human spermatogonial stem cells (SSCs), we established a method for enzymatic digestion of human testis cells. Based on the gene expression patterns in mouse SSCs, we screened monoclonal antibodies that can react with human SSCs. Through this screening, we found that human spermatogonial stem cells express Epha2 on their surface. The frequency of cells expressing Epha2 in the testis is significantly lower than those previously reported for human SSCs. This purification protocol was useful for starting human SSC cultures without the contamination of testicular somatic cells. By adjusting the culture conditions, we were able to derive two candidate SSC cultures. However, we still have not been able to collect these cells for functional analysis because they died upon dissociation into single cells by trypsin. We are currently taking different approaches to determine their SSC activity.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は次世代に遺伝情報を伝達し、自己複製能を持つ唯一の細胞である。精子幹細胞は精巣内にごく低い割合で存在し(マウスの場合 0.02-0.03%)、持続的に分裂することで精子形成を支えている。申請者が樹立した GS 細胞は Glial cell line-derived neurotrophic factor と fibroblast growth factor 2 の存在下で幼若マウスの精巣から樹立され、試験管内では精原細胞として増殖するが、内因性精子形成の欠損した宿主動物の精巣に移植すると精子形成を再開し、子孫を作成できる。申請者らは GS 細胞を用いたトランスジェニック・ノックアウトマウスの作成に成功し、この細胞が潜在的に多能性をもち ES 様細胞に変化することを発見した。GS 細胞はラット(2005 年)、ハムスター(2008 年)などで樹立され、CRISPR-Cas9 による遺伝子編集によりマウスとラットのノックアウトも作成された(2015 年)。

このような精子幹細胞研究の進展に伴い、海外でヒト精子幹細胞研究に興味が高まってきた(Nat Med 2013;19:958)。これには二つの理由がある。一つは小児がん患者の妊孕性保護である(図 2)。近年がん治療の進展により小児悪性腫瘍患者の 8-9 割が生存可能となったが、その一方で放射線や薬物療法のために生殖細胞が破壊され不妊になるケースが増加している。既に精子を持つ成人の場合は精子凍結により妊孕性を担保することが可能であるが、小児の場合にはまだ精子形成が始まっていない為、精子凍結ができない。しかし、精巣には精子幹細胞が存在するため、治療前に回収し凍結保存を行えば、治療終了後に精細管内へ移植して不妊を回復できる見込みがある。精巣サンプルは採取時に少量しか回収できないが、試験管内で培養し、数を増やすことで不妊回復に十分な量の幹細胞を回収できると期待される。また培養にはサンプル採取時に混入した悪性腫瘍細胞が除去できるという利点もある。

ヒト精子幹細胞研究への興味が高まっているもう一つの理由はヒト初期胚・生殖細胞での遺伝子編集研究の進展である。Crispr-Cas9 技術の開発により、多くの動物種において遺伝子編集が可能となり、ゲノムの機能解析が行われるようになった。ES 細胞と異なり、相同組み替えを用いた正確な遺伝子改変はまだ実現していないが、この方法の開発によりこれまで ES 細胞を用いて遺伝子改変できなかった霊長類などにおいても遺伝子編集が行われるようになった。この動きと並行して中国や米国など複数グループが Crispr-Cas9 技術をヒトの初期胚に適用し、論文発表がなされた。しかし、Crispr-Cas9 技術には遺伝子改変の正確さを確認する手法がなく、その特異性や安全性が完全とは言えないことに懸念を持つ多くの研究者がこれに反対しており、2016 年には米国 National Academy 主催でヒトの初期胚を含む生殖系列細胞での遺伝子改変について国際会議が開かれた。最終的に本年 2 月になり将来的には条件付きでヒトの胚でも認められるようにすべきとする提言書が提出され、提言書には「配偶子または初期胚に存在する塩基対の追加や削除、置き換えといったヒトの生殖系列細胞のゲノム編集の臨床試験は、将来認められる可能性がある」と記され、「これは重篤な疾患に対して厳しい監視下で行われる場合に限られる。」との条件が併記された。このような中、2017 年より米国ではヒト精子幹細胞の培養系の技術確立を求める NIH グラントが設定された。これはヒト ES 細胞研究が NIH からの支援が得られなかったのとは好対照である。ヒトの生殖細胞を直接操作する点において、精子幹細胞の遺伝子操作は倫理的ハードルが低いのみならず、培養後に導入した遺伝子変異も確認できるなどの利点が評価されていると推察される。実際に霊長類の遺伝子改変においても精子幹細胞が有力なツールとして注目されている(Neuron 2015;86:617, Nat Neurosci 2016;19:1124)。

このようにヒト精子幹細胞に対する興味が高まっているものの、ヒト細胞についての研究は始まったばかりである。特異的マーカーになる分子も同定されていない上に幹細胞研究では必須の機能的アッセイも確立していない。これらの問題を解決することはヒトGS細胞の樹立のために重要なステップであると考え、本申請に至った。

