

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05953

研究課題名(和文) 精原幹細胞セルトリバルブニッチの比較形態学的解析

研究課題名(英文) Comparative study of the spermatogonial stem cell niche system in the sertoli valve.

研究代表者

恒川 直樹 (TSUNEKAWA, Naoki)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50431838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：スナネズミの精子発生に関する知見が少ないため、本研究では使用したSlc系統の精子発生サイクル表を構築した。精原幹細胞の分布様式を解明するため、免疫染色を施した結果、GFR 1の陽性細胞の精原幹細胞が認められ、精原幹細胞ニッチシステムのマーカーとして有効である事が示唆された。続いて、組織培養による精原幹細胞の観察を試みた。他の研究グループによって確立された気相液相境界面培養法を参考にして、スナネズミ、ブタ、ネコの未成熟個体の精巣組織を用いた培養を行った。その結果、活発な精原幹細胞と精原細胞の分裂が認められ、多数の精母細胞が観察された。本法は精原幹細胞の観察に有用であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の先には、精原幹細胞を利用した不妊治療への貢献、希少動物の保護、産業動物への応用が考えられる。直ちに適用できるような画期的な成果には辿り着いていないが、基礎研究、すなわち精子の幹細胞である精原幹細胞の基礎的な情報を得ることに成功した。マウスを材料に報告された成果に概ね一致しており、比較動物学的に普遍的な共通項目が見出された。特に、精巣組織の培養実験では、精原幹細胞が活発に増殖し、精母細胞へ分化を遂げる条件を発見した。これを、スナネズミ、ブタ、ネコを材料にして、複数の動物種で見出した成果は大きな貢献であり、他の動物種への展開が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Because spermatogenesis in gerbils is poorly understood, we charted the 12 stages of the spermatogenesis cycle for the Slc strain used in this study. We performed immunostaining to examine the distribution of spermatogonial stem cells and observed that they were GFR 1-positive, suggesting that spermatogonial stem cells are effective markers for the spermatogonial stem cell niche system. Next, we cultured testicular tissues of immature mice, pigs, and cats using a gas&-liquid interface culture method established in mice. We observed active spermatogonial stem cell and spermatogonium division. Numerous spermatocytes were present in the cultured tissues; however, meiosis was rarely observed. This method was shown to be useful for observing spermatogonial stem cells. Future studies should conduct detailed observations of meiosis in gerbil spermatogenesis.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精原幹細胞 ニッチシステム

## 1. 研究開始当初の背景

種の連綿を支える生殖細胞は、体細胞とは異なる特殊なシステムで制御されている。将来の精子に分化することができる細胞は精原細胞(精祖細胞)であり、体細胞分裂によりその数を増やし、その結果大量の精子の供給を可能にしている。その根源を司る幹細胞は、精原幹細胞(Spermatogonial Stem Cells; SSCs)と呼ばれ、精巣内の精細管の微小環境、すなわちニッチ内に位置することがマウスを材料にして明らかになっている。ニッチは主にセルトリ細胞によって形成され、セルトリ細胞はSSCsの定着、増殖、および分化を支持することが知られている。これまで私たちは、周年繁殖動物のマウスと季節繁殖動物のハムスターとの比較研究から、マウスでは見られなかった新たなニッチ(セルトリバルブニッチと命名)をハムスターで発見することに成功した。周年繁殖動物のマウスのニッチは、曲精細管の血管近傍にみられるニッチが主軸をなすが、ハムスターにおいてはこのニッチに加えて、直精細管領域(曲精細管と精巣網を繋ぐ管)に備わるセルトリバルブに特殊なニッチが存在し、未分化精原幹細胞が数多く蓄積する。両者は、普通預金と定期預金の関係にあり、通常の運用にはマウスと同様にニッチが活躍し、短期間に造精が求められるときはセルトリバルブニッチからの供給を受けると推察された。繁殖季節が限定される動物種においては、2段階に用意されるため合理的である。そこで本研究では、ニッチシステムの普遍性と特殊性を徹底的に究明することを目標に設定する。周年繁殖動物のマウスは、生殖活性が盛んであり、マウスの実験動物化、すなわち人為的な選抜を受ける過程でニッチシステムが簡略化された可能性があると考えた。野生動物と実験動物、周年繁殖動物と季節繁殖動物など、これら相対する事象において比較検討することにより、研究課題の核心をなす学術的な問いどころとなる。本研究では、ニッチシステムの多様性を正確に捉えるため、(1)多様な動物種を用いて比較形態学的な解析を行い、(2)精巣組織の培養を試みて、精原幹細胞の振る舞いを究明するための研究基盤を整えることが急務である。

