

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659090

研究課題名（和文）ヒト多能性幹細胞の精巣内移植法による精子細胞分化誘導法の確立

研究課題名（英文）Induction of spermatogenic cells from human multipotent stem cell by microinjection into the mouse testis

研究代表者

年森 清隆（TOSHIMORI KIYOTAKA）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20094097

研究成果の概要（和文）：

Muse 細胞調整後、精子幹細胞の無い W/W^v ミュータント雄マウス精巣内に移植して定着性を検討し、次の点が明らかになった。長距離移動による Muse 細胞のダメージは無く生細胞数を確保できる。移植前培地中に長時間置くと凝集が起こり、移植効率が下がる。移植用培地からアルブミンを抜くと効率良く微小注入できる。移植後 3 ヶ月では、GFP のシグナルは認められないことから、単純な Muse 細胞移植では精子細胞分化への誘導はできないと思われた。

研究成果の概要（英文）： EGFP-tagged Muse cells from human mesenchymal cells were prepared by established method. Thus prepared EGFP-Muse cells were microinjected into the testes (testicular seminiferous tubules) of W/W^v mutant male mice lacking spermatogenic stem cells, and we found the following results. Enough amount of live Muse cells were obtained even after long time journey for several hours. Muse cells prepared caused cell-cell aggregation when they were placed in the conditioned medium containing albumin for microinjection, but the microinjection efficiency rate increased when they were microinjected using medium lacking albumin. However, 3 month later, EGFP-Muse cell signal was not recognized at all in the injected testes, indicating that Muse cells in the transplanted medium in this study could not develop to the spermatogenic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：解剖学一般（含組織学・発生学）

科研費の分科・細目：研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：Muse 細胞、精巣内移植、精子幹細胞、精子形成

1. 研究開始当初の背景

重篤な男性不妊症（無精子症、無力精子症、乏精子症）は、精子細胞あるいはセルトリ細胞が起因するため治療法がない。従って、人工的に精子細胞を作成しない限り、児を得る可能性はない。ES 細胞を用いたマウス生殖細胞作成の試みがなされてきたが、まだ成功していない。ヒト細胞を用いた研究はこれまで許可されてこなかったが、2010 年から研究可能となった。

2. 研究の目的

ヒト多能性幹細胞から発見された Muse 細胞に EGFP 蛍光タグを付けた EGFP-Muse 細胞を用いて精巣内移植（微小注入 microinjection）法を行い、ヒト精子細胞の分化誘導法を確立することを最終目的として、その手がかりの情報を得る。

3. 研究の方法

ヒト多能性幹細胞である Muse 細胞は、CD9 のような幾

らかの生細胞系列の遺伝子を有しているため、誘導方法を工夫すれば生細胞系列へと誘導できることが予想される。そのため、まずEGFP-Muse細胞を従来の方法で調整し、通常のマウス精巣細胞を用いた微小注入法で成功している手技を応用して、精巣内への移植を行い、EGFP-Muse細胞がどのように定着性するか、あるいはどこに問題があるのかを検討し、今後への手がかりとなる情報を得る。

4. 研究成果

研究協力者のいる仙台で分離して初期培養したMuse細胞を調整し、千葉まで移動してW/Wvミュータント雄マウスの精巣内（セルトリ細胞はいるが精細胞幹細胞がいない精巣内）に微小注入して、その定着性を検討した結果、分かった点は下記である。1)長時間移動後もMuse細胞のダメージは少なく、十分な生細胞数を確保できる。2)移植前にEGFP-Muse細胞を移植用培地に入れて長時間置くと細胞の凝集が起こり易くなり、注入移植効率が減少する。この細胞凝集の原因が移植培地内にあるアルブミンである可能性が高かったため、移植用培地にアルブミンを入れずに微小注入すると効率的に移植できる。3)しかし、移植後3ヶ月においても精巣内にEGFPのシグナルはバックグラウンド以外に認められなかった。このことから、従来の細胞調整法によってMuse細胞を移植するだけでは、精子細胞分化への誘導はできないと推測された。これらを解決するためには、次の点を明らかにする必要があると思われた。1) Muse細胞が、始原生殖細胞あるいは精子幹細胞としての性質をどの程度持っているかを再度詳細に評価する。2) 精巣移植の際に遺伝子導入が必要であるかどうか、についての情報が必要である。そのため検討が必要である。3) 遺伝子導入せずに、外来性の補助因子のみで十分かどうかについて検討する必要がある。移植に際して、何らかの補助因子が必要であるか、検討する必要がある。必要であれば、どの因子が良いかについて検討する。これらについて、種々検討した結果、Muse細胞は自然に発生する精子幹細胞が持っている遺伝子の全てを持ってはいないが、CD9以外に幾つかの遺伝子は既に持っているとして推測された。一方、Muse細胞そのままでは精細胞へ分化誘導できないというこれまでの結果を加味すると、今後の方針としては注入移植と共に何らの補助因子の補充が必要になるのかもしれないと推測された。それでも成功しない場合は、分化誘導するための最小限の遺伝子導入が必要になるのかもしれないと推測された。

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 11 件)