2. 研究の目的

マウス精子幹細胞は不妊個体の精細管への移植により同定される。この方法は薬剤処理により不妊にしたホスト精巣の精細管内に、精子幹細胞を含む細胞集団を注入すると、精子幹細胞がホストの精巣内で精子に分化し、ドナー由来の子孫を作るというものである。しかしながら、この方法はヒトでは倫理的・免疫学的な理由で適用できない。ヌードマウスを用いれば、ラットやハムスターの場合には精子分化が可能である。しかし非げっ歯類をドナーとした場合には精原細胞が生着するものの、精子への分化は見られない。特にヒトの場合には数十個の細胞が生着している像が見られるに過ぎず、この細胞が幹細胞であるかどうかについては十分な確信を持つことができない。そこで以下の2つの目標を設定する。

①ヒト精子幹細胞のアッセイ系の確立

i) in vivo アッセイ系

代替免疫欠損動物の精巣中でヒト精子幹細胞が精子分化を行う実験系を確立する。

ii) in vitro アッセイ系

精子形成の再現に依存しない、精子幹細胞の機能的アッセイを確立する。

②ヒトGS細胞の樹立

3. 研究の方法

①ヒト精子幹細胞のアッセイ系の確立

i) ヒト精子幹細胞の in vivo アッセイ系の確立

ヒト精子幹細胞がマウスで分化できないのはドナーとホスト細胞のサイトカインや接着分子の構造差が大きいためと考えられる。そのためヒト精巣の支持細胞であるセルトリ細胞をマウスの精巣環境へ移植することで精子分化の誘導を試みる。

a) カドミウムを用いた方法

カドミウムを投与すると、内因性セルトリ細胞を除去できるため、空にした精細管の中へヒトのセルトリ細胞を注入すれば、ドナー由来のセルトリ細胞によりマウスの精細管を再構築できると期待される。こうして準備されたホストへヒト精子幹細胞を移植する。

b) トランスジェニックマウスを用いた方法

Amh プロモーター（セルトリ細胞特異的に発現）下でジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックマウスを用いれば、外部からジフテリア毒素を投与することで内因性のセルトリ細胞を任意のタイミングで除去できる。

a), b)の両方を比較し、セルトリ細胞を除去されたマウスの精巣へヒトのセルトリ細胞を移植する。

ii) ヒト精子幹細胞の in vitro アッセイ系の確立

ヒト血液幹細胞には in vitro での幹細胞のアッセイ系として cobblestone assay が用いられて来た。この方法ではヒトの血液幹細胞を含む細胞集団を骨髓細胞株の上で培養すると、幹細胞が骨髓細胞の下へと潜り込み、敷石状の細胞集団 (cobblestone colonies) を作る。精子幹細胞

の場合にも、これと類似した培養が可能であることを申請者は報告した (Cell Stem Cell 2012;11:567) (図 4)。マウスのセルトリ細胞上へ GS 細胞を播種すると、幹細胞がセルトリ細胞の下へと潜り込み、敷石状コロニーを形成する。また実際に、このコロニーが見られた培養では移植実験結果と合致し高い幹細胞活性が維持されていた。そこで本研究ではマウス以外の動物のセルトリ細胞と、ヒト精子幹細胞を含む細胞集団を共培養することで、cobblestone assay を確立する。

② ヒト GS 細胞培養系の開発

a) げっ歯類培養系の改善と既知の増殖因子受容体の発現解析

げっ歯類 GS 細胞は通常胎児線維芽細胞上で培養され、1%の血清に加え、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) の添加により増殖する。ヒト精子幹細胞はマウスの精巣内で数ヶ月にわたり生存することから、増殖条件がげっ歯類と近い可能性が高いと予想されるため、まずは GDNF, FGF2 含有培地をベースに候補因子を添加して増殖を促進する培養条件を検討する。一方で血清は幹細胞の自己複製に悪影響を及ぼしうることから、無血清培養の培養条件を検討するため細胞に適した細胞外基質をスクリーニングする。げっ歯類精子幹細胞はラミニンに接着性が高く、ラミニンが無血清培養に用いることで長期培養が可能となった。そこで、ファイブロネクチン、I 型および IV 型コラーゲンなどの異なった細胞外基質を用いて培養を行う。これに加え、ヒト精子幹細胞のマーカーにより濃縮された細胞の RNA シークエンスを行い、遺伝子解析により増殖因子受容体の候補分子の探索を行い、培養条件の決定に役立てる。

b) 増殖因子・小分子化合物のスクリーニング

RNA シークエンスの解析結果を踏まえて、精子幹細胞の生存を促す小分子化合物の自動スクリーニングを 96 穴プレートを用いて行う。Selleck chemical (476 個)、calbiochem (65 個) もしくは Prestwick 社 (1120 個) 由来のケミカルライブラリーを利用する。

c) GS 細胞の表現型と機能解析

フローサイトメトリー及び RNA シークエンスにより樹立細胞の表現型解析を行い、精原細胞としての性質を確認した上で免疫欠損マウスの精巣内へ細胞移植を行う。精巣は 3 ヶ月後に回収し、ヒト特異的なマーカー抗体 (例えば Sa114) による免疫染色を行い、ドナー由来のコロニー形成の有無を確認する。もしくは①で確立する新規アッセイ系により定量する

