

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06439

研究課題名(和文) 精原細胞の増殖に伴う減数分裂能の獲得機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of proliferation and meiosis in male germ cells of the testis

研究代表者

遠藤 壱 (Endo, Tsutomu)

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：40813936

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)：哺乳類の精巣では、精子の元となる精原細胞が増殖をしつつ、減数分裂を起こす精母細胞へと分化することで、精子生産が維持される。この増殖と分化の調節は次世代へ子孫を残すために必要不可欠であるが、分子メカニズムは不明である。本研究ではマウスを用い、機能遺伝子の同定を行うとともに、精子形成の維持機構の解明を目指した。

発生工学技術を駆使して遺伝子欠損(KO)マウスを3系統作製して解析を行ったところ、うち1系統で、加齢により妊性の低下を明らかにした。このKOマウスでは、従来の加齢(老化)で見られる精巣内の恒常性の破綻が、早期に起こることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、精原細胞の増殖と分化の調節や、精子形成の継続性と加齢による破綻現象の一端を明らかにしており、畜産・動物生命科学への学術的な波及に寄与する。また現在、畜産動物の精原細胞を体外移植して精子を作製する技術が開発されている。本知見は、移植後の精子形成の効率改善に応用でき、この技術を活かして効率的な動物生産への展開が期待される。

さらに、ヒトの不妊は社会的要求の高いテーマであり、国内の不妊カップルは約7組に1組と推定される。不妊症の約半数は男性側に起因し、主な原因として精子形成の障害が知られる。本成果は、加齢による男性の妊性低下の原因究明や治療法開発に繋がり、社会への還元が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Within the testis, spermatogonia, which include germline stem cells, undergo an elaborately organized process to give rise to sperm. The process of germ cell development is called spermatogenesis. Transition of spermatogonia to spermatocytes must be carefully regulated to ensure that large numbers of spermatozoa are produced continuously throughout reproductive life. I have addressed the question of how this transition is regulated at the cellular and molecular level. We have generated three of knockout (KO) mouse lines by CRISPR/Cas9 system and have found that one KO mice are age-dependently infertile. The KO mice show precocious testicular defects, which can be observed in natural aged mice.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精巣 精子形成 加齢

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精巣内では、精子が一定のリズムで持続的に生産される。精子の生産過程である精子形成は精巣の精細管内部で起こり、幹細胞を含む精原細胞が増殖をしながら、一部が減数分裂を起こす精母細胞へと分化する。精母細胞は減数分裂を経て、半数体の精子へと分化し、精子形成を完了する。この精原細胞の増殖と分化調節は、精原細胞や精巣の恒常性の維持だけでなく、その後の精子形成や遺伝情報の伝達に必要不可欠である。

過去の研究により、精母細胞は初めから十分な減数分裂能を保持しており、減数分裂能の獲得はそれ以前の、精原細胞が増殖する時期に起こることを報告した (Endo et al., *PNAS*, 2015)。しかし、精原細胞が増殖に伴いどのように減数分裂能を獲得して精母細胞へと分化するのか、また、精原細胞の増殖と分化のバランスがどのように維持されるか、分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子の機能解析や改変動物の作製が容易なマウスを用い、精原細胞の増殖と分化の調節に重要な機能遺伝子の同定を行うとともに、精原細胞の増殖と分化のバランスがどのように保たれているかの観点から、精巣内の恒常性の維持と加齢による破綻機構について、分子生物学的・細胞生物学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損マウスの作製と表現型解析

遺伝子機能を個体レベルで解析するためには、目的遺伝子を破壊した (KO) マウスの作製が重要である。特に、ゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 法は短期間 (約 3-4 ヶ月) で KO マウスを作製することが可能であった (Oji et al., *Sci Rep* 2016)。

そこでまず、オンラインのデータベースや精巣内の遺伝子 (mRNAs) の網羅的発現に関する文献を参考としながら、精原細胞の増殖・分化の時期で高発現する遺伝子群に着目し、CRISPR/Cas9 法を用いて 3 系統の KO マウス作製を行った。これらの KO マウスの妊性を後輩で確認し、妊性の低下を示す KO マウス系統のスクリーニングを行った後、精原細胞の増殖・分化についての解析を行った。

(2) 精巣内の恒常性の維持と加齢による破綻機構の解析

精原細胞の増殖と分化のバランスがどのように維持されるかを解析するには、マウス精巣内を長期的に観察する必要がある。本研究ではまず、野生型の成体 (8 週齢) マウスを用い、最大 2 年齢まで長期飼育・観察を行い、加齢に伴う妊性の変化を解析した。続いて、1 年半齢以上の老齢マウスにおける精巣内の恒常性や、精原細胞および精子形成についての解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子欠損マウスの作製と表現型解析

