

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06322

研究課題名(和文) in vivo精巣形成とin vitro再構築におけるCD34+内皮細胞の役割

研究課題名(英文) Role of CD34+ endothelial cells in in vivo testis formation and in vitro reconstruction of testis

研究代表者

安部 眞一 (Abe, Shin-ichi)

熊本保健科学大学・保健科学部・客員研究員

研究者番号：90109637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：精巣の再凝集培養系において、間質の主要な細胞であるCD34+細胞の凝集体にLeydig cell (LC)が局在化する仕組みを解析した。LCにはadult型(ALC)とfetal型(FLC)があるが、局在化するのほとんどがALCであった。Live cell imagingの結果、CD34+細胞はALC凝集体に向かってchemotaxisを示すこと、VCAM1とa4b1 integrinが重要な役割を果たすことが示唆された。これらの結果から、精巣の間質様構造の形成・維持・再構築にCD34+細胞とALC間のVCAM1-a4b1 integrin相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、精巣を含め哺乳類のいろいろな器官の間質にCD34+PDGFRa+ telocytesが存在し、周りの細胞とcommunicationを取っているという形態学的報告がある。再凝集培養系を用いて、精巣の間質様構造の再構築にCD34+細胞とadult LC間のVCAM1-a4b1 integrin相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆した今回の結果は、生体におけるLCの分化・再生におけるtelocytesの機能的役割を示唆する先駆的な報告と言えるだろう。また、我々が確立した精巣organoidが精巣再構築の解析に有用なツールとなることが証明されたことから、今後医学的な応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism whereby Leydig cells (LCs) are localized within the re-aggregates of CD34+ cells, which are the main component of the testicular interstitium, in a 3-D re-aggregate culture in which successful reconstruction of testicular structures had been established. While LCs have adult type (ALCs) and fetal type (FLCs), most of the LCs localized within the CD34+ cell-re-aggregates were ALCs. Live cell imaging showed that CD34+ cells on the dish displayed chemotactic behavior toward ALC-re-aggregates, and the behavior was inhibited by VCAM1 antibody. Combined with expression studies by immunostaining, these results indicate that VCAM1-a4b1 integrin interaction between CD34+ cells (telocytes) and ALCs plays an important role in the formation, maintenance and regeneration of the structure of testicular interstitium. The testicular organoid model that we established will contribute to the analysis of the mechanism of spermatogenesis and also to medical application.

研究分野：発生生物学

キーワード：精巣形成 3次元培養 organoid 間質 CD34 telocyte integrin a4b1 VCAM1

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精巣分化は、受精後、Sry 遺伝子が pre セルトリ細胞(Sertoli cell, SC)に発現して精巣への分化が決定され、中腎から精巣へと遊走した内皮細胞等が、pre-SC と生殖細胞の凝集体を取り囲み、精巣索を形成する。同時に血管形成や胎児型ライディッヒ細胞(fetal Leydig cell, FLC)が分化し、ステロイド産生が起こる。SC が増殖して、精巣索からチューブ状の精細管へと分化が進む。精細管の周縁部は SC が取り巻いており、生殖細胞は SC と接着しつつ、成熟精子へと分化する。基底膜の外側には筋様細胞(peritubular myoid cell; PMC)が取り巻いている。生後精巣の間質には、成獣型 LC(adult LC; ALC)や血管、内皮細胞、間葉系細胞(mesenchymal cell/stromal cell)等が存在する(1)。