4. 研究成果

ヒト精子幹細胞を培養するためには、この細胞を精巣から効率よく回収する必要がある。そこで我々はまず最初に精巣の酵素処理の方法を検討した。マウスで用いられるコラーゲナーゼとトリプシンを使った酵素処理では十分に細胞を回収することが困難であった。そこでコラーゲナーゼの種類を IV 型から I 型に変更し、さらにヒアルロニダーゼを使用することで比較的効率よく細胞を回収できるようになった。成人の精巣よりも小児の精巣ではより容易に細胞を回収することが出来た。

幹細胞は低頻度で存在するために、この細胞を効率よく回収することが培養には必須である。そこでマウスの精子幹細胞の遺伝子発現データを元にヒト精原細胞でも発現する可能性がある分子に対してモノクローナル抗体を用いてスクリーニングを行った。その結果、ヒト精子幹細胞の表面抗原として、チロシンキナーゼである EPHA2 を発現していることを発見した。マウスの精巣においては EPHA2 の発現は未分化型精原細胞のごく一部分にしか発現しておらず、

これまで精子幹細胞のマーカー分子と言われているGFRA1よりも発現する細胞が少数であった。

このEPHA2を発現する精原細胞を用いて精原細胞の増殖を刺激する分子を探索した。特にEPHA2は細胞増殖の促進を行うことが知られているために、このリガンド分子であるEPHRIIN-A1分子を培養細胞に加えてやることで、精子幹細胞の自己複製分裂を刺激できる可能性があると考えた。しかしながら、EPHA2の刺激のみでは精子幹細胞の増殖を誘導することは出来なかった。そこでEPHA2を指標にして回収したヒト精原細胞を利用して、ヒト精子幹細胞の増殖を刺激する分子を探す目的でケミカルライブラリーのスクリーニングを行った。用いた小分子化合物ライブラリーは Selleck (1, 224個)、prestwick (1, 120個)、Calbiochem (65個)、Tocris (1, 280個)、Apewxbio (2, 525個)の5つのライブラリーである。スクリーニングの結果、我々は二種類のヒトGS細胞候補を得ることが出来た。

そこでこの細胞の機能を直接調べるためにトリプシンにより細胞調製を行った。しかしながら、いずれの細胞もトリプシンにより完全にバラバラの状態にすると細胞死を起こして死んでしまうことが分かった。ヒトES細胞も同様の処理により細胞死を起こすことから、ヒトGS細胞はヒトES細胞とよく似た性質を持つことを示唆する。現在、この細胞回収方法についての条件検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M, Chen G, Morimoto H, Shinohara T.	4. 巻 66
2. 論文標題 CD2 is a surface marker for mouse and rat spermatogonial stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 341-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Shinohara T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 7837-7844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1914963117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Y, Ogonuki N, Hasegawa A, Kanatsu-Shinohara M, Ogura A, Wang Y, McCarrey JR, Shinohara T.	4. 巻 104
2. 論文標題 OGG1 protects mouse spermatogonial stem cells from reactive oxygen species in culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Reprod	6. 最初と最後の頁 706-716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioaa216.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Kamimura, S., Ogura, A., Yabe-Nishimura, C., Mori, Y., Morimoto, T., Watanabe, S., Otsu, K., Yamamoto, T. and Shinohara, T.	4. 巻 2
2. 論文標題 ROS amplification drives mouse spermatogonial stem cell self-renewal.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci. Alliance	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.201900374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara, M., Yamamoto, T., Toh, H., Kazuki, Y., Kazuki, K., Imoto, J., Ikeo, K., Oshima, M., Shirahige, K., Iwama, A., Nabeshima, Y., Sasaki, H. and Shinohara, T.	4. 巻 116
2. 論文標題 Aging of spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 16404-16409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904980116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara, T. and Kanatsu-Shinohara, M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Transgenesis and genome editing of mouse spermatogonial stem cells by lentivirus pseudotyped with Sendai virus F protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 447-461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Orwig, K. E. and Shinohara, T.	4. 巻 102
2. 論文標題 Expression and functional analyses of EPHA2 in mouse spermatogonial stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Reprod.	6. 最初と最後の頁 220-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 篠原隆司
2. 発表標題 宇宙環境が精子幹細胞に及ぼす影響についての解析
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原隆司
2. 発表標題 精子幹細胞の老化メカニズム
3. 学会等名 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Shinohara
2. 発表標題 Aging of spermatogonial stem cells. Long Lie spermatogonial stem cells!
3. 学会等名 Brinster Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原隆司
2. 発表標題 精子幹細胞の移植による妊孕性の回復
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------