## 2. 研究の目的

精子の幹細胞である精原幹細胞(配偶子幹細胞)は、精細管内の微小環境(ニッチ)に存在し、セルトリ細胞によって構成されるニッチシステムにより巧みに制御されることが知られている。申請者らは、季節によって激しく精細胞の数を変動させるハムスターと、常に生殖活性の高いマウスと比較を行ったところ、前者に新たなニッチシステム(セルトリバルブニッチと命名)を見つけることに成功した。セルトリバルブはこれまで精細管と精巣網を接続する弁様構造としてのみ知られていたが、ハムスターでは精原幹細胞を蓄積する精原幹細胞のバックアップ場所であると考えられ、安定供給に役立っていると推察された。本研究課題は、(1)その機構を解明し、(2)多様な動物種との比較により、そのシステムの普遍性と特殊性を解明するための基盤作りを目的とした。生殖幹細胞は種の連綿を支えることから生物の進化を問う重要なテーマであり、加えて畜産業、希少動物の保護、ヒトの生殖医療に直接貢献する喫緊の課題でもある。本研究では、ニッチシステムの多様性を正確に捉えるため、多様な動物種を用いて比較形態学的な解析を行い、精巣組織の長期培養を試みて、精原幹細胞の振る舞いを究明するための研究基盤を整える。

## 3. 研究の方法

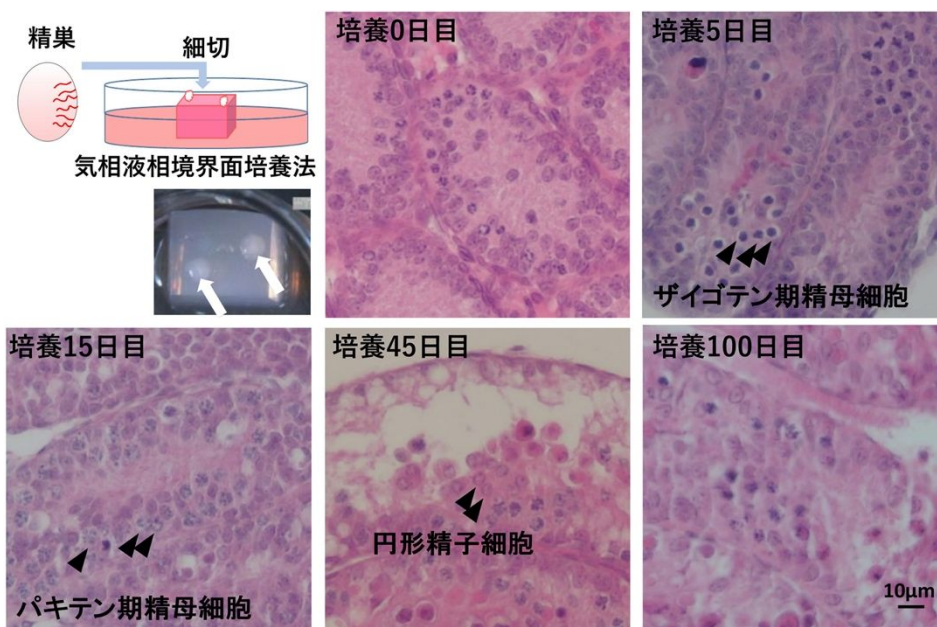
(1)比較形態学的研究：季節繁殖性を示すハムスターおよびスナネズミを用いることにより、周年繁殖動物のマウスとの比較を行った。また、高度に人為選抜を受けているイヌ、ネコ、ブタは、周年繁殖動物と季節繁殖動物との間で比較が可能であり、去勢手術によって得られる精巣を利用した。精原幹細胞ニッチの部位を観察するため、HE染色により、曲精細管と精巣網を接続する直精細管領域を慎重に観察して、セルトリバルブの形態を観察した。また、免疫染色によってGDNF、GFR 1の分布パターンの解析を行うため、精巣組織から精細管およびセルトリバルブ領域を単離し、常法に従い固定後、ホルマリン標本において、GDNF、GFR 1の二重染色を施し、両因子の分布パターンを調べた。特に、活発な精子発生が認められる週齢を比較対象にして、動物種との間で比較検討するとともに、季節繁殖動物については繁殖季節による違いについても精査し、ハムスターで観察結果との比較を行った。同時に、精巣組織を常法に従い固定、包埋を施し、切片を作製後に、GDNF、GFR 1の二重染色を施し、より局所的なGDNF、GFR 1の分布パターンの相違点について注目した。

