

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07424

研究課題名(和文) 単一細胞解析による精子幹細胞システムの可塑性の解明

研究課題名(英文) Single cell analysis of plasticity of mouse sperm stem cells

研究代表者

中川 俊徳 (Toshinori, Nakagawa)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教

研究者番号：50456894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて、分化にprimeした精子幹細胞であるPotential Stem Cellが再生時に予定運命を転換し、実際に自己複製を行うActual Stem Cellへと「逆戻り」する。本研究では、この制御機構を、単一細胞の遺伝子発現解析技術を用いて解明を試みた。Fluidigm C1とBiomark HDシステムを用い、また最新の報告も考慮し、転写因子であるEomes遺伝子に着目し研究を進めた。現在のところ培養精子幹細胞に強制発現を行う実験、定常状態での遺伝子破壊実験では著明な影響は見られていない。今後再生過程での機能解析が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの精子幹細胞は、絶え間なく精子を作り続ける。精子幹細胞を含む生殖細胞が傷害された後に起こる再生時には、本来分化するはずだった細胞が、その運命を転換することで再生が促進される。しかし、どのようなプログラムが働くのか不明であった。今回、それに関与する候補の遺伝子を選定し、その機能解析を行った。本研究は、将来的にどのような分子メカニズムで幹細胞集団が元に戻るのかと言う問題を解く糸口になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the molecular process of reversion from potential stem cells, primed for differentiation, to actual stem cells, actually self-renew in steady-state condition using single-cell transcriptome analysis. Based on analysis by Fluidigm C1 and Biomark HD system and recent reports, T-box transcription factor Eomes is one of the candidate gene involving the reversion process. For now, apparent effects of overexpression of Eomes on gene expression in cultured sperm stem cells and its loss of function on stem cell number under the physiological condition have not been observed, and therefore investigation of the effect under the regeneration process will be needed.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 精子 生殖細胞 シングルセル解析 マウス

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類において、精子は生涯を通じて恒常的に産生され続ける。これは、精子幹細胞という精巣にごくわずかに存在する未分化な細胞集団が、自らを安定的に維持し、かつ分化細胞を作り続けることにより実現される。申請者は、漠然と「精子幹細胞」と呼ばれていた細胞集団が、機能的に異なる二つの集団より構成されていることを示した。すなわち、傷害のない正常の精巣において実際に自己複製を行う「Actual Stem Cell (ASC)」と、正常の精巣では自己複製せず分化するが、幹細胞能は保持している「Potential Stem Cell (PSC)」である。通常の精子形成では ASC から PSC が生み出され、ついで PSC は分化型の細胞となり最終的に精子になる。しかし、傷害後の再生時の精巣では PSC は自己複製を行い ASC へと戻ることができる。このような、PSC ASC への「逆戻り」という現象は、精子形成を安定的に保つ仕組みの一つと考えられる。すなわち、細胞の状態が状況により変化し柔軟に対応することで、「組織恒常性」が適切に維持されると考えられる。

しかし、「逆戻り」という現象が存在することはわかっているが、「PSC が ASC へと移行する過程において、PSC にどのような状態の変化が起こるのか、またその過程を制御する分子機構は全く分かっていない」。その原因は解析の難しさにある。再生時には PSC ASC への逆戻りに加え、ASC から PSC への通常の移行もあると考えられるからである。すなわち、多数の細胞をまとめて回収し、解析すると両方が混在した平均の結果しか得られない。そこで、本研究では、申請者が開発した PSC を標識し追跡する技術と、近年目覚ましい進歩を遂げている単一細胞のトランスクリプトーム解析を組み合わせることで、PSC ASC への移行に伴う状態の変化や、移行を制御する分子機構を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、PSC が予定運命を転換し ASC へと「逆戻り」する移行過程において、単一細胞の遺伝子発現解析技術を用い、PSC に起こる状態の変化（多数の遺伝子発現の変化）とその過程を制御する分子機構を解明する。

3. 研究の方法

正常な精子形成での ASC から PSC への移行に伴う細胞の状態の変化（多数の遺伝子の発現の変化）を調べるために、単一細胞のトランスクリプトーム解析を用いた。用いた細胞分画は、ASC と PSC を含む、E-Cadherin 陽性、CD9 陽性、Kit 陰性の成体マウスの生殖細胞分画を用いた。研究を開始した当時に最高感度で遺伝子発現を検出でき、また遺伝子発現の差を再現性良く検討できる、マイクロフリューディスクを用いたシングルセル核酸調整システム Fluidigm C1 system と同じくマイクロフリューディスクを用いた高並列リアルタイム qPCR である Biomark HD を組み合わせ、詳細な遺伝子発現解析を行った。

