

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17690

研究課題名(和文) 未分化精原細胞の制御におけるWntシグナルの役割

研究課題名(英文) The role of Wnt signaling underlying the regulation of undifferentiated spermatogonia

研究代表者

高瀬 比菜子 (Takase, Hinako M)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：40754528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、セルトリ細胞とライディッヒ細胞由来のWntが未分化型精原細胞制御に果たす役割を検証した。遺伝子改変(Wls cKO)マウスでは精巣重量が減少し、一部精子形成異常が見られた。しかし予想外にWls cKOマウスでは未分化型精原細胞には顕著な変化は見られず、一方で分化型精原細胞の減少が観察された。セルトリ細胞とライディッヒ細胞由来のWntはオートクリン型もしくは筋様細胞に作用し間接的に精子形成を支えている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精細管内唯一の体細胞であるセルトリ細胞は、全ての分化段階にある生殖細胞を物理的に支持すると同時に、未分化精原細胞の自己複製と分化を調節する。セルトリ細胞とライディッヒ細胞が産生するWntリガンドは未分化精原細胞へ直接的に作用するという証拠は得られなかったが、その一方で、体細胞もしくは精巣網の機能維持に関与し、間接的に精子形成を支えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tested the role of Sertoli and Leydig cell-derived Wnt in the regulation of undifferentiated spermatogonia. Genetically modified (Wls cKO) mice showed reduced testicular weight and abnormal spermatogenesis partially. In Wls cKO mice, no significant changes in undifferentiated spermatogonia were detected, while there was a reduction of differentiated spermatogonia. It is possible that Sertoli and Leydig cell-derived Wnt ligands may act on autocrine manner or myoid cells and to indirectly support spermatogenesis.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 Wntシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

健康な男性では一生にわたって精子を産生し続けることが可能である一方で、造精子障害による男性不妊に悩む夫婦も多い。持続的な精子発生が行われるためには、精子幹細胞の自己複製・細胞増殖・分化のバランスを保つ制御機構が必須である。

精細管内唯一の体細胞であるセルトリ細胞は、全ての分化段階にある生殖細胞を物理的に支持すると同時に、精子幹細胞の自己複製と分化を調節する。また、精細管周囲の体細胞群(ライディッヒ細胞・筋様細胞)も精子発生に寄与すると考えられている。したがって、精子幹細胞制御を理解するには精子幹細胞-体細胞間の相互作用を解明することが重要である。

2. 研究の目的

申請者は、精子幹細胞を含む未分化型精原細胞で古典的 Wnt シグナルが活性化していることを見だし、この集団の細胞増殖に Wnt シグナルが未分化型精原細胞の細胞増殖が寄与する可能性を示した(引用文献)。しかしながら、19 種類存在する Wnt リガンドのいずれが精子幹細胞制御に機能しているか、どの細胞が Wnt 産生を担っているのかに関しては不明であった。一般的に Wnt シグナルはパラクリン型かつ局所的に作用する傾向が強いことが知られている。申請者は、*in situ* hybridization (ISH) により精巣内の体細胞群(セルトリ細胞・ライディッヒ細胞)が Wnt6 を分泌していることを報告している。さらに、精子幹細胞の存在する精細管基底膜付近では Wnt シグナル活性化因子である Rspo4 が、精子幹細胞の存在しない管腔側では Wnt シグナル抑制因子である Dkk4 が発現していることを見出した。

Wnt リガンドおよび Wnt 調節因子の発現パターンから、「セルトリ細胞・ライディッヒ細胞が Wnt6 を分泌し、Rspo4 および Dkk4 と協調して働くことで精子幹細胞の細胞増殖を制御している」という仮説をたてた。本研究ではこの仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 体細胞由来 Wnt の機能的重要性の検証

体細胞からの Wnt 分泌を抑制するため、セルトリ細胞・ライディッヒ細胞特異的に Wnt 分泌に必須の遺伝子、Wls を破壊したコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し表現型解析を行う。反対に、マウス尾静脈より発現ベクターを導入する方法(HTVi法)を用いて Wnt の過剰発現を行う。精子幹細胞の細胞数、増殖効率、分化への傾倒を解析することで、体細胞由来の Wnt の機能と重要性を明らかにする。

