

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713012

研究課題名(和文)多能性幹細胞を用いた三次元精巣組織の再構築による完全体外精子形成法の開発

研究課題名(英文)Generation of testicular organoids from pluripotent stem cells

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) 17,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精子形成の場である精細管をde novoに創り出し精巣オルガノイドの作製を目指している。そのため、精細管の主要構成細胞であるセルトリ細胞を多能性幹細胞からの分化誘導法の確立を行った。まず、セルトリ細胞特異的に発現する遺伝子Sox9にEGFPがノックインされたマウスからSox9-EGFP ES細胞を樹立した。さらに3つの転写因子をテトラサイクリン誘導システムに組み込んだベクターを作製し、Sox9-GFP ES細胞に導入した。樹立したES細胞を成長因子で分化誘導した後に、適当なタイミングで転写因子を強制発現させることで、Sox9-EGFP発現細胞を多数誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to generate a testicular organoid by creating a seminiferous tubule which is a site of spermatogenesis in de novo. Therefore, We tried to induce differentiation from pluripotent stem cells to Sertoli cells, the main constituent cells of seminiferous tubules. First, Sox9-EGFP ES cells were established from mice in which EGFP was knocked-in to Sertoli cell-specific gene Sox9. Furthermore, a vector incorporating three transcription factors into a tetracycline induction system was constructed and introduced into Sox9-GFP ES cells. We succeeded in inducing a large number of Sox9-EGFP expressing cells by overexpressing transcription factors at an appropriate timing after inducing differentiation with growth factors.

研究分野：生殖再生

キーワード：体外精子形成誘導 精巣オルガノイド ゲノム編集 精子幹細胞 器官培養 セルトリ細胞

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる細胞に分化が可能な多能性を有する ES/iPS 細胞をもちいて、障害のある臓器の機能を回復させる再生医療への応用が期待されている。その実現のため、体内の様々な細胞を分化誘導させる方法が研究されている。しかし、これらの分化誘導された細胞の応用は細胞移植法などが有効な疾患・病態に限定される。多細胞生物の組織や臓器は、複数種の細胞からなる複雑な三次元構造からなっており、そのため立体的な組織あるいは臓器の構築を誘導する技術の開発が求められている。一方、男子不妊症の原因の 80% は、造精機能障害による精子形成の量的・質的異常によるものがほとんどであるが、男性不妊症の病態の解析や、治療法の開発には目立った進展が見られていないのが現状である。生体外での精子形成誘導法が確立されれば、不妊治療や不妊症の病態の解明のための実験系として有用であると考えられる。最近、マウス ES/iPS 細胞から精子幹細胞の前駆細胞である始原生殖細胞様の細胞(PGCLC)を *in vitro* で分化誘導する方法が報告された。そして、その PGCLC をマウス個体内の精巣へ移植すると、精子まで分化することから、PGCLC が正常な始原生殖細胞であることが証明されている。しかし、それらの細胞を精子へと分化させるには、精巣内移植法を用い生体内へと戻す他はないことが残された課題となっている。

## 2. 研究の目的

ES/iPS 細胞から始原生殖細胞を分化誘導する方法が報告され、精子形成メカニズムの解明や不妊治療などへの応用が期待されている。それらの誘導始原生殖細胞から精原細胞を経て精子まで分化させるには、現在の所、精巣内へ移植するほかない。一方で、我々は、精子形成には精巣組織に特有のチューブ構造をもった 3 次元構造が重要であるという観点に基づき、器官培養法による *in vitro* 精子形成法を開発してきた。そして、精原細胞を、妊孕能を有する機能的な精子へ分化誘導する方法の開発に成功している。この二つの実験系に共通する問題は、マウス個体から採取された組織に依存した方法であるという点である。したがって、本研究課題では、*in vitro* で精巣細胞を誘導し立体的な精巣組織を *in vitro* で構築する方法を開発する。そして、その再構築精巣中で精原細胞から妊孕能のある精子産生までの全ての過程を *in vitro* で再現可能な方法を構築することを最終目的としている。その最終目的の達成のための、以下の関連する周辺技術の開発も含め行った。

器官培養による体外精子形成誘導法の開発

培養精子幹細胞株の遺伝子改変法の開発  
ES 細胞からのセルトリ細胞の分化誘導法の開発

## 3. 研究の方法

器官培養による体外精子形成誘導法の開発

性成熟した 3 週齢以上の雄マウスの精巣を器官培養した。取り出した精巣を 2-3mm の大きさに細切し、培養液に浸漬したアガロースゲル上に置き、器官培養を行った。精子形成を判定するために生殖細胞特異的に減数分裂中期と終末期から GFP を発現する 2 種類のトランスジェニックマウスである Acr-GFP と Gsg2/haspin-GFP を用いた。蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、組織中の GFP 発現面積を評価した。

