

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14890

研究課題名(和文)ドナー精子幹細胞の大量死メカニズムの解明による効率的移植技術の開発

研究課題名(英文)Understanding the mechanism of loss of mouse spermatogenic stem cell clones following transplantation.

研究代表者

中村 隼明(Yoshiaki, Nakamura)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・特別研究員

研究者番号：30613723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞は、不妊宿主の精巣内に移植すると精上皮を再構築できる。本研究の目的は、移植後に生着したマウス精子幹細胞のクローンが大量死を起こす原因を解明することである。ライブイメージング法による解析の結果、生着した精子幹細胞が細胞死を起こす様子が観察された。精子幹細胞の移植後の運命を解析した結果、生着した精子幹細胞のクローンはすべて自己複製するのではなく、大部分が分化することが示唆された。続いて、精子幹細胞の分化抑制が期待されるビタミンA欠乏マウスを用いて精子幹細胞の運命を解析した結果、精子幹細胞のクローンは分化して消失することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Spermatogenic stem cells (SSCs) can settle then reconstitute seminiferous epithelium following transplantation into infertile recipients. This study aimed to understand the cause of massive death of mouse SSC clones after settlement. Live-imaging study revealed that SSCs undergo cell death after settlement. Fate analysis suggested that major part of SSC clones undergo differentiation after settlement. Subsequent clonal fate analysis of SSCs in the testes of vitamin A-deficient recipient mice, that is expected to inhibit SSC differentiation, suggested that SSC clones undergo cell death after clonal differentiation.

研究分野：発生工学

キーワード：精子幹細胞 マウス 移植 大量死 分化

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は、精巣において大量の精子生産を支えている。マウスにおいて精巣を単一細胞に解離し、生殖細胞を除去した宿主精細管内に移植することにより、正常な精子形成のコロニーが生じ、ドナー精子幹細胞由来の産仔を得る技術が確立されている(引用文献①および②)。その後、精細管内移植法はニワトリやブタ、サル等で成功例が報告された(引用文献③、④、⑤)。このため精子幹細胞の移植は、雄性遺伝資源の保存とともに、ヒトの男性不妊治療への応用が期待されている。しかし、現状では精子幹細胞の移植効率は数百～数万個に1個と非常に低く(引用文献⑥)、これが実用化の障害となっている。このため、精子幹細胞の移植効率が低い原因を明らかにし、移植効率の向上を図ることは急務である。宿主マウス精巣の精細管内に移植された精子幹細胞は、血液精巣関門を通過して本来存在する基底膜上に到達し、その後精子形成のコロニーを作る。血液精巣関門が形成されていない幼若マウスへの移植では、成熟マウスを用いた場合と比較して効率が9.4倍高くなる(引用文献⑦)。このため、血液精巣関門の通過を伴う精子幹細胞の移動が、最終的な移植効率の主な障害になると考えられてきた。これに対して、研究代表者は、成体マウス精細管内に移植した精子幹細胞の運命を追跡する実験により、基底膜上に到達した精子幹細胞のクローンの大量死が最終的な移植効率の主な障害になることを予備的に見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、精子幹細胞の研究基盤が整備されたマウスをモデルに用いて、移植後に基底膜上に到達した精子幹細胞のクローンが大量死を起こす原因を解明し、これを制御することによって移植効率を向上させる技術の開発に挑戦することである。このため、本研究では、以下の2つの実験により、目的の達成を目指した。

(1) アポトーシスと精子幹細胞の細胞死の関連性

本実験は、移植後に基底膜上に到達した精子幹細胞そのものが細胞死を起こす可能性について検討することを目的とした。

マウスの精子形成は2つの異なる幹細胞集団によって支えられている。GFR α 1を発現する精原細胞サブセット(GFR α 1+細胞)は定常状態において自己複製する幹細胞集団である(引用文献⑧)。一方、GFR α 1+細胞から分化して生じるNgn3を発現する精原細胞サブユニット(Ngn3+細胞)は、定常状態では分化する運命にあるが、組織障害後の再生過程ではGFR α 1+細胞へ脱分化する潜在的な精

子幹細胞である(引用文献⑨および⑩)。宿主精細管内に移植した精原細胞において、細胞死が起きているか直接検討するために、麻酔下で維持した宿主マウス精巣におけるドナー精原細胞の挙動を、ライブイメージング法(引用文献⑪)を用いて連続観察した。

続いて、細胞死、とりわけアポトーシス経路に関連する因子の発現と、その機能を解析することにより、アポトーシスと精子幹細胞の細胞死の関連性について検討した。

(2) 分化と精子幹細胞のクローン消失の関連性

本実験は、移植後に基底膜上に到達した精子幹細胞のクローンが分化して細胞死を起こす可能性について検討することを目的とした。

宿主マウス精細管内に移植した精子幹細胞のクローンが分化するか検討するために、その運命を単一細胞の分解能で追跡した。

続いて、精子幹細胞の分化が抑制されることが期待される宿主マウスを作製し、精子幹細胞の移植後のクローンの運命を解析することにより、分化と精子幹細胞のクローン消失の関連性について検討した。