この精巣形成のメカニズムを研究するためのツールとして、変異マウスを用いた *in vivo* のモデルと精巣の培養系を用いた *in vitro* のモデルがある。Knockout mouse 等を用いた *In vivo* の研究から SC が産生する FGF-9, PDGF α , NGF, AMH, VEGF, desert HH, TGF β family member (activin 等)が SC の増殖や索の形成に必須である(1)。一方、*In vitro* の研究に関して、近年いろいろな臓器の再構築系(organoid)が確立されている(2)。精巣でも様々な系が試みられているが、解離した精巣細胞から明瞭な精細管構造の構築と精原細胞からの分化を達成した系は少ない。我々は、生後の若い精巣を解離、再凝集させてコラーゲン内 3 次元培養を行い、KSR (KnockOut Serum Replacement) を添加することにより、ほぼ完全な精巣再構築に成功した(3)。2 week 培養すると、SC が索の外縁部に一層に並び、核と細胞質が伸長、Tight junction の形成など精細管様構造の形成が見られた。生殖細胞は精巣索の内側に、LC は索の外側に局在化した。また、精原細胞は第一精母細胞へ分化した。これらの結果、精細管の形成機構(極性化した SC の伸長と分化、内腔の形成等)や LC の間質への局在化等のメカニズムについて *in vitro* で調べるユニークなモデル系が確立された(3)。さらに、再構築過程において、間質を構成する PMC、p75⁺細胞と CD34⁺細胞が segregate して、間質様構造の外側から PMC、p75⁺細胞、CD34⁺細胞の 3 層が再構築されること、あらかじめ間質を除いて再凝集培養を行うと、正常な再構築が起こらないが、それに分離した間質を加えると、再構築が起こることを見出した(4)。これらの結果は、精巣の再構築に間質が重要な役割を果たすことを示唆する。

2. 研究の目的

上記の様に、我々は、樹立した精巣のユニークな再構築培養系(organoid model)を用いて、精巣の間質が精細管再構築に重要な役割を果たすことを示した。そこで、精細管再構築における間質の主要な構成細胞である CD34⁺細胞の役割について、*in vivo* と *in vitro* の両面から解析することを目的とした。また種々の transgenic mouse を用いて、精巣形成に関わるシグナリング因子等の役割について、解析することを目的とした。

(1) CD34-CreERT knock-in mouse と R26R-mCherry(loxP) mouse を掛け合わせ、受精後 tamoxifen を母親に注射して、子供の生殖腺において CD34⁺細胞の発生運命を追跡する。

(2) 精巣再構築における CD34⁺細胞や p75⁺細胞に発現する PDGF signaling や Neurotrophin (NT) signaling の役割を調べる。

(3) 精巣の再凝集培養において、精細管様構造の中に生殖細胞が、また間質様構造の中に LC が集合することが明らかになったので、間質様構造中に LC が集合するメカニズムを、機能阻害抗体や Live imaging を用いて解析する。

(4) 近年、いろいろな器官の間質において、数珠状の長い細胞突起(telopodes)を持つ telocytes が存在し、周りの細胞と接触していることが形態学的に明らかにされている(5, 6)。哺乳類大人精

巢においても、CD34⁺PDGFR α ⁺ telocytes が間質に存在し、周りの PMCs、LCs、血管等と接触し、communication を取っているのではないかと報告されている(7, 8)。しかし、胚や生後若い精巣において CD34⁺PDGFR α ⁺ telocytes が存在するかどうか、また存在するとすればどのような形態かということは明らかになっていない。そこで、胚～生後精巣における CD34⁺細胞の存在様式について CD31、PDGFR α 、p75 や integrin タンパク質の発現との関連を調べる。

3 . 研究の方法

(1) CD34⁺細胞の系譜解析 : CD34-CreERT knock-in mouse と R26R-mCherry(loxP) mouse を掛け合わせ、受精後 tamoxifen を母親に注射して子供から生殖腺を取り出し、mCherry 蛍光タンパク質を発現した CD34⁺細胞の発生運命を蛍光抗体法によって追跡する。

(2) コラーゲン内 3 次元培養系による再凝集培養 : 生後 10 日目のマウス精巣を酵素処理で解離し、回転培養器で再凝集させ、遠心した細胞のペレットをコラーゲンに埋め込み、nuclepore filter に乗せて RPMI-1640 培地+10% KSR を入れ、34°C、5% CO₂、50% O₂ で 3 ~ 7 日間培養した(Zhang et al., 2014)。PDGF 受容体の阻害剤である tyrphostin や p75 と会合する trkC の阻害剤である K252a、integrin 抗体や VCAM1 抗体を再凝集培養に投与し、精巣再構築における効果を調べた。