培養精子幹細胞株の遺伝子改変法の開発

マウス精巣から樹立した培養精子幹細胞株(GS 細胞)に対し、TALEN や CRISPR/Cas9 システムを用いて効率的な遺伝子改変法の開発を行った。マウス Rosa26 遺伝子座に対する TALEN および CRISPR/Cas9 発現ベクターを作製した。遺伝子導入は Nucleofector エレクトロポレーションを用いて行った。

ES 細胞からのセルトリ細胞の分化誘導法の開発

セルトリ細胞で特異的に GFP を発現する Sox9-EGFP マウスから ES 細胞を樹立し、これらの細胞を使って精巣細胞誘導実験を行った。GFP の発現および定量 PCR 法によって評価した。

## 4. 研究成果

器官培養による体外精子形成誘導法の開発

器官培養法がアダルトの精巣にも適用可能か調べるため、我々は、性成熟した Acr-GFP や Gsg2-GFP トランスジェニックマウスの精巣組織片を器官培養した。培養開始翌日から、細切した箇所から GFP 発現細胞、すなわち精母細胞および精子細胞が漏れ出す様子が観察された。そして、およそ一週間後までには、培養組織中に GFP の発現はほとんど認められなくなった。しかし、3 週間後までには精巣組織片の一部で GFP が再び発現した(Fig1A-C)。この結果は、器官培養した組織中で、精子形成が再生し、進行している可能

性を示唆している。次に我々は、この結果を確かめるため、BrdU 取り込みにより、精原細胞や初期精母細胞をラベルし、BrdU でラベルされた精子細胞が産生されるかどうか調べた。アダルトの Acr-GFP や Gsg2-GFP の精巣組織片に BrdU を添加した培地で約 24 時間培養し、BrdU を取り込ませた後、通常の培地に戻して培養を続けた。前述の実験と同様、培養開始後直ちに、GFP の発現がなくなり、その後 GFP の発現が回復してきた。40 ~ 50 日後にその組織を BrdU に対する免疫染色を行ったところ、BrdU 陽性の円形精子細胞や精子が観察された(Fig1D, E)。一方で、さらに長期間(80 日)培養した組織では、BrdU 陽性の生殖細胞はほとんど見られなかった(Fig1F, G)。

