

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03162

研究課題名（和文）精細胞の分化を制御するセルトリ細胞の機能的役割の解明

研究課題名（英文）PTBP1 contributes to spermatogenesis through regulation of meiosis of testicular germ cells

研究代表者

小沢 学（Ozawa, Manabu）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80608787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：持続的精子形成には、精細管内に存在するセルトリ細胞からのサポートが不可欠である。申請者らは、選択的スプライシング制御因子であるPTBP1がセルトリ細胞で高発現することに着目し、セルトリ細胞特異的なPTBP1欠損マウスを作製して、その遺伝子機能解析を行った。その結果、PTBP1欠損マウスではセルトリ細胞の細胞骨格に異常が生じることで、精細胞の分化異常が起こり、雄性不妊になることを見出した。このことから、PTBP1はセルトリ細胞の細胞骨格の維持を介して精細胞の分化を制御するというモデルが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝達しうる唯一の細胞系譜であり、その発生を制御する分子基盤を明らかにすることは基礎科学的に極めて興味深い分野であると同時に、不妊・不育が大きな問題となっている今日において社会的にも希求性の高い研究である。本研究では、RNA結合タンパク質であるPTBP1がセルトリ細胞の細胞骨格の調整を介して精原細胞の分化を調節することを明らかにしており、精巣における精細胞と体細胞のインタラクションによる精子形成調整機構を理解する上で重要な知見となる。さらに、本研究の成果は新たな不妊治療技術を開発するための一助となることも期待できる。

研究成果の概要（英文）：The support from Sertoli cells in the seminiferous tubules is crucial for spermatogenesis. We have investigated the role of PTBP1, a regulator of alternative splicing that is highly expressed in Sertoli cells, in spermatogenesis. Our findings show that PTBP1-deficient mice display morphological abnormalities in Sertoli cells, leading to meiosis arrest in germ cells and male infertility. This suggests that PTBP1 in Sertoli cells plays a vital role in sustaining spermatogenesis.

研究分野：発生工学

キーワード：精子形成 精巣 セルトリ細胞 選択的スプライシング

1. 研究開始当初の背景

持続的精子形成は「精原細胞の維持(自己複製)」および「精細胞の分化(減数分裂による半数体精子細胞の産生)」という異なるプロセスがバランスよく厳密に制御されることによって維持される。精子形成の場である精細管内には、生殖細胞系列の細胞である精細胞の他に体細胞であるセルトリ細胞が存在する。セルトリ細胞は各分化段階の精細胞と隣接しながら複雑な精子形成過程を主導的に制御していると考えられている(図1)。「精原細胞の維持」に果たすセルトリ細胞の役割については、これまでに自己複製に必須のサイトカインの分泌源であることなどニッチとしての役割が数多く報告されている。一方で、「精細胞の分化」を制御するセルトリ細胞の機能的役割については現在まで殆ど報告がなく、その作用機序は未だ大きな「問い」として残されたままである。申請者はこれまでの予備解析において、RNA結合タンパク質であるPTBP1をセルトリ細胞特異的に欠損させることで、減数分裂過程で精細胞の分化が停止してしまい、その結果、精子が産生されず雄性不妊になることを見出している。興味深いことに、セルトリ細胞特異的PTBP1欠損マウスでは精原細胞数には変化が見られなかった。このことは、PTBP1の下流で制御される分子機序が、セルトリ細胞の持つ精細胞の減数分裂制御機構に不可欠であることを示している。しかしながら、セルトリ細胞におけるPTBP1の機能、およびその下流で動く精細胞の減数分裂の進行を制御する分子機序についてはこれまで全く報告がない。そこで申請者は、セルトリ細胞におけるPTBP1の機能を明らかにすることで、精細胞が如何にしてセルトリ細胞からのサポートを受けながら減数分裂を進行していくのか?という精細胞分化における極めて重要な問いに対する答えを得ることできると考えた。

2. 研究の目的

PTBP1の遺伝子機能解析を通して、これまでその分子機序がほとんど明らかにされていないセルトリ細胞による精細胞の減数分裂制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. セルトリ細胞特異的 Ptpb1 欠損マウスの表現型解析

セルトリ細胞特異的 Ptpb1 欠損雄マウスの交配試験を行い、その妊孕性を確認する。また、精巣を回収して、組織学的、および免疫組織科学的に解析するとともに、精巣上体から精子を回収しその機能解析を行うことで、Ptpb1 欠損に起因した精子形成異常の詳細を明らかにする。

2. セルトリ細胞特異的な PTBP1 欠損に起因したトランスクリプトームの変動解析

セルトリ細胞特異的 Ptpb1 欠損マウスとレポーターマウスを交配させ、セルトリ細胞のみで傾向を発現するマウスを作出する。次いで、同マウスを用いて PTBP1 を欠損したセルトリ細胞をフローサイトメーターで回収し、RNA-seq に供することでトランスクリプトームおよびスプライシングアイソフォームの変動を詳細に解析する。

3. PTBP1 による選択的スプライシング制御を受ける標的候補遺伝子の特定

フローサイトメーターを用いてセルトリ細胞画分を分取する。ついで、タンパク質-RNA結合を網羅的に解析することができる RNA immunoprecipitation (RIP) -seq を行い、セルトリ細胞において PTBP1 タンパク質と結合する mRNA を網羅的に探索する。

4. セルトリ細胞による減数分裂制御メカニズムの解析

上記までの解析で明らかになったセルトリ細胞における PTBP1 の標的候補遺伝子をセルトリ細胞に強制発現し、精巣を免疫組織学的に解析し、PTBP1 欠損に起因した病態が回復するかについて検証する。

4. 研究成果

セルトリ細胞特異的 Ptpb1 欠損マウスの精巣を、組織学的、および免疫組織科学的に解析したところ、精細胞の分化異常が起こり、雄性不妊になることを見出した。また、PTBP1 欠損マウスではセルトリ細胞の F-アクチン構造に異常が生じることを明らかにした。更に、セルトリ細胞をセルソーターを用いて単離し PTBP1 と結合する RNA を次世代シーケンサーにより網羅的に探索したところ、細胞骨格の維持に参与するシグナル伝達因子が多数検出された。さらに、PTBP1 欠損したセルトリ細胞株にこれらの因子を強制発現させることにより、細胞骨格の異常が回復することを確認した。本研究の結果より、PTBP1 はセルトリ細胞の細胞骨格の維持を介して精細胞の分化を制

御するというモデルが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Ozawa Manabu, Emori Chihiro, Ikawa Masahito	4. 巻 186
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-Mediated Highly Efficient Gene Targeting in Embryonic Stem Cells for Developing Gene-Manipulated Mouse Models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/64385	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 -
1. 著者名 Ozawa Manabu, Taguchi Jumpei, Katsuma Kento, Ishikawa-Yamauchi Yu, Kikuchi Mio, Sakamoto Reiko, Yamada Yasuhiro, Ikawa Masahito	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficient simultaneous double DNA knock-in in murine embryonic stem cells by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated circular plasmid targeting for generating gene-manipulated mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-26107-z	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 -
1. 著者名 Hensel Jessica A., Nicholas Sarah-Anne E., Kimble Amy L., Nagpal Arjun S., Omar Omar M. F., Tyburski Jordan D., Jellison Evan R., Menoret Antoine, Ozawa Manabu, Rodriguez-Oquendo Annabelle, Vella Anthony T., Murphy Patrick A.	4. 巻 119
2. 論文標題 Splice factor polypyrimidine tract-binding protein 1 (Ptbp1) primes endothelial inflammation in atherogenic disturbed flow conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2122227119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2122227119	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 -
1. 著者名 Hoang Thanh, Kim Dong Won, Appel Haley, Pannullo Nicole A., Leavey Patrick, Ozawa Manabu, Zheng Sika, Yu Minzhong, Peachey Neal S., Blackshaw Seth	4. 巻 39
2. 論文標題 Genetic loss of function of Ptbp1 does not induce glia-to-neuron conversion in retina	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110849~110849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110849	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 -

1. 著者名 Hirano Michitada, So Yusei, Tsunekawa Shin, Kabata Mio, Ohta Sho, Sagara Hiroshi, Sankoda Nao, Taguchi Jumpei, Yamada Yosuke, Ukai Tomoyo, Kato Makoto, Nakamura Jiro, Ozawa Manabu, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 4
2. 論文標題 MYCL-mediated reprogramming expands pancreatic insulin-producing cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 254 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-022-00530-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 -

1. 著者名 Shimada-Takayama Yui, Yasuda Takayuki, Ukai Tomoyo, Taguchi Jumpei, Ozawa Manabu, Sankoda Nao, Ohta Sho, Yamada Yasuhiro	4. 巻 599
2. 論文標題 Generation of mice for evaluating endogenous p16Ink4a protein expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 43 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.005	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 -

1. 著者名 Kiyozumi Daiji, Noda Taichi, Yamaguchi Ryo, Tobita Tomohiro, Matsumura Takafumi, Shimada Kentaro, Kodani Mayo, Kohda Takashi, Fujihara Yoshitaka, Ozawa Manabu, Yu Zhifeng, Miklossy Gabriella, Bohren Kurt M., Horie Masato, Okabe Masaru, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 368
2. 論文標題 NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1132 ~ 1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aay5134	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 -

1. 著者名 Omori et al.,	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16high Cells In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 814 ~ 828.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2020.09.006	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 -

1. 著者名 Liu Kaiwen, Sato Ryota, Shibata Takuma, Hiranuma Ryosuke, Reuter Tatjana, Fukui Ryutaro, Zhang Yun, Ichinohe Takeshi, Ozawa Manabu, Yoshida Nobuaki, Latz Eicke, Miyake Kensuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Skewed endosomal RNA responses from TLR7 to TLR3 in RNase T2-deficient macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 479 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab033	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 -

1. 著者名 Taguchi Jumpei, Shibata Hirofumi, Kabata Mio, Kato Masaki, Fukuda Kei, Tanaka Akito, Ohta Sho, Ukai Tomoyo, Mitsunaga Kanae, Yamada Yosuke, Nagaoka So I, Yamazawa Sho, Ohnishi Kotaro, Woltjen Knut, Ushiku Tetsuo, Ozawa Manabu, Saitou Mitinori, Shinkai Yoichi, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 DMRT1-mediated reprogramming drives development of cancer resembling human germ cell tumors with features of totipotency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-25249-4	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 -

1. 著者名 Ozawa Manabu, Mori Hideto, Endo Tsutomu, Ishikawa-Yamauchi Yu, Motooka Daisuke, Emori Chihiro, Ikawa Masahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Age-related decline in spermatogenic activity accompanied with endothelial cell senescence in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108456 ~ 108456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108456	査読の有無 無
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 Endo Tsutomu, Kobayashi Kiyonori, Matsumura Takafumi, Emori Chihiro, Ozawa Manabu, Kawamoto Shimpei, Okuzaki Daisuke, Shimada Keisuke, Miyata Haruhiko, Shimada Kentaro, Kodani Mayo, Ishikawa-Yamauchi Yu, Motooka Daisuke, Hara Eiji, Ikawa Masahito	4. 巻 7
2. 論文標題 Multiple ageing effects on testicular/epididymal germ cells lead to decreased male fertility in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05685-2	査読の有無 無
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 Eguchi Takahiro, Tezuka Tohru, Watanabe Yuji, Inoue-Yamauchi Akane, Sagara Hiroshi, Ozawa Manabu, Yamanashi Yuji	4. 巻 27
2. 論文標題 Calcium-binding protein 7 expressed in muscle negatively regulates age-related degeneration of neuromuscular junctions in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108997 ~ 108997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.108997	査読の有無 無
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 1件)

1. 発表者名 Manabu Ozawa, Hideto Mori, Tsutomu Endo, Masahito Ikawa
2. 発表標題 Declining spermatogenic activities accompanied by the senescent feature of endothelial cells in male mice with age
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Manabu Ozawa, Chihiro Emori, Masahito Ikawa	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 399
3. 書名 Genome Editing in Animals	

〔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
---------	---------