

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008 ～ 2012

課題番号：20116005

研究課題名（和文）培養系を用いたマウス GSC/ニッチ・システムの解明と分化誘導系の開発

研究課題名（英文）Regulatory Mechanism of Gamete Stem Cells

研究代表者

小川 毅彦 (OGAWA TAKEHIKO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50254222

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ニッチ、精子幹細胞、培養

1. 研究計画の概要

マウスのGSC（精子幹細胞）の培養系を用いて、*in vitro* ニッチの分子機構を解明し、同時に、ヒトを含むほ乳類全般のGSC 培養法を開発することが本研究の目的である。あわせてGSCから精子形成を誘導する培養系を開発し、男性不妊症（精子形成障害）の病態解明・治療法開発につなげることを目指している。そのために、以下のような計画で研究を開始した。

(1) *in vitro* ニッチの分子機構の解明：*in vitro* ニッチには未知の構成要素の存在が想定される。*in vitro* ニッチの因子（群）を発見し、GSC の維持・増殖に関わる分子機構を明らかにする。

(2) GSC 培養条件の改良と*in vitro* 精子形成系の開発：培養条件下でのGSC の自発的分化を抑制し、高純度にGSC を維持培養する方法を開発する。さらにGSCを分化誘導し、精子形成系を開発する。

(3) GSC の機能アッセイ法の開発：ほ乳類全般に応用できるGSC アッセイ法として、①免疫不全マウス精細管への異種移植と、②新生仔精巣細胞を用いた精細管再構成法による精子形成系を開発する。

(4) ヒトを含む多種ほ乳類のGSC の性質の解明と培養法の開発：細胞表面マーカーを用いてヒト、霊長類、ブタ、ウサギのGSC の濃縮を行い、培養法を開発を行う。これら濃縮GSC の遺伝子発現プロファイル解析を行う。

2. 研究の進捗状況

(1) *in vitro* ニッチの分子機構の解明：マイクロアレイや共同研究の成果から幾つかの

候補遺伝子（ニッチ因子候補）が得られている。これら候補因子の*in vitro*における機能をこれまで検討してきたが、GSCの増殖に対する明らかな効果は認められていない。今後も引き続き、研究を継続する。

(2) GSC 培養条件の改良と*in vitro* 精子形成系の開発：*in vitro*におけるGSCの増殖アッセイ系を開発した。マイクロドロップ培養法を改良し、少数のGSCの培養下（微小環境）での振る舞いを観察・評価すること可能となった。よってGSCの増殖を精度高く検定できる。また*in vitro*精子形成実験としては、器官培養法の条件改良により、新生仔マウス精巣を培養することにより、精子産生までの完全な精子形成を*in vitro*で再現することに成功した。

(3) GSC の機能アッセイ法の開発：この課題に関しては、①免疫不全マウス精細管への異種移植と、②新生仔精巣細胞を用いた精細管再構成法による精子形成系の開発、の研究を計画していた。しかし、器官培養法の成功に至り、*in vivo*実験である上記2計画を全面的に見直し、いずれも*in vitro*実験に変更した。具体的には、免疫不全マウスを用いる代わりに、通常マウスの精巣にGSCを移植し、その宿主精巣片を培養する方法に取り組んできており、継続中である。

(4) ヒトを含む多種ほ乳類のGSC の性質の解明と培養法の開発：ヒト、ブタ、ラットのGSC培養を継続的に試みているが、現在のところそれらGSCの培養下での増殖はラット以外では限定的であり、細胞株の樹立には至っていない。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。
(理由) *in vitro* 精子形成の開発という大きな目標を完成させて、*nature* 誌に発表できたことは予想外の成果であった。またマイクロドロップ培養法が GSC の培養に応用できることを見出した。これはニッチ候補因子の検定に役立ち今後につながると期待している。

4. 今後の研究の推進方策

上記のような研究の進捗状況に鑑み、今後2年間の研究計画を以下の3点に改編した。

(1) *in vitro* ニッチの分子機構の解明：*in vitro* ニッチの分子機構の解明のために、領域内での共同研究から得られる情報を元に候補分子を絞り、マイクロドロップ培養系を用いて GSC の維持・増殖への効果を判定してゆく。興味深い所見を示す分子に関しては、精巣組織の器官培養系においても培養液に添加し、その効果を GSC の維持・増殖と分化(精子形成)に関して検討してゆく。

(2) GSC 内シグナルとゲノム修飾の解析と培養法への応用：培養条件下での GSC の自発的分化を抑制し、GSC を高純度のまま維持培養する方法を開発するために以下の二つの研究を進める。①スクリーニングにより得られた情報からニッチ候補因子(細胞外因子)を絞り込み、それらにより伝達される GSC 内シグナルの解析を分子レベルで行う。その結果から現在の培養法をより効率よいものに改変する。②新たなアプローチとして幹細胞特異的ゲノム修飾を明らかにすることにより、これらゲノム修飾を制御する方法を開発し、より高純度な GSC 培養系を確立する。

(3) 精巣組織の器官培養法の改良：マウス以外の動物での汎用的な器官培養法を開発を目指す。また培養 GSC を移植した精巣を器官培養することにより、GSC から精子までの精子形成を *in vitro* で行う技術開発を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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5件)

①Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T: *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. **Nature** 471, 504-507 (2011)

②Araki Y, Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Araki Y, Ogawa T. Proliferation of Mouse Spermatogonial Stem Cells in Microdrop

Culture. **Biol Reprod.** 83, 951-957 (2010)

③Gohbara A, Katagiri K, Sato T, Kubota Y, Kagechika H, Araki Y, Araki Y, Ogawa T. *In Vitro* Murine Spermatogenesis in an Organ Culture System. **Biol Reprod.** 83, 261-267 (2010)

④Watanabe T, Hayashi H, Kita K, Kubota Y, Ogawa T. Ectopic porcine spermatogenesis in murine subcutis: tissue grafting versus cell-injection methods. **Asian J Androl.** 11, 317-323 (2009)

⑤Glaser S., Lubitz S., Loveland KL., Ohbo K., Robb L., Schwenk F., Seibler J., Roellig D, Kranz A., Anastassiadis K. and Stewart AF. : The histone3 lysine 4 methyltransferase, Mll2, is only required briefly in development and spermatogenesis. **Epigenetics & Chromatin** 2, 5 (2009).

[学会発表] (計5件)

①小川毅彦：「精子幹細胞の培養と *in vitro* 精子形成の進展」第55回日本生殖医学会総会／シンポジウム3「精子形成研究のあらたなるフロンティア：幹細胞から精子の品質まで」平成22年11月12日 徳島市あわぎんホール

②Ogawa T, Sato T, Katagiri K, Kubota Y. “*In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes.” Cold Spring Harbor Symposium on Germ Cells, 2010/10/08, New York, USA.

③Ohbo K. “Epigenetic difference between stem cells and progenitor cells in testes.” Advances in Epigenetics, Epigenome NoE and Chromatin Plasticity, 2010/05/13, San Feliu de Guixols, France

④大保和之、白川峰征、中島久仁子：「エピジェネティクスの視点から見た、精巣幹細胞維持と前駆細胞への分化メカニズム」第115回日本解剖学会総会・全国学術総会、平成22年3月30日 岩手、岩手県民会館、岩手水産会館

⑤小川毅彦：「*in vitro* にもニッチはあるか？」第80回日本動物学会・シンポジウム「配偶子幹細胞制御に関する研究の新展開」平成21年9月17日 静岡グランシップ