再生過程での、PSC ASC の移行に伴う細胞の状態の変化を同様に検討した。再生を起こすために、アルキル化剤であるブスルファンを低量マウス投与し、一部の幹細胞を傷害し、再生を誘導した。その後、PSC ASC の移行に関与する候補遺伝子を検索し、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) ACS と PSC に特異性が高く発現する遺伝子発現をマイクロアレイにて検討し、約 100 遺伝子を選定した。それぞれのプライマーを設計し、数細胞より良好な増幅を行うプライマーセットを作成した。これらを用いて、定常状態における単一細胞の遺伝子発現解析を行った。その結果、検出感度も高く標的遺伝子の大多数は実際の単一細胞から検出が可能であることがわかった。定量性も正確であり、おおよそ予想された結果と一致した。

そこで再生状態において、遺伝子発現がどのように変化しているかを検討するために、まずは正常な状態の細胞を用いてリファレンスとなる遺伝子発現のマップを作成し、再生状態の遺伝子発現と比較した。今回の実験結果及び既報の研究から T-box 転写因子である *Eomes* に注目し、研究を進めた。

Eomes については、本研究の開始後に二つのグループからその発現が報告された。しかし、定常状態及び再生状態における機能については検討されていない。定常状態における *EOMES* の発現を検討するために、切片及びホルマウント試料を用いた免疫染色を行った。その結果、生殖細胞とセルトリ細胞の一部に発現していた。生殖細胞は、ASC が含まれる GFRa1 陽性集団の一部に発現していた。さらに、GFRa1 陽性細胞の中でも、未分化な形態を持つ細胞集団に特に発現が認められた。

次に機能を検討するために、DBA2 系統の生後 8 日齢のマウス精巣を用いて培養精子幹細胞を初代培養し、*Eomes* をトランスフェクションにて強制発現した。その後、FACS にてトランスフェクションされた細胞を回収し、網羅的解析を行ったが、少なくとも主要な精子幹細胞で機能している遺伝子については大きな変化はなかった。

次に生理的条件下における *Eomes* の機能を解析した。そのために *Eomes* を条件的に破壊できる *Eomes* flox マウスと、タモキシフェンの投与によって Cre レコンビナーゼ活性が制御できる UBCCreER を掛け合わせた。成体マウスにタモキシフェンを連続投与し、2 ヶ月後に解析を行った。GFRa1 陽性集団を FACS にて回収し、qRT-PCR にてデザイン通り *Eomes* の遺伝子発現が著減していることを確認した。しかし、残念ながら GFRa1+細胞の減少は見られなかった。また、形態的特徴など現時点では著明な変化は観察されていない。生殖細胞特異的に Cre レコンビナーゼが発現する *Nanos3Cre* においても、同様の実験結果であった。今後、プスルファン投与後の再生過程における機能を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yeh Yu-Han, Hu Mengwen, Nakagawa Toshinori, Sakashita Akihiko, Yoshida Shosei, Maezawa So, Namekawa Satoshi H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Isolation of Murine Spermatogenic Cells using a Violet-Excited Cell-Permeable DNA Binding Dye	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	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） 10.3791/61666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitadate Y., Jorg DJ., Tokue M., Maruyama A., Ishikawa R., Tsuchiya S., Segi-Nishida E., Nakagawa T., Uchida A., Kimura-Yoshida C., Mizuno S., Sugiyama F., Azami T., Ema M., Noda C., Kobayashi S., Matsuo I., Kanai Y., Nagasawa T., Sugimoto Y., Takahashi S., Simons BD., Yoshida S.	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 79 ~ 92.e6
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshinori Nakagawa, David J Jorg, Benjamin D Simons, Takashi Nagasawa, Shosei Yoshida
2. 発表標題 Quantitative flux analysis of multistate spermatogenic stem cells in homeostasis
3. 学会等名 Cold Spring Harbor meeting: Germ Cells (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshinori Nakagawa
2. 発表標題 Plvap expression revealed that regular division and stochastic state transition coordinate the maintenance of mouse spermatogenic stem cell pool
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshinori Nakagawa, David Jorg, Ben Simons, Takashi Nagasawa, Shosei Yoshida
2. 発表標題 Mouse spermatogenic stem cells interconvert between different states at the top of differentiation hierarchy
3. 学会等名 Cold Spring Harbor meeting: Germ Cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinori Nakagawa, David Jorg, Ben Simons, Takashi Nagasawa, Shosei Yoshida
2. 発表標題 Spermatogenic stem cells interconvert between different states at the top of differentiation hierarchy
3. 学会等名 日本発生物学会 秋季シンポジウム 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関