

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380168

研究課題名(和文) 精原幹細胞の自己複製と分化を調節する分子スイッチの同定

研究課題名(英文) Identification of regulatory molecules governing self-renewal versus differentiation of spermatogonial stem cells

研究代表者

久保田 浩司 (Kubota, Hiroshi)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：80263094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：KIT受容体を発現しない分化不全精原幹細胞と野生型精原幹細胞の遺伝子発現解析により、精原幹細胞におけるKITの発現が精原幹細胞の未分化性の維持に働いていることが示唆された。野生型精原幹細胞と比較して分化不全精原幹細胞において発現量が低下している遺伝子群の中で因子Xに焦点を当て解析を行った。因子Xは精巣において精原幹細胞の分化に伴い速やかに発現量が減少した。培養精原幹細胞において因子Xの発現を低下させた場合は分化が誘導され、過剰発現させた場合は自己複製増殖が阻害された。以上の結果より、因子Xは精原幹細胞の自己複製と分化を調節する新たな制御因子であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、精原幹細胞の自己複製と分化を制御する新たな因子として因子Xが同定された。これまで発現量の低下により分化を誘導する因子は複数同定されているが、過剰発現により自己複製増殖を阻害する因子は同定されていない。因子Xの過剰発現による自己複製増殖の阻害は休止状態への移行である可能性がある。組織内で最も未熟な幹細胞は休止状態にあるため、因子Xの発現がそうした休止状態への移行に参与している可能性について検証することは重要である。今後の課題は、因子Xがいかに精原幹細胞の自己複製増殖と分化誘導を制御しているかを明らかにすることである。

研究成果の概要(英文)：Comparative gene expression analysis between differentiation-deficient spermatogonial stem cells (SSCs) and wild-type SSCs indicated that the KIT expression involves in maintaining an undifferentiated state of SSCs. Factor X was identified as one of the genes that were down-regulated in differentiation-deficient SSCs. Factor X expression was restricted in undifferentiated spermatogonia including SSCs in murine testes. Down regulation of Factor X in cultured SSCs induced differentiation. On the other hand, when Factor X was over-expressed in cultured SSCs, their self-renewing proliferation was dramatically impaired. These results suggest that Factor X, which was identified in this study, is a regulatory molecule governing self-renewal and differentiation of murine SSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：生殖幹細胞 精原幹細胞 精子形成 自己複製

### 1. 研究開始当初の背景

雄の生殖幹細胞である精原幹細胞は自己複製と分化のバランスを厳密に保つことによって生涯にわたって行われる精子形成を維持している。マウス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)に依存している一方、分化はKIT リガンド(KITL)によって進められる。KITL の受容体であるKIT 受容体は分化型精原細胞に強く発現するが、精原幹細胞の細胞表面にも弱く発現している。これまでの申請者らの研究により、精原幹細胞はKITL の受容体であるKIT を発現していなくても自己複製できるが、KIT を発現する精原幹細胞より自己複製能が低下していることが明らかになった。このことはKITL/KIT からの刺激が精原幹細胞の自己複製と分化の双方に参与している可能性を示唆していた。これまでGDNF を中心に精原幹細胞の自己複製が解析されてきたが、精原幹細胞におけるKIT が関与する自己複製の機序は不明であった。

### 2. 研究の目的

KIT 受容体からの刺激を受けることができない精原幹細胞はより分化に傾倒していることが考えられ、この自己複製と分化の境界に位置する精原幹細胞と野生型精原幹細胞を比較解析することにより、精原幹細胞の自己複製と分化の運命決定を司る分子スイッチを同定する。

### 3. 研究の方法

(1) Kit 受容体遺伝子に変異がある  $Kit^{Wv}$  精子形成不全マウス ( $W^v/W^v$ ) 由来精原幹細胞株とKIT を弱く発現する野生型精原幹細胞株のトランスクリプトームの比較を行う。

(2) 野生型精原幹細胞株において発現が高い遺伝子の中から分子スイッチとなりうる可能性のある遺伝子に関して、その発現量ならびに生体内での発現パターンから候補遺伝子を絞り込む。

(3) 精原幹細胞における機能解析によるスクリーニングを各候補遺伝子について行いさらに絞り込む。

(4) 精原幹細胞の誘導発現系を確立し、候補遺伝子の発現制御を行うことができる精原幹細胞株を樹立する。

(5) 候補遺伝子の発現制御により精原幹細胞の自己複製と分化の人為的制御を試みる。

### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイを用いてKit を発現しない  $Kit^{Wv}$  精原幹細胞株とKIT を弱く発現する野生型精原幹細胞株のトランスクリプトームを比較解析した結果、 $Kit^{Wv}$  精原幹細胞において発現が低下している49 遺伝子を同定した。そのうち野生型精原幹細胞において発現量が高かった7 遺伝子に関して、定量的RT-PCR 法を用いて精原幹細胞株と生体内

