

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580313

研究課題名（和文）分化不全精原幹細胞を用いた精子形成機構の解明

研究課題名（英文）Unraveling the molecular mechanisms of spermatogenesis using differentiation-deficient spermatogonial stem cells

研究代表者 久保田 浩司

(Kubota Hiroshi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80263094

研究成果の概要（和文）：精子形成に必須である *Kit* 遺伝子に遺伝的変異があり精子形成が全く認められない自然突然変異マウス (W^v/W^v) にも精原幹細胞が存在することを明らかにし、その分化不全精原幹細胞を培養系にて増殖させることに成功した。本研究にて確立した培養系を用いて増殖させた分化不全精原幹細胞と正常な野生型精原幹細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することにより新たな分化誘導因子の候補を同定した。

研究成果の概要（英文）：The KIT receptor tyrosine kinase is required for normal spermatogenesis. Although spermatogenesis is abolished in the testis of W^v/W^v mice due to the *Kit* gene mutation, undifferentiated spermatogonia with spermatogonial stem cell (SSC) phenotype were identified. The W^v/W^v spermatogonia were self-renewed in a modified SSC culture system, indicating they were SSCs. Comparison of the gene expression profiles of the W^v/W^v and wild-type SSCs identified several genes that were expressed differentially in the two SSC populations. These genes might play a role in spermatogonial differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：生殖幹細胞、精原幹細胞、精子形成、増殖因子

1. 研究開始当初の背景

精子形成は性成熟後の雄の生涯にわたって行われる非常に生産的な過程である。これは精原幹細胞の自己複製によって維持されている。マウスでは精原幹細胞の自己複製はグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)

に依存しており、GDNF 刺激により培養系にて精原幹細胞をほぼ無限に増殖させることが可能となった。精原幹細胞培養系が確立されたことから精原幹細胞の自己複製の機序は徐々に明らかにされてつつあったが、精原幹細胞から分化への移行過程に関しては

ほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

精原幹細胞からの分化過程を細胞分子生物学的に明らかにするために、精子形成に障害がある自然突然変異マウスから分離した分化不全精原幹細胞を用いた新たな実験系を確立し、精原幹細胞の分化ならびに精子形成の進行に重要な働きをする遺伝子群を同定する。

3. 研究の方法

(1) 精子形成に必須であるチロシンキナーゼ受容体 *Kit* 遺伝子に遺伝的変異があり精子形成を行うことができない自然突然変異 W^v/W^v マウスに精原幹細胞が存在するか否かを調べる。

(2) 存在を確認することができた場合、その分化不全精原幹細胞を培養系にて培養・増殖させ、正常 *Kit* 遺伝子を導入し精子形成能を回復させる。

(3) 分化誘導を促すと考えられる遺伝子を分化不全精原幹細胞に導入し精子形成を回復させる。

4. 研究成果

(1) W^v/W^v マウスの精巣には野生型精原幹細胞と同一の細胞表面形質を持つ未分化精原細胞が存在することを確認した。この W^v/W^v マウスの未分化精原細胞を精原幹細胞の増殖因子である *GDNF* 存在下で培養を試みた結果、培養開始後、数日で幹細胞特有のコロニーが観察された。その増殖速度は野生型精原幹細胞より遅かったため、培養条件の最適化を行った。その結果、低酸素環境が重要であることを明らかにした。出現した幹細胞コロニーは *GDNF* 依存性に増殖を続けた(図1)。

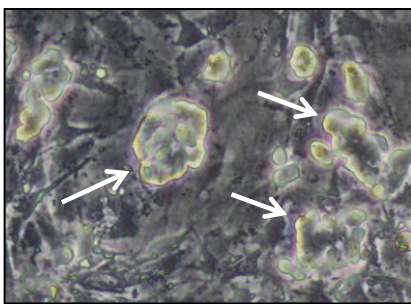


図1. 低酸素分圧の培養条件下において *GDNF* 依存性に半永久的に増殖を続ける W^v/W^v 分化不全精原幹細胞。フィーダー細胞上の典型的な幹細胞コロニーを示す(矢印)。

長期培養された W^v/W^v 幹細胞コロニー形成細胞は、野生型マウス由来の精原幹細胞と同様の細胞表面抗原表現型を有しており、精

巣に移殖すると精子形成は進まないものの長期間生着した。これらの結果は W^v/W^v マウス由来 *GDNF* 依存性精原細胞は分化不全精原幹細胞であることを示している。

(2) 正常 *Kit* 遺伝子発現プラスミドを構築し、分化不全精原幹細胞へ遺伝子導入を行ったが、正常 *Kit* 安定発現株は得られなかった。成功に至らなかった理由としては、遺伝子の導入効率が低いこと、導入遺伝子がメチル化等の修飾を受ける可能性があること、分化が強制誘導されたこと、などの可能性が考えられる。