(3) 蛍光免疫法 : 再凝集培養した細胞塊を 4% paraformaldehyde (PFA) で固定し、パラフィン包埋した。切片を賦活化したのち、各種抗体で免疫染色した。また、各ステージの精巣を OCT compound で包埋して-20°C でフリーズし、凍結切片を methanol、acetone で固定し、各種抗体で免疫染色した。

(4) FACS による CD34⁺細胞や LC の純化 : CD34⁺細胞については、wild type 精巣を解離した後、Brilliant Violet 421TM (BV421) anti-mouse CD34 antibody で染色し、cell sorter SH800 (Sony) によって分離した。また、EGFP⁺ LC については、*Ad4BP-BAC-EGFP* mouse 精巣細胞から GFP⁺細胞分画を分離し、さらに GFP⁺細胞分画から CD34⁺GFP⁺細胞(ALC+FLC)を分離した。その中の FLC は、1/15 ~ 1/20 であることから、ほとんどは ALC と考えられた(9)。

(5) 精巣細胞や CD34⁺細胞の細胞間接着の測定 : 解離した精巣細胞や純化した CD34⁺細胞を抗体の有無無しで pre-incubate した後、24 穴 dish に入れて、室温、70 rpm、1h 回転した。PFA で固定後、細胞数を計測した(9)。

(6) CD34⁺細胞と VCAM1 との接着の測定 : 96 穴 dish に BSA in RPMI, or recombinant VCAM1/Fc を 4°C で incubate し、機能阻害抗体の有無で pre-incubate した CD34⁺細胞を 1 h 入れた。PBS で洗った後、crystal violet で染色し、水洗後 20% acetic acid を加え microplate reader, 595 nm で測定した(9)。

(7) Live Imaging によるタイムラプス観察 : CD34⁺細胞と GFP⁺ LCs (ALCs + FLCs) を cell sorter で分離後、各細胞を control 抗体、VCAM1 抗体、mixture of α 4, α 9 and β 1 integrin 抗体で各 30 min 処理後、LCs のみ、あるいは LCs + CD34⁺細胞を collagen-coat した glass base dish に乗せて、CV1000 共焦点顕微鏡で、34°C、50% O₂、5% CO₂ の条件下、488 nm laser でタイムラプス観察した(9)。

4 . 研究成果

(1) CD34⁺細胞の系譜解析 : 胎児～生後マウス精巣における CD34 陽性細胞の系譜解析を行うため、tamoxifen(TAM)誘導型の Cre 酵素を CD34 promoter の制御下で発現するマウス(CD34-CreERT)

を作成し、R26R-H2B-mCherry (loxP) と交配させ、TAM を母親に注射して得られた胎児を調べたが、母親の妊娠ステージや TAM の量、注射回数等いろいろ変えても CD34⁺細胞に Cherry タンパク質の発現を確認できなかった。TAM の量を増やすと死産が多くなり、また生まれた子供に TAM を注射したり飲ませたりもしたが、結果は同じであった。CD34 遺伝子の promoter 活性が低い可能性が考えられた。

(2) 精細管様構造の再構築におけるPDGFやNT signalingの役割：精細管様構造の再構築におけるPDGFやNT signalingの役割を探るために、それぞれの特異的阻害剤であるtyrphostin (AG1296)やK252aの効果調べた。再凝集培養にtyrphostinやK252aを添加してもほとんど影響は見られない。しかし、tyrphostinとK252aを同時に添加すると、SCsは多層となり、CD34⁺細胞もp75⁺細胞も形態が異常になった。これらの結果、精細管様構造の再構築にPDGFとNT signalingの両方が関わっていることが示唆された。