(2) Wnt シグナルを調節する補助因子の役割

精巣内で空間的に特徴のある発現が確認された Rspo4(Wnt シグナル増強因子)および Dkk4(Wnt シグナル阻害因子)のノックアウト(KO)マウスを作成し、精巣における表現型を解析する。これにより Wnt 補助因子による Wnt 活性化の作用機序を解明する。

(3) Wnt 受容細胞のトランスクリプトーム解析

精子幹細胞株に Wnt を添加し、発現変動する遺伝子・シグナル経路を RNA-seq により探索する。Wnt シグナルの活性化による精子幹細胞制御の分子基盤を理解することを目指す。

4. 研究成果

(1) 体細胞由来 Wnt の機能的重要性の検証

ISH の結果から体細胞群が Wnt6 を産生していると予想されるが、Wnt6 のノックアウトマウスの生存率が非常に低いため解析に用いることが難しい。そこで、体細胞特異的 Cre マウス系統である SF1-Cre と、Wnt リガンド分泌に必須の遺伝子である Wls の flox 系統を交配し、SF1-Cre (hetero); Wls (flox/del) マウス(Wls cKO マウス)を作成した。このマウスではセルトリ細胞・ライディッヒ細胞特異的に Wnt 分泌が抑制される。

Wls cKO および同腹仔の対照マウスの体重を出生後から 8 週齢まで測定した。Wls cKO マウスは正常な成長曲線を示し、目立った全身性の表現型は示さなかった。8 週齢において Wls cKO マウスでは有意に精巣/体重比が低下した。次に、8 週齢の Wls cKO マウスを野生型雌と同居させた実験では、残念ながら妊性および産仔数の低下は見られなかった。未分化型精原細胞の制御に関わる因子のノックアウトマウスでは、しばしば加齢に伴って妊性の低下が見られる場合があるため、6 ヶ月齢の Wls cKO マウスを用いて再度交配実験を行った。全く妊性がない Wls cKO マウスが 1 匹確認されたものの、統計学的に有意な差は見られなかった。産仔数については student-t テストで有意差が検出されたが、対照群の産仔数の平均が 11.1 ± 0.55 なのに対し Wls cKO マウスは 9.0 ± 0.84 であり、生物学的に意味のある差だとは考えにくい。

出生後0日齢、6日齢、10日齢、20日齢、5週齢、8週齢の時点において Wls cKO 群と対照群の精巣切片を組織学的な解析を行った。出生後0~10日齢の精巣では、Wls cKO 群と対照群に明らかな形態上の差異は観察されなかった。20日齢の一部の Wls cKO 精巣では精上皮の菲薄化および精細管内腔の増大が生じていた。5~8週齢の Wls cKO マウス精巣では精細管全体の走行パターンがやや乱れているものの、疎な精細管は部分的にしか観察されなかった。妊性が低下しないという実験結果と一致して、8週齢の精巣上体には成熟した精子が観察された。

次に、未分化型精原細胞から精子細胞への分化課程で発現する各マーカーを用いて免疫蛍光染色を行うことで、特定の分化段階の遅延などを明らかにすることを試みた。原生殖細胞が出生後2~3日で未分化型精原細胞に分化した後は、分化型精原細胞、精母細胞、精子細胞へと順を追って分化する。未分化型精原細胞の一部が精子幹細胞として機能すると考えられている。我々および他グループの報告より、未分化精原細胞における古典的 Wnt シグナル伝達経路の阻害または過剰活性化は、未分化精原細胞数またはその細胞増殖に影響を与えることが明らかとなっている（引用文献 ）。