以上の結果より、器官培養法が性成熟した精巣に対しても有効であることが明らかになった(Sato et al., 2015 Plos One)。

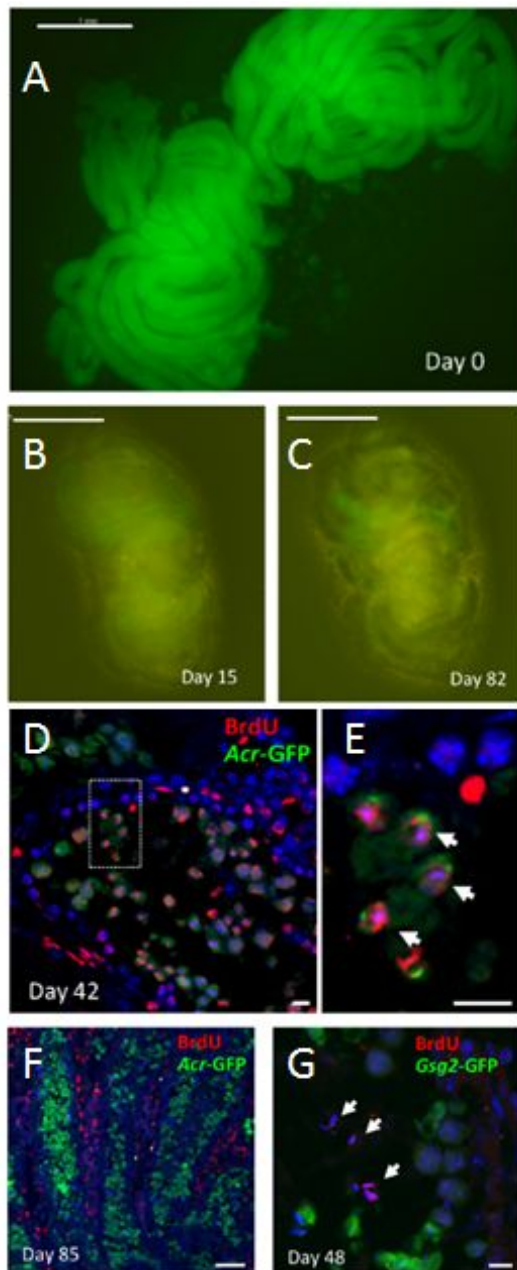


Fig.1. 性成熟したマウス精巣の器官培養。(A)器

官培養した 6 週齢の Acr-GFP マウス精巣(培養 0 日)。組織全体で GFP 発現が認められた。(B)培養 15 日目。(D-G)Hoechst で対比染色した BrdU および GFP に対する抗体を用いた培養組織の免疫組織化学。6 週齢の Acr-GFP (D および F) および 24 週齢の Gsg2-GFP (G) マウスの精巣組織断片を培養し、42 日目(D)、85 日目(F)および 48 日目 (G) に示す。

### 培養精子幹細胞株の遺伝子改変法の開発

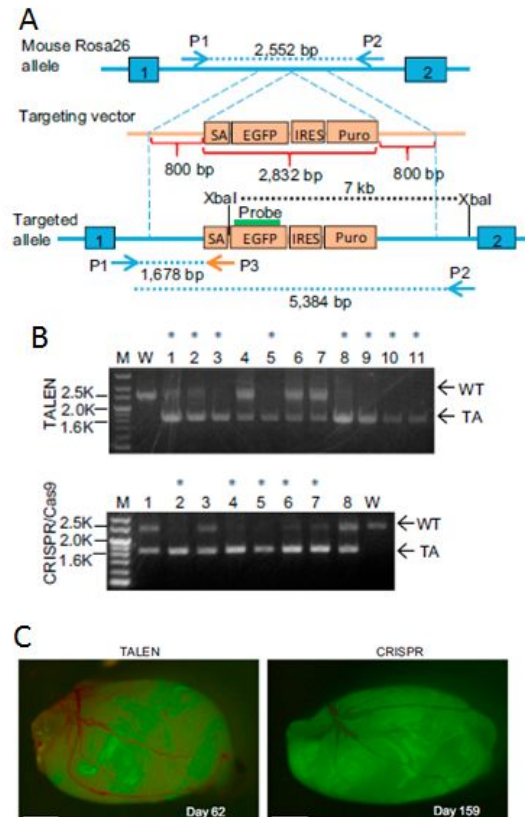


Fig.2. GS 細胞の遺伝子改変。(A)Rosa26 遺伝子座への遺伝子ノックインの概略図。(B)遺伝子ノックイン GS 細胞のジェノタイピング PCR の結果。(C) 遺伝子ノックイン GS 細胞を移植した精巣。GFP を発現する GS 細胞が精巣内で定着し精子形成していることが確認された。

効率的な遺伝子改変法として近年注目されている TALEN や CRISPR/Cas9 システムが GS 細胞の遺伝子改変に有効な方法になり得るか検討した。マウスの全身性発現遺伝子である Rosa26 遺伝子を TALEN で切断し、相同組換え修復により、ドナーベクターに組み込んだ GFP が挿入されるかどうかを調べた (Fig2A)。まず、Rosa26 遺伝子を標的とする TALEN あるいは CRISPR/Cas9 発現ベクターと GFP レポーター遺伝子とピューロマイシン耐性を IRES 配列でつないだドナーベクターを作成した。これらのベクターをエレクトロポレーションで GS 細胞に遺伝子導入し、ピューロマイシンによる薬剤選択を行った。

その結果得られた GFP 陽性のクローンに対し、それぞれゲノミック PCR を行い 20 クローン中 19 クローンが標的遺伝子中に導入されていることを確認した(Fig2B)。

これらの GS 細胞が幹細胞能を保持し、正常な精子形成が可能かどうかを調べるために、遺伝的に生殖細胞を欠損した  $W/W^v$  マウスの精細管内へ GS 細胞を移植した。その結果、GFP 導入 GS 細胞が、宿主精巣へ定着し、精子を行っていることが観察された(Fig2C)。さらに、それら精子を野生型のメスの卵子へ顕微授精することで、産仔の獲得にも成功した。

以上の結果から、TALEN および CRISPR/Cas9 は、マウス GS 細胞においても有効に機能し、効率よく遺伝子改変 GS を得ることができる方法であることが分かった(Sato et al., 2015 Stem Cell Reports)。