3. 研究の方法

(1) アポトーシスと精子幹細胞の細胞死の関連性

ライブイメージングによる解析では、ユビキタな遺伝子プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する遺伝子改変マウス(UBI-EGFP)の精巣を単一細胞に解離し、精子形成不全のW/W^vマウス精細管内に移植した。宿主マウスを麻酔下で維持し、形態学的に精原細胞と認められたGFP+細胞の挙動を移植4日後から約3日間連続観察した。

これまでに、アポトーシス誘導因子であるBax(引用文献⑫)やアポトーシス抑制因子であるBcl-2(引用文献⑬)が、マウス精原細胞のアポトーシスに関連することが報告されている。そこで、これらの遺伝子の下流シグナルであるCaspase 3に特に注目し、その発現を解析した。

野生型マウスの精巣より調整した精巣細胞を、ブスルファン(100ng/ml)の投与により不妊化した宿主マウス精細管内に移植した。研究代表者は、移植後に基底膜上に到達した精子幹細胞クローンの消失は移植後2~6日の期間に高頻度で起こることを予備的に見出している。そこで、この期間に宿主マウス精細管を採材し、Whole-mount免疫染色法を用いてGFR α 1+細胞における活性型Caspase-3ならびにその他アポトーシス関連遺伝子の発現を解析した。

続いて、アポトーシスの誘導経路に特異的に作用する阻害剤を系統的に検討した。特に、

多くの Caspase の活性を非特異的かつ不可逆的に阻害する阻害剤 Z-VAD-FMK や、ヒト胚性幹 (ES) 細胞の解離に伴うアポトーシスに効果がある Y-27632 (引用文献⑭) に注目して検討した。UBI-EGFP マウスより調節した精巣細胞の懸濁液に各種阻害剤を添加し、ブスルファン処理マウス精細管内へ注入した。移植 60 日後の宿主精巣を採材し、精細管 Whole-mount 免疫染色後、GFP+コロニーの総数を計測することにより、細胞死の回復を測定した。

(2) 分化と精子幹細胞のクローン消失の関連性

タモキシフェンの投与によって、GFR α 1+細胞を不可逆的に GFP 標識できる二重遺伝子改変マウス (GFR α 1-CreER^{T2}; CAG-CAT-EGFP) より調整した精巣細胞を、ブスルファン処理マウス精細管内に移植した。移植後 2~6 日間の期間に宿主精巣を採材し、精細管 Whole-mount 免疫染色を行った。GFP+クローンのうち、GFR α 1+細胞および Ngn3+細胞 (精子幹細胞) を 1 個も含まないクローンの数を測定した。同様に、Ngn3+細胞の移植後の運命についても、Ngn3-CreERTM; CAG-CAT-EGFP 二重遺伝子改変マウスを用いて解析した。

ほ乳類では、レチノイン酸が精子幹細胞の分化を誘導する (引用文献⑮)。げっ歯類では、レチノイン酸前駆体であるビタミン A 除去食による飼養でビタミン A 欠乏が誘導される。ビタミン A 欠乏状態では精子幹細胞の分化が停止し、ビタミン A 投与により再開する (引用文献⑯)。タモキシフェン投与した Ngn3-CreERTM; CAG-CAT-EGFP 二重遺伝子改変マウスより調整した精巣細胞を、ブスルファン処理したビタミン A 欠乏マウス精細管内に移植した。移植 10 日後に採材した精細管を Whole-mount 免疫染色し、GFR α 1+細胞および Ngn3+細胞を含む GFP+クローン数を測定した。

4. 研究成果

(1) アポトーシスと精子幹細胞の細胞死の関連性

ライブイメージングによる解析の結果、単独あるいは細胞間橋により連結した合胞体の精原細胞における GFP の発現が消失する様子が観察された。本実験では、全身で GFP 発現するマウスの精巣細胞を移植したことから、上記の GFP シグナルの消失は細胞死であることが示唆された。この GFP シグナルの消失は、~数時間と極めて短時間で起こっていた。この結果から、移植後に基底膜上に到達した精原細胞の細胞死は、極めて短時間で起こると考察された。

続いて、免疫組織化学的手法による解析の結果、移植後に基底膜上に到達した GFR α 1+

細胞において活性化型 Caspase-3 等のアポトーシス関連遺伝子の発現はほとんど観察されなかった。また、Z-VAD-FMK や Y-27632 等これまでに細胞死を抑制する効果が報告されている薬剤を様々な濃度と組み合わせでドナー精巣細胞の懸濁液に添加して、宿主精細管内に移植した。移植 60 日後の GFP+コロニー数および長さを比較検討した結果、今回検討した薬剤はコロニー形成に影響を及ぼさなかった。