(2)精巣組織培養の試み：マウスで確立された気相液相境界面培養法(小川法; Sato et al., Nature2011)を参考にして、ブタ、スナネズミ、ネコの精巣組織片を用いて長期培養培養を行った。摘出された精巣を実体顕微鏡下で無菌的に細切し、シャーレに設置されたアガロースゲルに静置して気相液相境界面培養を行った。培地は、MEMを基礎培地とし、代替血清としてKnockOut Serum Replacement(Invitrogen/Thermo Fisher Scientific社:以下KSRと略す)を最終濃度10%に調製し用いた。また、代替血清の比較検討を行うため、AlbuMAX 1(Invitrogen/Thermo Fisher Scientific社:以下AlbuMAXと略す)を最終濃度20mg/ml、40mg/mlに調製して用いた。

## 4. 研究成果

(1) 比較形態学的研究：摘出された精巣組織をブアン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、組織学的解析を行った。用いたすべての動物種において、HE染色によって曲精細管および精巣も構造を確認することができ、両者を接続する直精細管領域を認められるセルトリバルブ構造の観察を行う事ができた。スナネズミにおいては、精子発生に関する情報は少ないため、使用した系統の精子発生サイクル表を構築するところから着手した。PAS反応およびレクチンPNA染色がステージ判定に有効である事が判明し、これを12ステージに区分することができた。スナネズミを材料にして精巣組織から精細管およびセルトリバルブ領域を単離し、常法に従い固定後、ホルマウント標本において、GDNF、GFR 1の二重染色を施し、両因子の分布パターンを調べた。その結果、GDNFの陽性領域において、GFR 1の陽性細胞の精原幹細胞が確認できたことから、両者の関係はマウスやハムスターと同様、精原幹細胞ニッチシステムのマーカーとして有効である事が示唆された。しかしながら、種間差による免疫染色性の問題から、結果が必ずしも安定せず、特異抗体のロットにより免疫染色性が大きく異なることが判明した。

(2) 精巣組織培養の試み：気相液相境界部培養法によって、ブタ、スナネズミ、ネコの精巣組織の培養を行った。至適培養条件を検討する目的で、生後20日齢の精巣組織片を用いて、10%KSR、AlbuMAX 20mg/ml、AlbuMAX 40mg/mlを添加した3種類の培地を作製し、比較を行った。試みたすべての動物種において、100日間以上の培養に成功し、HE染色による組織学的解析の結果、精細管構造が維持されて、精祖細胞から精母細胞への分化においては共通して有効な培養方法である事が判明した。以下、スナネズミの事例で報告する。10%KSRにおいては、培養5日目以降、培養経過日数が増えるにつれ、精原細胞の数を徐々に減らし、40日目以降では、セルトリ細胞の細胞質突起の伸長が不十分で、空砲が目立つ精細管が多数観察され、精細胞は観察されなかった。また、100日目も含め、50日目以降はほとんどの精細管が管腔の空いた異常な精上皮の形態を示したことから、精細管構造の維持には有効であるが、精細胞の分化においては必ずしも適切ではないと判断された。AlbuMAX 20mg/mlにおいては、5日目以降でレプトテン期、10日目以降でザイゴテン期、15日目以降でパキテン期、75日目以降でディプロテン期の精母細胞が多数観察された。さらに、100日目では、わずかに精子細胞を観察されたが、減数分裂の異常像が多数観察され、培養期間を通じて後期の伸長型精子細胞を観察することはできなかった(付図)。AlbuMAX 40mg/mlにおいては、5日目以降でレプトテン期、15日目以降でパキテン期の精母細胞が多数観察された。さらに、45日目および75日目で円形精子細胞がわずかに観察されたが、AlbuMAX 20mg/mlに比べて成績は劣ることが判明した。各々の培養成績は、動物種によって異なるが、概して代替血清はAlbuMAX 20mg/mlが好成績であり、精祖細胞から精母細胞への分化において有効であった。また、ごく少数ではあるが、減数分裂を経て円形精子細胞(半数体細胞)へと分化を遂げており、顕微授精の技術を用いれば次世代の個体が得られる可能性があると考えられた。マウス以外の動物種で示した最初の事例であることは本研究の最大の成果である。減数分裂がボトルネックになっていることが明かであり、精母細胞が退行しないよう、培養条件の改善が急務である。



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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imura-Kishi, K. Uchida, A. Tsunekawa, N. Suzuki, H. Takase, H. M. Hirate, Y. Kanai-Azuma, M. Hiramatsu, R. Kurohmaru, M. Kanai, Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Low retinoic acid levels mediate regionalization of the Sertoli valve in the terminal segment of mouse seminiferous tubules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79987-4	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田拓央、杉山まどか、金澤朋子、森友忠昭、恒川直樹
2. 発表標題 ブタ精巣を用いたin vitro精子発生の試み
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会・獣医解剖分科会
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
---------	---------