まず、出生後0日齢の精巣における Vasa 陽性の原生殖細胞 (Gonocyte) の数を計測したところ、Wls cKO 群と対照群で有意な差は見られなかった。したがって、出生前の精巣の発生段階で深刻な異常は生じていないと考えられた。次に、出生後6日齢、10日齢、20日齢、5週齢、8週齢の時点において GFR¹ 陽性の精子幹細胞数、精子幹細胞集団における細胞増殖の割合、PLZF 陽性の未分化型精原細胞数、未分化型精原細胞集団における細胞増殖の割合、ckit 陽性の分化型精原細胞数を計測した。5週齢において Wls cKO マウスの ckit 陽性分化型精原細胞数が有意に少ないというデータが得られたが、その一方で、その他の全ての項目については有意差はなかった。

(2) Wnt シグナルを調節する補助因子の役割

申請者は精細管の傍腔区画特異的に Dkk4 が、基底区画特異的に Rspo4 が発現していることを報告した。これらの遺伝子の機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 システムを用いて Dkk4・Rspo4 のノックアウト (KO) マウスの作出を行った。標的遺伝子に対する gRNA の設計と顕微注入を終え、Dkk4 では2系統、Rspo4 では3系統の変異マウスが得られた。申請者の移動に伴ってマウス系統の交配スケジュールが遅れ、解析に供することのできたノックアウトマウスの個体数は少ないが、現在までに精巣における表現型は観察されていない。Dkk4 と Rspo4 は未分化精原細胞制御に寄与しないか、あるいはファミリー分子による強い補償作用があると予想される。

(3) Wnt 受容細胞のトランスクリプトーム解析

Wnt シグナルによって誘導される標的遺伝子、シグナル伝達経路を詳しくするためにには操作性の高い *in vitro* での精原細胞株 (GS 細胞) の利用が有効であると考えた。当初の計画では、GS 細胞培地へ Wnt を添加し、発現変動する遺伝子を RNA-seq により抽出することを想定していた。しかしながら、(1)の実験において予備的実験結果の再現性が得られなかったこと、研究遂行中に類似の研究の報告があったこと（引用文献 ）により解析を中止せざるを得なかった。

(4) 考察

Wls cKO マウスではテストステロン値が減少していたことから、ライディッヒ細胞の異常を介して精子形成に部分的な異常をきたしている可能性が考えられる。加えて、一部の Wls cKO 精巣では精巣網の膨張が見られたため、セルトリ細胞・ライディッヒ細胞由来の Wnt シグナルは精巣網上皮細胞の発生あるいは恒常性維持に関与する可能性がある。その他、体細胞由来の Wnt シグナルは、成体の精巣では分化型精原細胞の維持に関わっておらず、発生段階において最終的な精原細胞数の決定に関与している可能性が考えられる。これを検証するためには精巣切片を用いた面積あたりの精原細胞数解析ではなく、容積に換算しての解析が必要である。

< 引用文献 >

Takase HM and Nusse R. Paracrine Wnt/ β -catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (PNAS). Vol. 113, issue 11, pp E1489-E1497 (2016)

Tokue M et al. SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/ β -Catenin Signaling in Mouse. *Stem Cell Reports*. Vol. 8, issue 3, pp 561-575. (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kasane Kishi, Aya Uchida, Hinako M Takase, Hitomi Suzuki, Masamichi Kurohmaru, Naoki Tsunekawa, Masami Kanai-Azuma, Stephen A Wood, Yoshiakira Kanai	4. 巻 154
2. 論文標題 Spermatogonial deubiquitinase USP9X is essential for proper spermatogenesis in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 135 ~ 143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-17-0184	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hinako M Takase, Chunxiao Sun
2. 発表標題 Essential function of somatic cell-derived Wnt signaling in primordial follicle activation and fertility in female mice
3. 学会等名 BDR Symposium 2019, Control and Design of Biosystems（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hinako M Takase, Sara Fujita, Hitomi Suzuki, Masami Kanai-Azuma
2. 発表標題 マウス卵巣の卵胞形成におけるWntシグナルの役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hinako M Takase
2. 発表標題 Wnt signaling-mediated differentiation of pre-granulosa cell is critical for primordial follicle activation
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2019)（国際学会）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----