

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号： 17401
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2020 ~ 2020
課題番号： 20H00990
研究課題名 再生の機序の解明を目指した再生誘導を契機に発現する新規遺伝子の組織学的発現解析

研究代表者

百武 慶一郎 (Hyakutake, Keiichiro)

熊本大学・理学部・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：アフリカツメガエル精巣は、外科的手術によりその一部を欠損させても、元通りに再生する能力を有する。また、RNA-seq法による網羅的な遺伝子発現解析により、再生誘導を契機に発現を開始する遺伝子をいくつか同定していた。本研究では、再生過程における目的遺伝子の機能を推定することを目的として、再生を誘導した精巣における目的遺伝子の発現場所を、in situ hybridization法により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外科的手術によりカエル精巣の再生を誘導すると、輸精管の一部が枝分かれするように肥大化し、そのような領域において幹細胞様の細胞が多数増殖することが形態的に示唆されていた。本研究において、再生を誘導した精巣内における目的遺伝子のmRNAの発現をin situ hybridization法により検出した結果、apelin mRNAが、そのような肥大化した輸精管を構成する上皮細胞において発現していることが明らかとなった。これら観察結果からapelin遺伝子は、新たな幹細胞ニッチの形成に関与していることが期待される。

研究分野： 生物学

キーワード： 精巣 再生

1. 研究の目的

再生とは、損傷部分を新しい細胞によって補填し、元の機能を回復させる生命現象である。再生は、個体の恒常性維持のために重要であるが、近年、iPS 細胞から任意の細胞を分化誘導することが可能になりつつあり、再生医療への応用という側面からも非常に興味深い現象である。しかし、ヒトを含む多くの脊椎動物における再生は、皮膚や筋肉、そして肝臓など、比較的単純な構造を持つ器官に限定的であり、このことが、再生現象を理解する上で大きな障壁となっている。

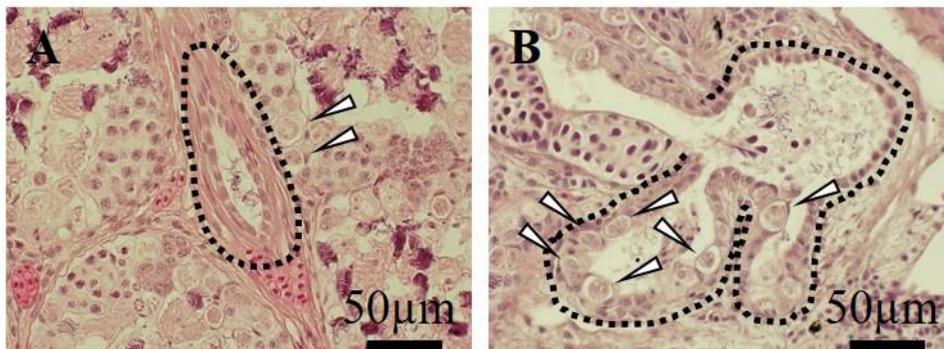
その一方で、アフリカツメガエルは、非常に高い再生能を有している。体細胞と様々な分化段階の生殖細胞で構成されている精巣でさえ、外科的手術によりその一部を摘出しても、元通りに再生することができる。また、アフリカツメガエルは、古くから発生生物学等の分野において用いられてきたモデル生物の一つであり、既に全ゲノム情報が解読されていること、そして Cas9/CRISPR 法によるゲノム編集も広く行なわれており、再生現象を解析する上で非常に有用である。

これまでに、再生を誘導したカエル精巣において RNA-seq 法による網羅的な遺伝子発現解析を行ない、再生を契機に発現を開始する遺伝子をいくつか同定した。これら遺伝子は、再生の過程において重要な役割を担っていることが期待される。

