

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02507

研究課題名(和文)精子形成に至る生殖細胞の選択と競合の解明

研究課題名(英文) Germ cell selection and competition leading to spermatogenesis

研究代表者

吉田 松生 (YOSHIDA, Shosei)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授

研究者番号：60294138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は、次世代に遺伝情報を伝える重要な役割を持つ。発生期に生まれた生殖細胞は、多段階の選択や競合を経て、その一部のみが精子や卵となると示唆されていたが、詳細は不明であった。本研究では、マウス精子形成において、生後の性成熟過程および性成熟期を通して起こる選択や競合を解析した。性成熟期に未熟な前駆細胞から幹細胞を生じる時、幹細胞とならずに分化し、実質的に次世代に寄与しない細胞集団を同定した。性成熟期には、幹細胞が細胞外因子をお互いに競合することで数を一定に維持することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両親から受け継いだ遺伝情報は、細胞分裂に伴って低い確率で変化する。遺伝情報の変化が子孫に伝わることは、次世代で遺伝病を生じたり、種の進化を生み出すことになる。本研究の結果は、生殖細胞集団のうち精子となって子孫に伝わる生殖細胞が残るプロセスの理解を進め、これらの重要な問題に対する重要な手がかりを与える。

研究成果の概要(英文)：Germ cells inherit genetic information to the next generation. Although it was implicated that only a fraction of germ cells generated during development give rise to mature sperm or oocytes, little is known about this important process. In this study, the process of selection and/or competition of germ cells have been analyzed during postnatal puberty and sexually matured adulthood. During puberty, when primitive progenitors give rise to stem cells, we identified prospectively a cell population that directly differentiate to sperm without experiencing the stem cells, barely contributing to the next generation. During adulthood, we found a novel mechanism of stem cell competition for limited extracellular factors to achieve the constant stem cell number.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞・組織 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は配偶子（すなわち精子や卵）を作る細胞で、次世代に遺伝情報を伝えると言う重要な役割を持つ。哺乳類では、生殖細胞は、胚発生期に始原生殖細胞として生まれるが、その全てが等しく配偶子となるのではなく、多段階の選択や競合を経て、その一部のみが精子や卵となると示唆されていた。両親から受け継いだ遺伝情報は、細胞分裂に伴って低い確率で変化する。遺伝情報の変化が子孫に伝わることは、次世代で遺伝病を生じたり、種の進化を生み出すことになる。生殖細胞集団のうち、精子となって子孫に伝わる生殖細胞がどのようなプロセスを経て決まるのかは、この生殖細胞の本質に関わる重要な問題である。しかし、その詳細は不明であり、本研究はその解明を目指して立案された。

2. 研究の目的

マウス雄において、始原生殖細胞が他段階の発生プロセスを経て精子形成に至るまでに経験する、選択あるいは競合を解析しそのメカニズムを明らかにすることを、具体的な研究目的とした。特に、生後の性成熟過程および成体の性成熟期を通して起こる選択や競合に焦点を絞り、それぞれの過程で、生殖細胞集団の中のどのような細胞がどのようなメカニズムによって、配偶子となって高い確率で次世代を生み出すものとそうでないものが生じるのかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 生後の性成熟過程では、出生時の精巣に存在する未熟な生殖細胞ゴノサイトの集団から、4-6週間の間に、幹細胞から最終分化した成熟精子までの全ての段階の細胞が存在する成体の精子形成が成立する。その時に、幹細胞になる細胞と同時に、幹細胞の段階を経ずに直接分化する細胞が存在することを、研究代表者らは見出していた (Development 2006)。本研究では、この過程でどのような性質の細胞がどのような時間経過で出現するかを調べた。ついで、特徴ある発現を示す遺伝子を利用してタモキシフェン依存性 Cre リコンビナーゼを特異的に発現させ、その細胞を不可逆的に標識 (パルスラベル) し、その運命を追跡した。以上により、幹細胞になるものとならない細胞の運命が別れる過程を解析した。