の精原細胞における発現パターンを解析した。その結果、7 遺伝子いずれも野生型精原幹細胞株において高発現が認められた。生体内の精原幹細胞においては、3 遺伝子において高発現が認められ、さらに分化に従って発現量が低下することが確認された。残りの4 遺伝子は発現量が低いか、もしくは分化に伴う変化が顕著に認められなかった。生体内でも高発現していた3 遺伝子の発現パターンから  $Kit^{Wv}$  精原幹細胞は分化に傾倒していることが示唆された。

(2) 次にその3 遺伝子(因子X、因子Y、因子Z)について精原幹細胞における機能解析を遺伝子ノックダウン法により検討した。その結果、因子X の発現量を低下させた場合に未分化マーカーの発現低下を認めた。因子Y ならびに因子Z のノックダウンでは未分化もしくは分化マーカーの発現量に変化は認められなかった。以上の結果より、因子X が精原幹細胞の未分化の維持に関与していることが示唆された。さらに因子X の発現は精原幹細胞株においてGDNF 依存性の発現制御を受けていた(図1)。

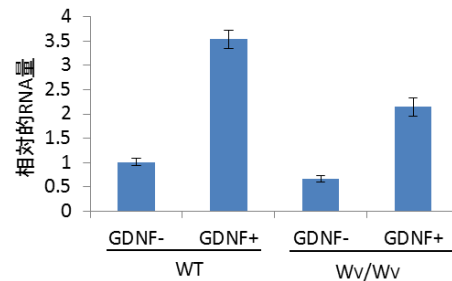


図1. 定量的RT-PCR による  $Kit^{Wv}$  精原幹細胞株 ( $W^v/W^v$ ) と野生型精原幹細胞株 (WT) における因子X の発現解析。GDNF を除去して分化を誘導すると因子X の発現量は速やかに低下した。

(3) 因子X の精巣における発現を免疫組織化学的に解析したところ、精原幹細胞の前駆細胞であるゴノサイトから発現が認められ、精原幹細胞に移行していく過程で高発現を維持しているが、分化型精原細胞への分化に伴い急激に発現が低下することが明らかとなった(図2)。

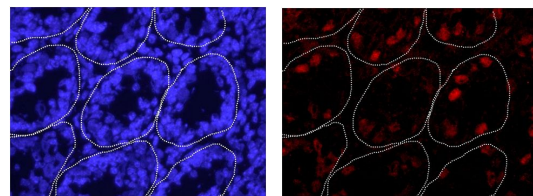


図2. 生後7日齢マウス精巣における因子X の免疫組織化学的発現解析

左図：DAPI 染色による核の対比染色像  
 右図：抗因子X抗体と反応させたのち蛍光色素 Alexa568(赤色)で標識した 2 次試薬により抗因子X抗体を検出した染色像  
 (右図と左図は同視野)  
 白線は精細管を示している。因子 X を発現する細胞は精原幹細胞を含む未分化精原細胞に局限していた。

(4) 因子 X の過剰発現系および誘導発現系を確立するため、精原幹細胞における外来遺伝子の安定発現株の樹立系の確立を試みた。精原幹細胞において機能することが明らかにされているレンチウイルスベクターは実験系に制約が生じるため、非ウイルスベクター系であるトランスポゾンベクターの有効性を検討した。赤色蛍光タンパク質 (RFP) 遺伝子と抗生物質耐性遺伝子を有するトランスポゾンベクターを精原幹細胞に導入し、薬剤選択を行ったところ、安定的 RFP 遺伝子を発現する精原幹細胞株が得られた。この結果から、トランスポゾンベクターにより精原幹細胞の安定発現株の樹立が可能であることが示された(図 3)。

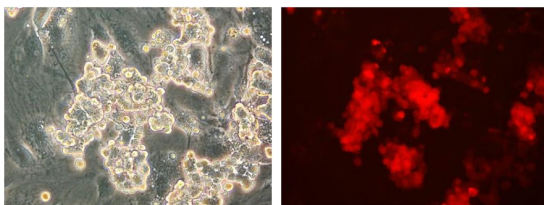


図 3. 赤色蛍光タンパク質 (RFP) のトランスポゾン発現ベクターを精原幹細胞に遺伝子導入し、抗生物質による選択ののち RFP を安定的に発現する精原幹細胞株を樹立した。  
 左図：フィーダー細胞上に増殖する精原幹細胞の明視野像。  
 右図：RFP を発現する精原幹細胞の暗視野像。全ての精原幹細胞が RFP を発現していた。  
 (右図と左図は同視野)