(3) 精巣の再凝集培養における間質再構築のメカニズム：精巣の再凝集培養における再構築において、LCs は CD34⁺細胞の凝集体の中に局在化する。そのメカニズムについて探るため、まず ALC と FLC のどちらが CD34⁺細胞の凝集体の中に局在化するのかわかると探る。FLC のみに EGFP を発現する *mFLE-EGFP* transgenic mice の精巣を用いて再凝集培養を行うと、GFP のみを発現する細胞は FLC であり、LCs の主要なステロイド産生酵素である HSD3β1 を発現する細胞は ALC と FLC の両方である。培養 0 日目、ほとんどの HSD3β1⁺細胞や GFP⁺細胞は、CD34⁺細胞の凝集体から離れて存在している。7 日目、ほとんどの HSD3β1⁺細胞は CD34⁺細胞の凝集体の中に入っているが、GFP⁺細胞はほとんど入っていない。この結果は、CD34⁺細胞の凝集体に入った LC は、そのほとんどが ALC であったことを示す。

このような LC の挙動の違いの原因を探るために、Microarray の結果から ALC と FLC で発現に差のある integrin 等の遺伝子を探したところ、integrin α4, α9, β1 と VCAM1 が候補として挙がり、発現も見られたので、その機能阻害抗体を加えて再凝集培養を行ったところ、精細管様構造や間質様構造の再構築が阻害されたことから、精巣構造の再構築に α4β1 integrin, α9β1 integrin と VCAM1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、純化した CD34⁺細胞の再集合実験を α4, β1 integrin と VCAM1 の抗体が阻害したことから、CD34⁺細胞同士の接着に α4β1 integrin と VCAM1 が関与していることが分かった。VCAM1 は α4β1 integrin の基質の 1 つとして知られているので、VCAM1 に対して CD34⁺細胞が結合するかどうかを調べたところ、CD34⁺細胞が VCAM1 に直接結合すること、その結合を integrin α4, β1 の抗体が阻害することから、CD34⁺細胞と VCAM1 との結合に α4β1 integrin が関わっていることが示唆された。

次に、*Ad4BP-BAC-EGFP* マウス精巣細胞から分離した GFP⁺ALC と WT マウスから分離した GFP⁻CD34⁺細胞を用いて Live cell imaging を行った。ALC と CD34⁺細胞を混ぜると、凝集体を形成し、内側に LCs、外側に CD34⁺細胞が位置する構造になった。また、dish の底に付着して伸展した CD34⁺細胞は、紡錘体状になり、突起(filopodia, telopode)を伸ばし、ALC の凝集体に向かって近づき、filopodia を凝集体に接触すると、その中に入る動きが観察された。CD34⁺細胞のみを培養した場合はこの様な動きは見られないことから、CD34⁺細胞は ALC に向かって動く chemotaxis を示したと考えられる。VCAM1 抗体を処理すると、CD34⁺細胞の動きは鈍くなり、LCs と CD34⁺細胞の凝集体に近づいても中に入る細胞はほとんど見られなかった。この結果から、CD34⁺細胞は ALC に向かって chemotaxis を示すこと、その chemotaxis において CD34⁺細胞と ALC に発現する VCAM1 が重要な役割を果たすこと、が示唆された。以上の結果から、精巣の間質様構造の形成・維持・再構築に CD34⁺細胞と ALC の間の VCAM1-α4β1

integrin 相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。また近年、哺乳類大人のいろいろな器官の間質に CD34⁺PDGFR α ⁺ telocytes が存在し、周りの細胞と、精巣では PMCs、LCs、血管等と接触し、細胞間 communication を取っているのではないか、という形態学的報告があるが、これまでに機能的な解析はほとんどない。我々の結果は、telocytes の機能的解析の先駆的な報告と言えるだろう(9)。