(2) 性成熟した成体が恒常的に精子を作り出す過程は、精子幹細胞がバランスのとれた自己複製と分化を継続することによってその数を一定に維持し続けることによって成り立っている。研究代表者らは、パルス標識実験と数理生物学的解析により、GFR α 1+細胞が精子幹細胞として機能すること、精子幹細胞はお互いに中立競合の関係にあり、数を増やして高い確率で子孫に伝わる幹細胞と、分化して幹細胞集団から消えて低い確率でしか子孫に伝わらないものが存在することを明らかにしていた (Developmental Cell 2007, Cell Stem Cell 2010, 2014)。しかし、この中立競合がどのようなメカニズムによって起こるのか、どのような幹細胞が高い確率で残るのかは不明であった。本研究では、精子幹細胞の自己複製と分化を制御する細胞外因子を同定、その変異体における幹細胞の挙動を定量的に解析し、数理モデルを用いることで上記の問いにアプローチした。

4. 研究成果

(1) 生後の性成熟過程では、均一と考えられている前駆細胞 (ゴノサイト) だけが含まれる出生直後から、幹細胞と分化細胞が恒常的に共存して安定した精子形成が起こる定常状態が作られるまでの数週間のプロセスを、生殖細胞の不均一性と系譜に注目して解析して、以下の結果を得た (論文準備中)。

まず蛍光免疫染色法を用いて、出生後初期の幼若精巣において、前駆細胞の示す遺伝子 (タンパク質) 発現の不均一性を解析した。この時、解析が先行している成体の知見に基づいて、幹細胞及びそこから分化に向かった細胞が発現する鍵となる遺伝子群を解析した。その結果、発達段階の精巣では、これらの遺伝子の発現が成体 (定常状態にある成熟精巣) と異なるパターン (頻度及び組み合わせ) を示すことが明らかとなった。精子形成の形成期には、成体では見られない性質の細胞が一過性に出現すること、言い換えると、発生期の現象を成熟期の知見を外挿して理解することの限界を示すもので興味深い。

ついで、これらの遺伝子のうちの一つに注目し、薬剤 (タモキシフェン) 依存性 Cre リコンビナーゼのシステムを利用して、タモキシフェン投与によって、その時に当該遺伝子を発現する細胞を特異的にマーカー (GFP) で標識できる遺伝子改変マウスを作出した。このマウスに、幼若期の異なるタイミングでタモキシフェンを投与し、パルス標識された細胞の運命を追跡した。その結果、発達期の精巣で最初に分化して生後6週頃に最初の精子となる、いわゆる first wave spermatogenesis (精子形成の第1波) に高率で寄与する一方で、その後数年を超えて

続く長期間の精子形成への寄与は著しく低いことが分かった。

以上の結果は、幼若精巣においてこの遺伝子を発現する細胞は、精子となって次世代を生み出す能力を持つにもかかわらず、精子幹細胞には寄与しないため、次世代を生み出す確率は非常に低いことを示唆する。このような運命の方向づけのごく初期の遺伝子発現の違いを見出した、興味深い知見と考えている。

(2) 性成熟した成体が恒常的に精子を作り出す過程を支える幹細胞の競合については以下のような解析を行い、新規のメカニズムを提唱するに至った (Cell Stem Cell 2010)。

まず、精子幹細胞は精巣を構成する精細管組織の中で血管の近くを特に好んで動き回ること、その結果血管の近くでは幹細胞の密度が高いという、研究代表者らによる知見 (Science 2007) に基づき、血管近傍で発現の高い遺伝子を、マイクロダイセクション法によって網羅的に検索し、in situ hybridization 法および免疫染色法を用いてその発現を解析した。その結果、線維芽細胞増殖因子 (FGF: 具体的には FGF5, FGF8, FGF4) が、精細管を外から取り囲むリンパ内皮細胞で発現すること、精子幹細胞が FGF を細胞内に取り込んで消費していることを示唆する結果を得た。先行研究により、FGF は精子幹細胞の増殖を促すシグナル分子として作用することが示されている。FGF を多く取り込んだ精子幹細胞は自己複製しやすくなるとともに分化しにくくなると考えられるが、培養精子幹細胞を用いてこれを支持する結果が得られた。さらに、FGF 遺伝子の機能喪失変異体および過剰発現変異体の精巣を解析したところ、FGF 遺伝子量と精子幹細胞数が直線的に相関することを見出した。