そこで本研究では、再生過程における精巣内での候補遺伝子の発現場所を明らかにし、その機能を推定することを目的とした。

2. 研究成果

(1) これまでに、再生を誘導した精巣の組織切片において、肥大化した輸精管が枝分かれした構造をとること、そして、そのような領域において多数の第一精原細胞 (Primary spermatogonium; PG, カエル精巣においては、この PG として同定される細胞集団内に雄性生殖幹細胞が存在する) が存在する様子が観察された (参考図 1, B)。通常の前精巣では、このような輸精管の分枝は見られず、また、管内には精子しか存在しない (参考図 1, A)。この観察結果から、幹細胞の増殖とそれを維持する微小環境の再構築が、輸精管から新たに伸長した部分で行われているのではないかと予想した。



参考図1 通常の前精巣(A)と2週間再生を誘導した前精巣(B)の組織切片像。破線は輸精管、矢頭は第一精原細胞(クラスターを形成せずに単一で存在し、他の細胞に比べ、22-25μmと非常に大きいので形態から容易に同定できる)を示す。

そこで、再生誘導後の前精巣を構成する細胞群の増殖活性を調べるため、外科的手術により前精巣を部分的に欠損させた後、カエルの腹腔内に BrdU 溶液を注射し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を行なった (図 1)。

再生を誘導することにより、一部の精細管と輸精管の連結部において、多数の PG が存在する領域が観察された (図 1, B, 矢頭および二重矢頭)。またそのような領域において、BrdU を取り込んでいる PG も複数観察された (図 1, B, 二重矢頭)。通常、無傷の前精巣においては、PG は精細管内壁に単一で存在する (参考図 1, A, 矢頭)。さらに、前精巣全体に分布している BrdU を取り込んでいた PG の割合は、無傷の前精巣においては平均してわずか 2.1%であったのに対し、再生を誘導した前精巣においては、3 日間の誘導期間において 10.8%、2 週間の誘導期間においては 15.5%であった (データは示していない)。これら観察結果から、精細管と輸精管の連結部に見られた第一精原細胞のクラスターは、再生誘導を契機に幹細胞の自己増殖が促進された結果であることが推察される。

また、これまでの観察結果と一致して、別の領域においては、肥大化し枝分かれした輸精管と、その管壁において多数の PG が観察された (図 1, A, 矢頭)。そのような輸精管を構成する上皮細胞の一部では BrdU のシグナルが検出された (図 1, A, 矢印)。

今回のBrdUを用いた精巣を構成する細胞の増殖活性の観察結果から、精巣の一部を人為的に欠損させることにより再生を誘導すると、雄性生殖幹細胞の自己増殖と、上皮細胞の増殖による輸精管の肥大化が引き起こされることが強く示唆された。