(4) 胚～生後精巣における CD34⁺細胞の存在様式：最近哺乳類精巣の間質に

CD34⁺PDGFR α ⁺ telocytes が存在するという形態学的報告があるが、これまでは大人の精巣のみである。そこで、胚や若いマウス精巣での CD34 の発現様式を免疫染色法で調べた。その結果、胚では CD34 は間質の CD31⁺内皮細胞のみで発現し、生後では内皮細胞に加えて、間質の大部分(stromal cell, mesenchymal cell)で発現が始まることが明らかになった。CD34⁺CD31⁺内皮細胞には発生を通して PDGFR α や integrin α 4, α 9 は発現しないが、CD34⁺ stromal cell には PDGFR α や integrin α 4, α 9 が発現する。Integrin β 1 はどちらにも発現するので、stromal cell には PDGFR α 、integrin α 4 β 1 や α 9 β 1 が発現し、内皮細胞には integrin β 1 と会合する別のタイプの integrin α が発現していると考えられる。これらの結果から、生後精巣には telocyte が存在すると思われるが、胚にも存在するかどうかという点が興味深い。今後、胚や若い精巣に telocyte が存在するかどうか、存在するとすればどのような存在様式を示すのか、形態学的研究が期待される(10)。

< 引用文献 >

- Ungewitter, E.K., Yao, H.H. *Sex. Dev.* **2013**, 7, 7–20.
Cham, T.-C. et al., *Biol. Reprod.* **2021**, 1–20.
Zhang, J. et al., *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, 205,121–132.
Abe, S.-I. et al., *Plos One* **2017**, 12, e0188705.
Popescu, L.M. et al., *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, 14, 729–740.
Rosa, I. et al., *J. Histochem. Cytochem.* **2021**, 69, 795–818.
Marini, M. et al., *Sci. Rep.* **2018**, 8, 14780.
Pawlicki, P. et al., *Protoplasma* **2019**, 256, 393–408.
Abe, K. et al., *Sci. Rep.* **2021**, 11, 18332.
Abe, K. et al. *Zool. Sci.* **2022**, 39 (5).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Abe K, Kon S, Kameyama H, Zhang J, Morohashi K, Shimamura K, Abe S-I	4. 巻 11
2. 論文標題 VCAM1-a4b1 integrin interaction mediates interstitial tissue reconstruction in 3-D re-aggregate culture of dissociated prepubertal mouse testicular cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97729-y	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 Abe K, Kameyama H, Abe S-I	4. 巻 39
2. 論文標題 CD34 is expressed in endothelial cells in embryonic testes and is additionally expressed in non-endothelial cells in postnatal mouse testes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	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） 10.2108/zs220026	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 Jarde, T., Chan, W.H., Rossello, F.J., Kahlon, T.K., Theocharous, M., Arackal, T.K., Flores, T., Giraud, M., Richards, E., Chan, E., Kerr, G., Engel, R.M., Prasko, M., Donoghue, J.F., Abe, S-I., Pheesse, T.J., Nefzger, C.M., McMurrick, P.J., Powell, D.R., Daly R.J., Polo, J.M., Abud, H.E.	4. 巻 27
2. 論文標題 Mesenchymal Niche-Derived Neuregulin-1 Drives Intestinal Stem Cell Proliferation and Regeneration of Damaged Epithelium.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 646-662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2020.06.021.	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安部眞一、安部和子、亀山広喜
2. 発表標題 3次元培養によるマウス精細管様構造再構築におけるライディッヒ細胞とp75+細胞の動態について
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会（大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部眞一、安部和子
2. 発表標題 3次元培養によるマウス精細管様構造再構築におけるPDGFとNeurotrophin signalingの役割について
3. 学会等名 日本動物学会
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
研究協力者	安部 和子 (Abe Kazuko)		

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			
オーストラリア	Monash University	Monash Biomedicine Discovery Institute	Hudson Institute of Medical Research	他9機関
中国	ZunYi Medical University	School of Basic Medical Sciences		