次いで、以上の結果をもとに、幹細胞数を一定に保つホメオスタシスのメカニズムを数理生物学的に解析した。その結果「一定量作られる FGF を精子幹細胞が取り込み、取り込んだ FGF 量に応じて自己複製と分化の確率が変化する」という極めてシンプルなメカニズムを想定することによって、多くの実験結果を定量的に説明することができた。さらにこの数理モデルは、薬剤を投与して精子幹細胞の一部を残して殺した後に、残った精子幹細胞が活発に分裂して通常の数を超えた後に増加と減少を繰り返して定常状態の値に収束するという観察結果も定量的に予測し、上記のメカニズムの蓋然性が支持された。

以上の結果から、「自己複製を促進する細胞外の因子を幹細胞が取り込むことでお互いの競合関係が生じ、幹細胞プールに残るか分化するかという運命の振り分けが起こる」という新規のメカニズム、すなわち migogen competition model を提唱した。このモデルは、幹細胞が特異的に局在する明確な構造を持った「閉じた幹細胞ニッチ」で非対称分裂を行うと言う古典的な幹細胞の姿とは異なり、「開かれたニッチ」で散らばって動き回っている幹細胞の数を一定に保つメカニズムを容易に説明することができる。ほ乳類骨髄の造血幹細胞など、幹細胞が散らばっている例は他にも知られており、作用している分子は違っても多くの組織幹細胞が同じ原理で制御されている可能性を提示する、重要な知見と考えている。

またこの結果は、FGF を効率よく取り込んで効率よく増殖する幹細胞が、幹細胞間の競合を優位に勝ち残り、高い確率で次世代に伝わる可能性を示唆する。実際ヒトにおいて、FGF 受容体の優性変異を持つ精子の割合が加齢とともに増加すること、その変異に由来する遺伝疾患の有病率が父の年齢とともに指数関数的に上昇することが示されている。この、本研究の結果と符合する知見は、次世代に伝わる変異に対して、成体精巣における幹細胞同士の競合がバイアスを与えていることを示唆するもので、重要な意味を持つと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Y. Kitadate, D.J. Jorg, M. Tokue, A. Maruyama, R. Ichikawa, S. Tsuchiya, E. Segi-Nishida, T. Nakagawa, A. Uchida, C. Kimura-Yoshida, S. Mizuno, F. Sugiyama, T. Azami, M. Ema, C. Noda, S. Kobayashi, I. Matsuo, Y. Kanai, T. Nagasawa, Y. Sugimoto, S. Takahashi, B.D. Simons and S. Yoshida	4. 巻 24
2. 論文標題 Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.11.013	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 該当する
1. 著者名 S. Sakamoto, D. Thumkeo, H. Ohta, Z. Zhang, S.R. Huang, P. Kanchenawong, T. Fuu, S. Watanabe, K. Shimada, Y. Fujihara, S. Yoshida, M. Ikawa, N. Watanabe, M. Saitou and S. Narumiya	4. 巻 16
2. 論文標題 mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plos Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.2004874	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 該当する
1. 著者名 H.H. Shawk, H. Oishi, T. Usui, Y. Kitadate, W.A. Basha, A.M. Abdellatif, K. Hasegawa, R. Okada, K. Mochida, H.A. El-Shemy, M. Muratani, A. Ogura, S. Yoshida and S. Takahashi	4. 巻 13
2. 論文標題 MAFB is dispensable for the fetal testis morphogenesis and the maintenance of spermatogenesis in adult mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.2004874	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 該当する
1. 著者名 M. Tokue, K. Ikami, S. Mizuno, C. Takagi, A. Miyagi, R. Takada, C. Noda, Y. Kitadate, K. Hara, H. Mizuguchi, T. Sato, M. M. Taketo, F. Sugiyama, T. Ogawa, S. Kobayashi, N. Ueno, S. Takahashi, S. Takada and *S. Yoshida	4. 巻 8
2. 論文標題 SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/ -catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 561-575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2017.01.006	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 該当する