(3) 培養系にて維持される野生型精原幹細胞は、弱いながら *KIT* を細胞表面に発現していた(図2)。幹細胞の培養に用いられるフィーダー細胞は *KIT* リガンドを発現していることから、野生型精原幹細胞は培養系において恒常的に *KIT* からの分化刺激を受けている。*KIT* からの分化刺激によって誘導される遺伝子群には、分化誘導を促進する遺伝子が濃縮されていると考えられるので、野生型精原幹細胞と機能的 *KIT* を発現しない W^v/W^v 精原幹細胞の網羅的な発現遺伝子解析を行った。その結果、野生型精原幹細胞において特徴的に発現している遺伝子群を同定した。

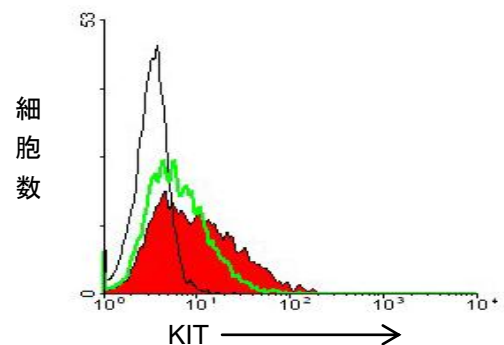


図2. フローサイトメトリーによる培養系にて増殖する精原幹細胞に発現する *KIT* 受容体の解析

赤: 野生型精原幹細胞
緑: W^v/W^v 精原幹細胞
黒: コントロール

野生型精原幹細胞において *KIT* 受容体の発現が強い。 W^v/W^v 精原幹細胞も発現しているが機能は持たない。

本研究課題において、正常な精子形成に必須の *KIT* 受容体が精原幹細胞の精巣内での維持、および自己複製と増殖には必要ではないことを証明した。また、分化不全精原幹細胞の長期培養系を確立したことにより、精原幹細胞からの分化過程を解明するための新たな有用な実験系が構築された。実際、分化誘導因子の候補を同定することができたこと

はその有用性を裏付けている。今後の課題は、分化不全精原幹細胞への安定な遺伝子導入法の確立である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Kubota H, Wu X, Goodyear SM, Avarbock MR, Brinster RL, Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties, *FASEB Journal*, 査読有, 2010, in press.
- ② Schmidt JA, Abramowitz LK, Kubota H, Wu X, Niu Z, Avarbock MR, Tobias JW, Bartolomei MS, Brinster RL, In vivo and in vitro aging is detrimental to mouse spermatogonial stem cell function. *Biology of Reproduction*, 査読有, vol. 84, 2010, pp. 698-706.
- ③ Terada N, Ohno N, Saitoh S, Saitoh Y, Komada M, Kubota H, Ohno S, Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell interaction. *Reproduction*, 査読有, vol. 139, 2010, pp. 883-892.
- ④ Kubota H, Avarbock MR, Schmidt JA and Brinster RL, Spermatogonial stem cells derived from infertile W^v/W^v mice self-renew in vitro and generate progeny following transplantation. *Biology of Reproduction*, 査読有, vol. 81, 2009, pp. 293-301.
- ⑤ Kubota H and Brinster RL, Culture of Rodent Spermatogonial Stem Cells, Male Germline Stem Cells of the Postnatal Animal. *Methods in Cell Biology*, 査読無, vol. 86, 2008, pp. 59-84.
- ⑥ Wauthier E, Schmelzer E, Turner W, Zhang L, Lecluyse E, Ruiz J, Turner R, Furth ME, Kubota H, Lozoya O,

Barbier C, McClelland R, Yao HL, Moss N, Bruce A, Ludlow J, Reid LM, Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. *Methods in Cell Biology*, 査読無, vol. 86, 2008, pp. 137-225.

[学会発表] (計5件)

- ① 久保田 浩司、「分化不全精原幹細胞の自己複製と分化誘導」、第51回日本哺乳動物卵子学会、2010年5月29日、朱鷺メッセ(新潟)
- ② 久保田 浩司、「精原幹細胞の自己複製と分化の制御」、第33回阿蘇シンポジウム～生命科学のフロントランナー、2009年7月31日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本)
- ③ 垣内 一恵、久保田 浩司、「グリア細胞株由来神経栄養因子GDNF発現系の構築」、北里大学獣医学部ハイテクリサーチセンター プロジェクト研究中間報告会、2009年7月25日、北里大学獣医学部(十和田)
- ④ 久保田 浩司、「動物の精原幹細胞工学」、第22回動物生殖工学研究会、2008年12月6日、北里大学(東京)
- ⑤ 久保田 浩司、「精原幹細胞研究の展望」、日本実験動物科学技術2008(第55回日本実験動物学会総会、第42回日本実験動物技術者協会総会)、2008年5月16日、仙台国際センター(仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 浩司 (Kubota Hiroshi)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号：80263094

(2) 研究分担者

垣内 一恵 (Kakiuchi Kazue)
北里大学・獣医学部・助教
研究者番号：90509184
(H20～H21)