CRISPR/Cas9 法により作製した 3 系統のヘテロ接合体 (+/-) KO マウス (F0 世代) を交配により、各系統において F2 世代のホモ接合体 (-/-) KO マウスを得た。各系統のオスのホモ KO マウスを成体 (8 週齢) まで飼育した後、それぞれメスの野生型 (WT) マウスと約 8 週間の交配テストを行ったところ、2 系統では妊性に異常はみられなかったが、うち 1 系統で妊性の低下を示した。興味深いことに、この KO マウスは、若齢では妊性に問題がないが、加齢により妊性の低下が顕著になることが明らかになった。一般に、加齢によって起こる妊性の低下の原因は、精原細胞の増殖・分化の異常に起因することが多く、研究開始当初の背景や目的に即した結果が得られたと評価できる。

次に、この妊性低下が起こる系統の KO マウスの精巣を採取し、精原細胞から精子に至るまで、分子生物学的・細胞生物学的な解析を行った。この KO マウスの精巣内において、一部の精細管で生殖細胞の減少や精子形成異常が起こっていた。特に、生殖細胞の減少が見られた精細管の多くは、精母細胞から精子までが消失しており、主に精原細胞しか検出されなかった。このため、この KO マウスで欠損した遺伝子は、精原細胞の増殖または分化に機能することが示唆された。

この遺伝子は、精巣特異的に発現する細胞周期関連因子の一つである。今後の研究では種々の細胞周期関連因子との相互作用を解析することで、どのように精原細胞の増殖と分化のバランスを調節するのか、その詳細を明らかにしていきたい。

(2) 精巣内の恒常性の維持と加齢による破綻機構の解析

野生型の成体(8週齢)マウスを、最大2年齢まで長期飼育を行ったところ、加齢に伴い、妊性の低下が起こっていた。次に、妊性の低下が顕著な老齢マウスの精巣に着目したところ、一部の精細管で生殖細胞の減少や精子形成異常が起こり、これらの精細管の多くは、主に精原細胞しか検出されなかった。

この野生型の老齢マウスによる表現型は、上述の細胞周期関連因子の遺伝子 KO マウスの表現型と一致する部分が多かった。しかしながら、KO マウスでこれらの異常が観察される時期は、野生型マウスよりも早期であった。このため、精巣内の恒常性が加齢によって破綻する過程で、この遺伝子の機能低下が直接的または間接的に関与する可能性が示唆された。

本成果は、精原細胞の増殖と分化の調節機構に加え、精子形成の継続性と加齢による破綻現象の理解など、畜産・動物生命科学への幅広い学術的な波及効果が期待できる。

また現在、精原細胞を体外移植して機能的な精子を作製する技術が魚類・鳥類から哺乳類まで開発されており、この技術を用い、遺伝子資源の凍結保存、遺伝子改変個体の作製、および効率的な動物生産といった種々の応用が期待される。しかし、移植した精原細胞が分化して精子形成を再構成する効率が極めて低いことが種々の応用を拒む一因となっている。本知見は、精原細胞の移植技術の状況改善に応用可能であり、この技術を活かした効率的な動物生産など、畜産・水産分野への波及効果も予想される。さらに、ヒトの不妊は社会的要求の高いテーマであり、国内の不妊カップルは約7組に1組と推定される。不妊症の約半数は男性側に起因し、主な原因として精子形成の障害が知られる。本成果は、加齢による男性の妊性低下の原因究明や治療法開発に繋がり、社会への還元が期待できる。

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 3件）

1. 著者名 Kobayashi Kiyonori, Endo Tsutomu, Matsumura Takafumi, Lu Yonggang, Yu Zhifeng, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 -
2. 論文標題 Prss55 but not Prss51 is required for male fertility in mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	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） 10.1093/biolre/ioaa041	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 Endo Tsutomu, Mikedis Maria M., Nicholls Peter K., Page David C., de Rooij Dirk G.	4. 巻 9
2. 論文標題 Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 775 ~ 775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom9120775	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 MATSUMURA Takafumi, ENDO Tsutomu, ISOTANI Ayako, OGAWA Masaki, IKAWA Masahito	4. 巻 65
2. 論文標題 An azoospermic factor gene, <i>Ddx3y</i> and its paralog, <i>Ddx3x</i> are dispensable in germ cells for male fertility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 121 ~ 128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-145	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤壘	
2. 発表標題 マウス精子形成における連続性	
3. 学会等名 2019 遺伝研研究会、有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する研究会（招待講演）	
4. 発表年 2019年	

1. 発表者名 遠藤 壘, 江森 千紘, 小林 清訓, 松村 貴史, 小沢 学, 石川 祐, 河本 新平, 原 英二, 伊川 正人
2. 発表標題 受精および初期胚発生に加齢オスの精子が及ぼす影響
3. 学会等名 「配偶子インテグリティの構築」「全能性プログラム」合同公開シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 壘, 江森 千紘, 小林 清訓, 松村 貴史, 小沢 学, 石川 祐, 河本 新平, 原 英二, 伊川 正人
2. 発表標題 オスの加齢が精子形成や精子の品質に及ぼす影響
3. 学会等名 第114 回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021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