1. 著者名 S. Yoshida	4. 巻 135
2. 論文標題 Heterogeneous, dynamic, and stochastic nature of mammalian spermatogenic stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Top Dev Biol	6. 最初と最後の頁 245-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1016/bs.ctdb.2019.04.008	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 S. Yoshida	4. 巻 60
2. 論文標題 Open niche regulation of mouse spermatogenic stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 542-552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12574	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 吉田松生
2. 発表標題 マウス精子形成幹細胞の気ままな振る舞いとその制御
3. 学会等名 2019遺伝研研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Open niche regulation of spermatogenic stem cells in the mouse testis.
3. 学会等名 The 5th Conference of Frontiers in Reproductive Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Rapid and robust seasonal breeding in Japanese quail supported by unique process of spermatogenesis.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Towards a Better Understanding of Spermatogenic Stem Cells.
3. 学会等名 The Society for the Study of Reproduction 51st Annual Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Sperm stem cells: their context-dependent behavior.
3. 学会等名 ISSCR 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Flexible and stochastic behavior of spermatogenic stem cells.
3. 学会等名 The 20th European Testis Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田松生
2. 発表標題 精子を作る細胞たち：個のランダム性が集団を支える
3. 学会等名 大隅基礎科学創成財団「第二回創発セミナー」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田松生
2. 発表標題 組織恒常性を支える幹細胞の動的不均一性をマウス精子形成に学ぶ
3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会シンポジウム「動的不均一性がもたらす多細胞社会の秩序形成」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Cell-intrinsic mechanism underlies the SSC fate selection between differentiation and self-renewal in an open niche environment of seminiferous tubules.
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Dynamics of Spermatogenic Stem Cells in the Open Niche Environment.
3. 学会等名 “Germinal Stem Cell Biology” Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Competition for FGFs yields robust homeostasis in the density of mouse spermatogenic stem cells.
3. 学会等名 “Advances in Stem Cells and Regenerative Medicine” EMBO Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Stem cell dynamics and its regulation underlying the persistent mouse spermatogenesis.
3. 学会等名 “Symposium 10: Germ Cell” The annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田松生
2. 発表標題 精子形成幹細胞の集団動態とそれを支える“開放型”ニッチ
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナーK5<組織を支える幹細胞と微小環境(ニッチ)> (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Yoshida
2. 発表標題 Density regulation of spermatogenic stem cells by FGFs in the mouse seminiferous tubules.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 S. Yoshida	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	5. 総ページ数 -
3. 書名 Mouse spermatogenesis reflects the unity and diversity of tissue stem cell-niche systems.	

1. 著者名 S. Yoshida	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Japan KK, part of Springer Nature	5. 総ページ数 789
3. 書名 Regulatory mechanism of spermatogenic stem cells in mice: their dynamic and context-dependent behavior: Part Diversity in Reproductive Strategies and Germ Cell Differentiation Mechanisms, Animal Diversity and Generality, "Reproductive and Developmental Strategies"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

基礎生物学研究所 吉田研究室 http://www.nibb.ac.jp/germcell/

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
連携研究者	北館 祐 (KITADATE Yu) (10455214)	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教 (63904)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中川 俊徳 (NAKAGAWA Toshinori) (50456894)	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教 (63904)	
連携研究者	平 誠司 (HIRA Seiji) (40759619)	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・NIBBリサーチフェ ロー (63904)	