(2) 分化と精子幹細胞のクローン消失の関連性

精子幹細胞の移植後のクローンの運命を単一細胞の分解能で解析した。その結果、GFR α 1+細胞あるいは Ngn3+細胞を 1 個も含まないクローンの割合は、GFR α 1+標識細胞に由来するクローン全体の約 20%、Ngn3+標識細胞に由来するクローン全体の約 80%であった。この結果より、移植後に基底膜上に到達した精子幹細胞はすべて自己複製するのではなく、分化することが示唆された。また、Ngn3+細胞のクローンはより分化しやすい性質を持つことが示唆された。

続いて、Ngn3+細胞の分化が抑制されることが期待されるビタミン A 欠乏マウス精細管内に、Ngn3 標識細胞を移植した。その結果、GFR α 1+細胞あるいは Ngn3+細胞を 1 個でも含むクローンの割合は、コントロールと比較して約 4 倍増加した。また、このマウスにビタミン A を投与することにより、一部の GFP+クローンにおいてレチノイン酸応答遺伝子である Stra8 の発現が観察された。これらの結果から、移植後の環境においても定常状態同様に、精子幹細胞の分化はレチノイン酸によって誘導されることが示された。また、興味深いことに、ビタミン A 欠乏宿主マウス精巣における GFP+クローンの数は、コントロールと比較して有意に増加していた。この結果から、移植後の精子幹細胞の分化を抑制することによって、クローンの消失 (細胞死) が間接的に抑制されることが示唆された。

(1)および(2)の結果より、宿主マウス精細管内へ移植後に基底膜上に到達した精子幹細胞のクローンは、精子幹細胞そのものの細胞死と、分化後に起こる細胞死によって消失することが明らかにされた。

前者の細胞死については、その分子基盤を本研究期間内では明らかにすることができなかった。このため、今後はアポトーシス経路についてさらに詳細に検討することを計画している。また、アポトーシス以外の細胞死の経路についても検討する予定である。

後者の細胞死の発見は、移植後に基底膜上に到達した精子幹細胞はすべて自己複製するという定説を覆すものである。給餌によるビタミン A 欠乏誘導以外の簡便な方法を開発することが今後の課題である。

<引用文献>

- ① Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 91: 11298-11302. (1994)
- ② Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 91: 11303-11307. (1994)
- ③ Trefil P, Micáková A, Mucksová J, Hejnar J, Poplstein M, Bakst MR, Kalina J, Brillard JP. Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken. *Biology of Reproduction*, 75: 575-581. (2006)
- ④ Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pig. *Biology of Reproduction*, 66: 21-28. (2002)
- ⑤ Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G, Peterson K, Masterson K, Ramsey C, Ward T, Lienesch M, Volk A, Cooper DK, Thomson AW, Kiss JE, Penedo MC, Schatten GP, Mitalipov S, Orwig KE. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*, 11: 715-726. (2012)
- ⑥ Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction*, 69: 612-616. (2003)
- ⑦ Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 98: 6186-6191. (2001)
- ⑧ Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, Suzuki M, Yamamoto M, Simons BD, Yoshida S. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell*, 14: 658-672. (2014)
- ⑨ Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Developmental Cell*, 12: 195-206. (2007)
- ⑩ Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE, Yoshida S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science*, 328: 62-67. (2010)
- ⑪ Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, 317: 1772-1776. (2007)
- ⑫ Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 66: 950-958. (2002)
- ⑬ Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development*, 122: 1703-1709. (1996)
- ⑭ Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7: 225-239. (2010)
- ⑮ Sugimoto R, Nabeshima Y, Yoshida S. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mechanisms of Development*, 128: 610-624. (2012)
- ⑯ Morales C, Griswold MD. Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology*. 121: 432-434. (1987)
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0件)
- 〔学会発表〕 (計5件)
- ① 中村隼明, 今弥生, 吉田松生. マウス精子形成における潜在的幹細胞の移植後の振舞い. 日本畜産学会第122回大会, 神戸大学, 神戸市, 兵庫県, 2017年3月29日
- ② Yoshiaki Nakamura, Shosei Yoshida. Post-transplantation fates of individual mouse spermatogenic stem cells. Cold Spring Harbor Laboratory 2016 Meeting on Germ Cells, Cold Spring Harbor Laboratory, Laurel Hollow, NY,

USA, 6 October 2016

③ 中村隼明, 今弥生, 吉田松生. 移植したマウス精子幹細胞は多様な運命をたどる. 日本畜産学会第 121 回大会, 日本獣医生命科学大学, 武蔵野市, 東京都, 2016 年 3 月 29 日

④ Yoshiaki Nakamura, Shosei Yoshida. Post-transplantation dynamics of mouse spermatogenic stem cells: For improvement of its transplantation efficiency. The 12th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam. 27 November 2015

⑤ 中村隼明, 今弥生, 吉田松生. 移植環境下における精子幹細胞の自己複製と分化のバランスの継時的変化. 第 108 回日本繁殖生物学会大会, 宮崎大学, 宮崎市, 宮崎県, 2015 年 9 月 19 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 隼明 (Nakamura, Yoshiaki)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・特別研究員

研究者番号 : 3 0 6 1 3 7 2 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし