

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03168

研究課題名（和文）精巣内の前駆細胞で生じる脱分化誘導メカニズムの全貌解明

研究課題名（英文）The study of progenitor dedifferentiation in mouse testis

研究代表者

鈴木 伸之介（Suzuki, Shinnosuke）

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教

研究者番号：00755994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 17,790,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの精巣では、一部の分化が進んだ前駆細胞（Progenitor）が精子幹細胞（SSCs）へと脱分化するが、そのメカニズムの理解は進んでいない。本研究では、ProgenitorがSSCsへと脱分化するメカニズムを理解するため、単一細胞レベルの遺伝子発現解析、脱分化するProgenitorを可視化するマウスの解析、Progenitorで生じる脱分化を効率的に解析可能な実験系の開発を行った。その結果、遺伝子発現レベルではSSCsとProgenitorの間に位置する細胞集団が、SSCsへと脱分化する可能性が強いこと、さらにmTORC1の抑制が脱分化に関与している可能性が強く示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マウス未分化精原細胞に含まれる亜集団を再定義し、亜集団内で可逆的な転換が生じている可能性を示すことができた。また、その可逆的な転換にmTORC1シグナルの抑制が関与している可能性も見出すことができた。ヒトにおいても少数のProgenitorがSSCsへと脱分化していることが1細胞レベルの遺伝子発現解析から予測されているため（Guo J et al., 2018, Cell Res）、mTORC1の抑制を活用することで、男性不妊を改善する治療法の確立に繋がることを期待する。

研究成果の概要（英文）：In the mouse testis, clones of undifferentiated spermatogonia can interconvert between spermatogonial stem cells (SSCs) and progenitors, but the mechanism behind this process remains poorly understood. In this study, we aimed to understand the mechanism of interconversion between SSCs and progenitors by using single-cell RNA-seq analysis, analyzing reporter mice which can monitor this process, and developing an experimental system to efficiently analyze this process in vitro. As the results from RNA velocity analysis, we found a possibility that cells, which annotated the intermediate state between SSCs and progenitors could interconvert between SSCs and progenitors. Finally, our results strongly suggest that the inhibition of mTORC1 is involved in the interconversion between SSCs and progenitors.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：精子幹細胞 精巣 不均一性

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精巣細胞のうち未分化精原細胞には、基底状態の精子幹細胞 (Spermatogonial stem cells: SSCs) と分化が進んだ前駆細胞 (Progenitor) の少なくとも 2 種類の細胞系譜が含まれる (図 1)。マウスでは、一部の Progenitor が SSCs へと脱分化し得ることが報告されている (Nakagawa T et al., 2010, *Science*)。ただし、正常マウスの精巣内では非常に少数の Progenitor が SSCs へと脱分化しているものの、頻度や割合などは未だ明らかになっていない。また、人為的な SSCs 欠損による爆発的に増殖した Progenitor からの SSCs への脱分化誘導法 (Nakagawa T et al., 2010, *Science*) が、Progenitor の脱分化誘導メカニズムを解析する際にこれまで用いられてきた。しかし、この脱分化誘導法は正常の脱分化とは異なる可能性があるため、Progenitor の脱分化を理解し、効率的にモニタリング可能な実験系の開発が求められる。

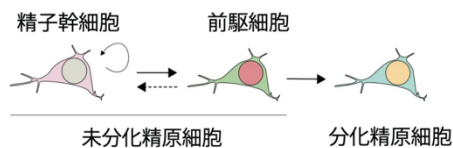


図 1. マウス未分化精原細胞の概要

また、ヒトにおいても少数の Progenitor が SSCs へと脱分化していることが 1 細胞レベルの遺伝子発現解析から予測されているため (Guo J et al., 2018, *Cell Res*)、精巣内の Progenitor で生じる脱分化誘導メカニズムは、哺乳類で保存されている可能性が高い。そのため、Progenitor で生じる脱分化誘導メカニズムの理解を深めることは、男性不妊を改善する治療法の確立に繋がる。しかし、これまでのマウスを用いた実験系は 1 種類のレポーター、および数珠繋ぎ状細胞の細胞数を基にした現象を観察したものに留まっているため、一部の Progenitor が SSCs へと脱分化するメカニズムの理解は未だ十分ではない。

2. 研究の目的

本研究では、一部の Progenitor が SSCs へと脱分化するメカニズムを理解することを目的とする。また、この目的を達成するため、Progenitor の脱分化を効率的にモニタリング可能な実験系の開発も目指す。

3. 研究の方法

(1) 生体内のマウス未分化精原細胞における単一細胞レベルの遺伝子発現解析

一部の Progenitor が SSCs へと脱分化するメカニズムを理解するためには、まず生体内の未分化精原細胞集団を細分化し、どの Progenitor が脱分化しやすいのかを確認する必要がある。そこで、単一細胞レベルの遺伝子発現 (scRNA-seq: single cell RNA-seq) を未成熟 RNA と成熟 RNA の割合から細胞運命を推定する RNA velocity を用いて解析した。また、得られた結果から推定されたシグナル伝達経路を低分子化合物の投与により、生体内で制御した時の Progenitor の振る舞いを RNA velocity により解析した。

(2) 脱分化する Progenitor を可視化するマウスの解析

Progenitor を可視化するため、脱分化する Progenitor で発現が確認された遺伝子の発現をレポーターによって可視化できるマウスを探索した。2 種類の遺伝子 (*Stella/Dppa3* と *Pou5f1*) は、その発現を蛍光レポーター (CFP、GFP、もしくは mRFP) により可視化できるトランスジェニックマウスが、理化学研究所に寄託されていた。また、1 種類の遺伝子 (*Sax3*) は新しい蛍光レポーター (CFP) マウスを CRISPR/Cas9 システムにより作出した。精巣内でのそれぞれのレポーターの発現は、免疫蛍光染色および FACS により確認した。

(3) Progenitor で生じる脱分化を効率的に解析可能な実験系の開発

マウス未分化精原細胞は、2003 年に京都大学の篠原先生らの研究グループにより、長期間培養可能な実験系が確立されている。一方で、この培養系に含まれるマウス未分化精原細胞がどのような状態にあるのかは、理解が進んでいない。そこで、(2) で解析を進めた蛍光レポーターと既存の SSCs レポーターを組み合わせることで、培養系に含まれるマウス未分化精原細胞の状態を把握した。また、(1) の解析で同定したシグナル伝達経路の制御により、脱分化を効率的に解析可能な実験系の開発に挑戦した。

4. 研究成果

(1) 生体内のマウス未分化精原細胞における単一細胞レベルの遺伝子発現解析

RNA velocity 解析の結果、遺伝子発現レベルでは SSCs と Progenitor の間に位置する細胞集団が、SSCs へと脱分化する可能性が強いことを見出した。また、この集団を前期 Progenitor と名付け、今まで Progenitor と呼ばれていた細胞集団を後期 Progenitor と名付けた (Suzuki S et al., 2021, *Cell reports*) (図 2A)。

さらに発現変動遺伝子解析と Pathway 解析を組み合わせた結果、MAPK、AKT、mTORC1 シグナルの変化が推定された。そこで免疫染色と FACS を組み合わせて解析した結果、SSCs と比較して、Early progenitor で mTORC1 シグナルが活性化していることが同定された。この結果は、mTORC1 の活性化が SSCs から前期 Progenitor への分化に関与している可能性と、mTORC1 の抑制が前期 Progenitor の脱分化に関与している可能性の 2 つの可能性が考えられた。これらの可能性を検証するため、mTORC1 に対する阻害剤 (Rapamycin) をマウスへ投与し、投与から 1 日後の未分化精原細胞の動態を RNA velocity により解析した (図 2B)。その結果、野生型マウスで確認された Early progenitor から SSCs へと脱分化している細胞系譜が、Rapamycin 処理マウスでは見られなくなった。このことから、mTORC1 の抑制が前期 Progenitor の脱分化に関与している可能性が強く示唆された。

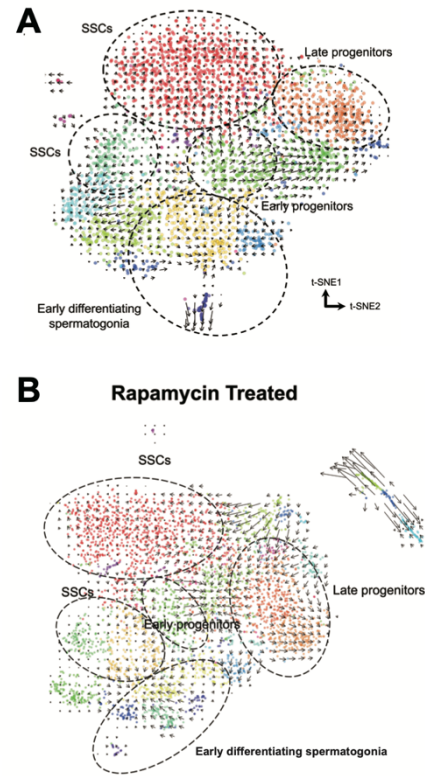


図 2. RNA velocity 解析によるマウス未分化精原細胞の動態の推定

(2) 脱分化する未分化精原細胞を可視化するマウスの解析

(1) で解析した RNA velocity により得られた結果は、時間軸のない断片的な結果に過ぎない。特に一部の Progenitor が SSCs へと脱分化するメカニズムを深く理解するためには、時間軸を入れ、脱分化する細胞の挙動をモニタリングする必要がある。そこで、前期 Progenitor で発現する遺伝子の中でも、*Stella/Dppa3* と *Pou5f1* は、その発現を蛍光レポーターにより可視化できるトランスジェニックマウスが作出されていた (*Dppa3*-CFP, *Dppa3*-GFP, *Pou5f1*-mRFP)。そこで、3 種類のトランスジェニックマウスの精巣において、それぞれの発現を FACS および免疫染色にて確認した。免疫染色では、精巣においてすべての蛍光レポーターの発現が確認されたものの (Suzuki S et al., 2021, *Reproduction*)、FACS では、*Pou5f1*-mRFP の発現のみが確認された。また SSCs マーカー (*Gfra1*) および前期 Progenitor で発現が確認された遺伝子 (*Sox3*) との共免疫染色により、*Pou5f1*-mRFP の発現は期待通り、SSCs では発現が認められず、前期 Progenitor で発現が開始することも確認できた。しかし、イメージング用顕微鏡ではその発現が検出感度以下であった。そこで、次に *Sox3*-CFP マウスを CRISPR/Cas9 システムにより作出した。このマウスの精巣をイメージング用顕微鏡で確認したところ、CFP の発現が確認されたため、現在はこのマウスの解析を進めている。

(3) Progenitor で生じる脱分化を効率的に解析可能な実験系の開発

生体内において Progenitor が脱分化する頻度は、分化する頻度に比較して多くない。そのため、Progenitor で生じる脱分化を制御するメカニズムを理解するためには、効率的に解析可能な実験系を開発する必要がある。そこで、マウス未分化精原細胞の培養系に注目し、この培養系に含まれるマウス未分化精原細胞がどのような状態にあるのかを簡便に確認できる実験系をまず構築した。(2)の結果を踏まえ、*Gfra1*-GFP と *Pou5f1*-mRFP の 2 種類の蛍光レポーターの遺伝子を持つ精子幹細胞の培養した結果、培養系に含まれるマウス未分化精原細胞は、割合は異なるものの、生体内の状態をよく反映した状態にあることが見出された。さらに、MAPK、mTORC1 などのシグナル伝達経路の制御により、脱 Progenitor で生じる脱分化を効率的に解析可能な実験系の開発に成功した。今後はこの実験系の有用性を示すと共に、論文として発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Shinnosuke, McCarrey John R., Hermann Brian P.	4. 巻 34
2. 論文標題 An mTORC1-dependent switch orchestrates the transition between mouse spermatogonial stem cells and clones of progenitor spermatogonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108752 ~ 108752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108752	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 Suzuki Shinnosuke, McCarrey John R, Hermann Brian P	4. 巻 161
2. 論文標題 Differential RA responsiveness among subsets of mouse late progenitor spermatogonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 645 ~ 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-21-0031	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 該当する
1. 著者名 Hwang Young Sun, Suzuki Shinnosuke, Seita Yasunari, Ito Jumpei, Sakata Yuka, Aso Hirofumi, Sato Kei, Hermann Brian P., Sasaki Kotaro	4. 巻 11
2. 論文標題 Reconstitution of prospermatogonial specification in vitro from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020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/s41467-020-19350-3	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 鈴木伸之介、吉田松生	4. 巻 3
2. 論文標題 マウス精子幹細胞が長期間精子を生産する戦略	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 408 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7407-00001-0001144-00	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4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinnosuke Suzuki, John R McCarrey, and Brian P Hermann
2. 発表標題 Differential RA responsiveness among subsets of mouse late progenitor spermatogonia
3. 学会等名 Fertility Conference 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木伸之介
2. 発表標題 マウス精子幹細胞の不均一性は制御できるのか？
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木伸之介
2. 発表標題 マウス精子幹細胞の培養系の現状と未来
3. 学会等名 第4回有性生殖研究会「未来へ向けた生殖研究」（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 伸之介, 吉田 松生, Brian P. Herman, 阿部 訓也
2. 発表標題 マウス精子幹細胞株の不均一性の実態とその制御
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------