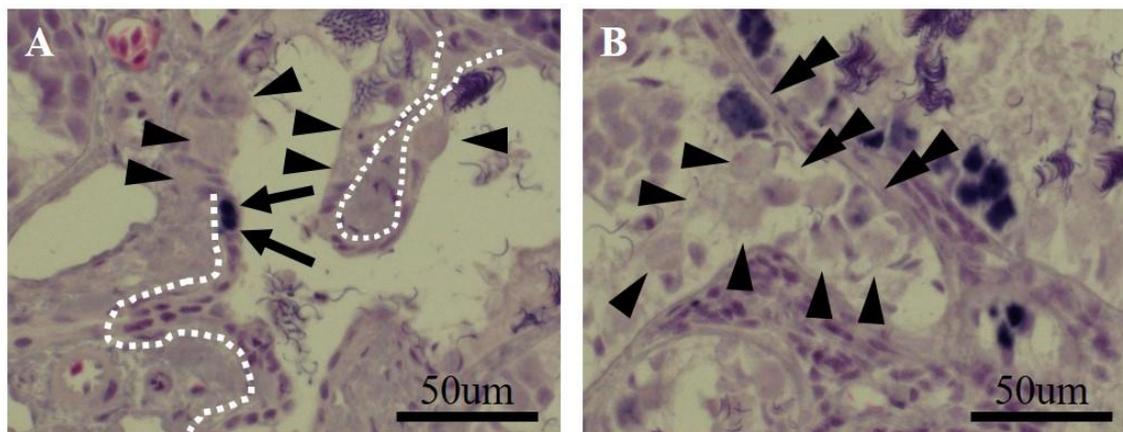


図1 再生誘導を契機に観察される精細管の肥大化と細胞の増殖活性

外科的手術により3日間再生を誘導した精巣の組織切片像。細胞の増殖活性を調べるため、精巣を摘出する24時間前に、BrdU溶液(6mg/ml; 体重50gあたり1mlを投与)を腹腔内に注射した。組織切片は、抗BrdU抗体を用いて免疫染色を行なった後、細胞同定の為にhematoxylin/eosin液で染色した(A&B)。破線は、肥大化した輸精管の外周、矢頭は第一精原細胞を示す。二重矢頭は、BrdUの存在を示す青色のシグナルが検出された第一精原細胞、矢印は、輸精管を構成する上皮細胞のうち、BrdUの存在を示す青色のシグナルが検出された細胞を示す。

(2) これまでに、精巣の再生に寄与する候補遺伝子として、*cxc18* 遺伝子と *apelin* 遺伝子を見い出していた。そこで本研究では、再生を誘導した精巣におけるこれら遺伝子の mRNA の発現場所を、*in situ* hybridization 法により検出した。実験の結果、*cxc18* mRNA は、精巣切除後に形成される細胞外マトリクス周辺、およびマクロファージ様の細胞において発現していた(データは示していない)。また同様に、*apelin* mRNA についても、*in situ* hybridization 法による検出を行なったところ、再生誘導時に特徴的な肥大化した輸精管を構成する上皮細胞において強く発現していることが示唆された(図2)。これら観察結果から、*apelin* 遺伝子は、新たな幹細胞ニッチの形成に関与しているのではないかと期待している。今後は、*apelin* の受容体として知られる APJ 遺伝子の雄性生殖幹細胞における発現の有無を明らかにするとともに、BrdUを用いてS期の細胞を標識することで、*apelin* 陽性細胞と幹細胞の増殖活性の相関性について解析を行ない、再生との関連性の有無について検証していく必要がある。

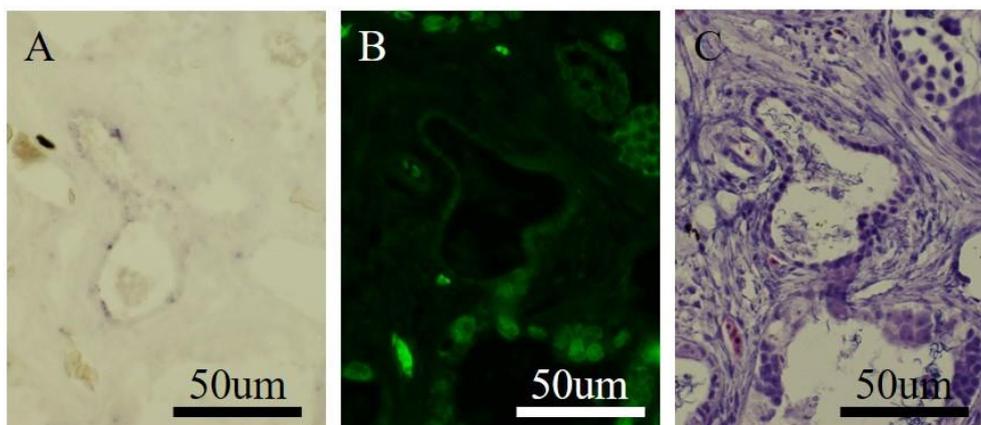


図2 *apelin* mRNAは、再生誘導時に特徴的な肥大化した輸精管の上皮細胞において発現している

外科的手術により2週間再生を誘導した精巣の組織切片像。アンチセンスプローブを用いて、*in situ* hybridization法による*apelin* mRNAの検出を行なった(A)。また、隣接する切片を生殖細胞マーカーであるXtrタンパク質を認識する抗体を用いて免疫染色を行なった(B)。同切片は、その後、細胞を同定するためにhematoxyline/eosin液で染色した(C)。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------