#### ES 細胞からのセルトリ細胞の分化誘導法の開発

セルトリ細胞の出現を検出するために、セルトリ細胞特異的に発現する遺伝子 Sox9 と Dmrt1 にレポーター遺伝子 EGFP をノックインしたレポーター-ES 細胞を樹立した。この ES 細胞を使って種々の培養法を検討した。腎臓オルガノイドで使用される基礎培地と成長因子の組み合わせを改変した培養条件に加えて、培養 8 日目後にテトラサイクリン誘導システム (Tet-on) で、複数の転写因子を Sox9-EGFP ES 細胞に強制発現させたところ、Sox9-EGFP 発現細胞が多数出現した。またセルトリ細胞マーカー遺伝子が生体由来セルトリ細胞と同等の発現がみられた。この誘導セルトリ細胞を in vitro 再構成法に供したところ、精細管構造を形成することが確認された。しかし、いくつかのマーカー遺伝子の発現が低く、精細管構造をとらずに無秩序な増殖をする細胞も多数みられた。このような精細管構造をとらない細胞は、免疫染色の結果からもセルトリ細胞とは言えない不完全な分化状態にあると思われた。したがって、セルトリ細胞への分化誘導精度を向上させた培養法の開発を現在も継続中である。

#### 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 13 件)

- 1 . Yamanaka H, Komeya M, Nakamura H, Sanjo H, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T, Ogawa T. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500:885-891 (2018) 査読有
- 2 . Fukunaga H, Kaminaga K, Sato T, Usami N,

Watanabe R, Butterworth KT, Ogawa T, Yokoya A, Prise KM. Application of an Ex Vivo Tissue Model to Investigate Radiobiological Effects on Spermatogenesis. *Radiat Res.* 189:661-667. (2018) 査読有

- 3 . Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, Ino Y, Arakawa N, Hirano H, Yao T, Asayama Y, Matsuhisa A, Yao M, Ogawa T. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS One* 12 :e0192884. (2018) 査読有
- 4 . Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T, Ogawa T. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Sci Rep.* 13:15459. (2017) 査読有
- 5 . Nakajima R, Sato T, Ogawa T, Okano H, Noce T. A noncoding RNA containing a SINE-B1 motif associates with meiotic metaphase chromatin and has an indispensable function during spermatogenesis. *PLoS One* 12 (6):e0179585. doi:10.1371/journal.pone.0179585 (2017) 査読有
- 6 . Nakamura N, Merry GE, Inselman AL, Sloper DT, Del Valle PL, Sato T, Ogawa T, Hansen DK. Evaluation of Culture Time and Media in an In Vitro Testis Organ Culture System. *Birth Defects Res.* 17, 465-474. doi: 10.1002/bdr2.1002 (2017) 査読有
- 7 . Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y, Hara K, Mizuguchi H, Sato T, Taketo M, et al. SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells. *Stem Cell Report* doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.006s (2017). 査読有
- 8 . Kojima K, Sato T, Naruse Y, \*Ogawa T. Spermatogenesis in Explanted Fetal Mouse Testis Tissues. *Biol Reprod.* 95(3):63, 1-6. (2016) 査読有
- 9 . Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, Ogawa T. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep* 19;6:21472. (2016) 査読有
- 10 . Sato T\*, Sakuma T, Yokonishi T, Katagiri K, Kamimura S, Ogonuki N, Ogura A, Yamamoto T, Ogawa T\*. Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking

CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports* 5, 75-82. (2015) 査読有

11. Sato T, Katagiri K, Kojima K, Komeya M, Yao M, Ogawa T. In Vitro Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS One* 10, e0130171. (2015) 査読有
12. 佐藤卓也・小川毅彦「精子幹細胞研究の展望」臨床婦人科産科 Vol. 69, No.8, 786-790 (2015) 査読無
13. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nature Commun.* 5, 4320. (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 宮本杏梨, 佐藤卓也, 秋山治彦, 矢尾正祐, 小川毅彦, マウス精巣由来セルトリ細胞の機能を維持した増殖培養法の開発 第40回 日本分子生物学会年会 神戸 2018
2. 佐藤卓也, ゲノム編集技術をもちいた培養精子幹細胞株の遺伝子改変 第105回 日本泌尿器科学会総会 鹿児島 2017
3. 佐藤卓也, 片桐久美子, 小島一晃, 古目谷暢, 矢尾正祐, 小川毅彦器官培養による成熟マウス精巣の in vitro 精子形成 第10回日本生殖再生医学会 京都 2015
4. 佐藤卓也, 佐久間哲史, 片桐久美子, 越後貫成美, 小倉淳郎, 山本卓, 小川毅彦 ゲノム編集技術をもちいた培養精子幹細胞株の遺伝子改変法の開発 第37回分子生物学会年会 横浜 2014

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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