(5) トランスポゾン遺伝子導入系を用いて因子 X を恒常的に過剰発現する精原幹細胞株の樹立を試みたところ、因子 X を過剰発現する精原幹細胞は安定株樹立のための抗生物質による遺伝子導入細胞の選択過程で、ごく少数の細胞しか生存できないことが明らかとなった。全ての精原幹細胞が死滅するわけではなく、少数の遺伝子導入精原幹細胞が生存していることから、増殖抑制が起こっている可能性が示唆された(図 4)。

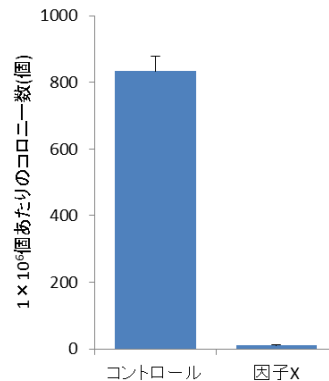


図 4. 因子Xのトランスポゾン発現ベクターを精原幹細胞に遺伝子導入し、抗生物質による薬剤選択ののち生存した精原幹細胞のコロニーを計数した。

因子 X を発現しないコントロールのベクターと比較して、因子 X を発現するベクターを遺伝子導入した場合、ほとんどの細胞が生存できなかった。数個の細胞からなる小さいコロニーは観察された。

(6) 精原幹細胞のコンディショナル発現系を構築するために、テトラサイクリン応答性転写因子 (rtTA) を恒常的に全組織で発現する rtTA トランスジェニックマウスから精原幹細胞株を樹立したが、この rtTA 精原幹細胞では rtTA の発現抑制がおり、きわめて少量の rtTA しか発現していなかった。結果として、テトラサイクリン誘導系が精原幹細胞において機能しないことが明らかとなった。対照実験として行った rtTA 線維芽細胞では、rtTA を発現しており誘導発現が機能することが示された。

本研究課題において、因子 X の発現量の増減が精原幹細胞の自己複製と分化を制御している可能性が示唆された。因子 X を過剰発現させた場合に、ほとんど精原幹細胞が増殖しなかったことは、一般的な幹細胞の性質と合致する。すなわち、多くの組織幹細胞において、最も未分化な幹細胞は増殖をほとんどしないことが示されており、因子 X の過剰発現により精原幹細胞がより未分化状態に移行し、増殖を行わなくなったと考えられる。今後の課題は、精原幹細胞においてテトラサイクリン誘導発現系以外の誘導発現系を確立し、因子 X の発現を人為的に制御することにより精原幹細胞の自己複製と分化の制御が可能か検証することである。

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 2 件)

Kazue Kakiuchi, Ayaka Tsuda, Yuki Goto, Takanori Shimada, Kazumi Taniguchi, Kiyohiko Takagishi, Hiroshi Kubota, (2014): Cell-Surface DEAD-Box Polypeptide 4-Immunoreactive Cells and Gonocytes Are Two Distinct Populations in Postnatal Porcine Testes. Biology of Reproduction, 90:82.

Hiroshi Kubota, Xin Wu, Shaun M Goodyear, Mary R Avarbock, Ralph L Brinster (2011): Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. FASEB Journal, 25: 2604-2614.

[学会発表](計5件)

Kazue Kakiuchi, Kiyohiko Takagishi, Hiroshi Kubota, 「Proteomic profiling of nuclear proteins in mouse spermatogonial stem cells undergoing differentiation」, 第36回日本分子生物学会、2013年12月5日、神戸ポートアイランド(兵庫)

Kazue Kakiuchi, Kiyohiko Takagishi, Hiroshi Kubota, 「Comparative nuclear proteomic analysis of stem spermatogonia and differentiating spermatogonia induced by retinoic acid」, 12<sup>th</sup> Human Proteome Organization World Congress (HUPO2013), 2013年9月16日、パシフィコ横浜(神奈川)

垣内 一恵, 高岸 聖彦, 久保田 浩司, 「マウス精原幹細胞における核タンパク質のプロテオーム解析」, 第36回日本分子生物学会、2012年12月13日、マリンメッセ福岡(福岡)

高岸 聖彦, 小林 君任, 垣内 一恵, 久保田 浩司, 「成熟培地への糖基質の添加がブタ卵丘細胞のヒアルロン酸合成に及ぼす影響」, 2012年8月30日、第30回日本受精着床学会総会、大阪国際会議場(大阪)

久保田 浩司, 「非齧歯類哺乳動物の精原幹細胞培養系」, 第104日本繁殖生物学会、2011年9月17日、いわて県民情報交流センター・アイーナ(岩手)

## 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