- 1) **Ito C, Yamatoya K**, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, **Toshimori K**. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.* 2013. In press. doi: 10.1007/s00441-013-1650-y 査読有
- 2) Mizuno Y, Ninomiya Y, Nakachi Y, Iseki M, Iwasa H, Akita M, Tsukui T, Shimozawa N, **Ito C, Toshimori K**, Nishimura M, Hara H, Maeba R, Okazaki T, Alodaib AN, Amoudi MA, Jacob M, Alkuraya FS, Horai Y, Watanabe M, Motegi H, Wakana S, Noda T, Kurochkin IV, Mizuno Y, Schönbach C, Okazaki Y. Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal location of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. *PLoS genet.* 9(2): e1003286. 2013. doi: 10.1111/and.12030 査読有
- 3) Miyazaki T, Mori M, Yoshida CA, **Ito C, Yamatoya K**, Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Kawane T, Izumi S, **Toshimori K**, Komori T. Galnt3 deficiency disrupts acrosome formation and leads to oligoasthenoteratozoospermia. *Histochem and Cell Biol.* 139(2): 339-354. 2013. doi: 10.1007/s00418-012-1031-3 査読有
- 4) Toyama Y, Chen C, **Yamatoya K, Maekawa M, Ito C, Toshimori K**. Unique structures of organelles observed in primary spermatocytes after micro-injection of protein solutions such as immunoglobulin into the lumen of the seminiferous tubules in mice and rats. *Andrologia.* 2012. In press. doi: 10.1371/journal.pgen.1003286 査読有
- 5) **Toshimori K**. Dynamics of the mammalian sperm membrane modification leading to fertilization: a cytological study. *J Electron Microsc.* 60 Suppl 1: S31-42. 2011. Review doi: 10.1093/jmicro/dfr036. 査読有
- 6) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, **Toshimori K**, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol.* 11:22. 2011. doi: 10.1186/1471-213X-11-22. 査読有
- 7) Takiguchi H, Murayama E, Kaneko T, Kurio H, **Toshimori K**, Iida H. Characterization and subcellular localization of Tektin 3 in rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 78(8):611-620. 2011. doi: 10.1002/mrd.21352. 査読有
- 8) **Yamatoya K, Ito C**, Araki M, Furuse R, **Toshimori K**. One-step collagenase method for zona pellucida removal in unfertilized egg: easy and gentle method for large-scale preparation. *Reprod Med Biol.* 10(2):97-103.

2011. doi: 10.1007/s12522-011-0075-8 査読有
- 9) Hattori H, Nakajo Y, Ito C, Toyama Y, Toshimori K, Kyono K. Birth of a healthy infant after intracytoplasmic sperm injection using pentoxifylline-activated sperm from a patient with Kartagener's syndrome. *Fertil Steril*. 95(7): 2431e9-e11. 2011. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.074. 査読有
- 10) Katagiri YU, Sato B, Yamatoya K, Taki T, Goto-Inoue N, Setou M, Okita H, Fujimoto J, Ito C, Toshimori K, Kiyokawa N. GalNAc β 1,3-linked paragloboside carries the epitope of a sperm maturation-related glycoprotein that is recognized by the monoclonal antibody MC121. *Biochem Biophys Res Commun*. 406(3):326-331. 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.019. 査読有
- 11) Maekawa M, Ito C, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Fujita E, Momoi T, Toshimori K. Localization of RA175 (Cadml), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, in the mouse testis and analysis of male infertility in the RA175-deficient mouse. *Andrologia*. 43(3): 180-188. 2011. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01049.x. 査読有
- [学会発表] (計 29 件)
- 1) 年森清隆、伊藤千鶴、大和屋健二、陳城、前川眞見子 EQT-EGFP transgenic mouse を用いた time laps imaging と微細構造の対比による先体膜タンパク質 equatorin の挙動解析 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会(ポスター) サポート高松・かがわ国際会議場(香川県) 2013 年 3 月 30 日
- 2) 伊藤千鶴、大和屋健二、陳城、前川眞見子、神村今日子、武藤透、年森清隆 抗 equatorin 抗体はヒト先体マーカーとして有効である 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会(ポスター) サポート高松・かがわ国際会議場(香川県) 2013 年 3 月 30 日
- 3) 前川眞見子、大和屋健二、陳城、野崎正美、伊藤千鶴、年森清隆 マウス精巣および精子における膜タンパク質ベシジン分子の解析 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会(ポスター) サポート高松・かがわ国際会議場(香川県) 2013 年 3 月 30 日
- 4) 大和屋健二、伊藤千鶴、大澤光次郎、陳城、前川眞見子、岩間厚志、幡野雅彦、年森清隆 精子先体赤道部は、先体反応の過程で IZUMO1 の flip-flop による N 末端の露出の後、脆くなる 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会(ポスター) サポート高松・かがわ国際会議場(香川県) 2013 年 3 月 30 日
- 5) Toshimori K, Ito C. Correlation between sperm head morphology and oocyte activation ability. **The 63rd Congress of Korean Society for Reproductive Medicine (KSRM) 2012.** (Symposium) Seoul Women's University. Seoul (Korea) 2012.12.1.
- 6) Toshimori K, Yamatoya K, Ito C. Subcellular and molecular events during mouse acrosome reaction mediated by fertilization-related protein equatorin. **International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animal and Plants. Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting(MCBEEC).** (Symposium) Hotel Nagoya Garden Palace. Nagoya (Japan) 2012.11.12-16.
- 7) Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. Equatorin (EQT) as a human sperm acrosome biomarker for the fertilization process. **International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animal and Plants. Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting(MCBEEC).** (Poster) Hotel Nagoya Garden Palace. Nagoya (Japan) 2012.11.12-16.
- 8) Yamatoya K, Ito C, Osawa M, Chen C, Maekawa M, Iwama A, Hatano M, Toshimori K. Categorization of acrosome reaction and isolation of those sperm for biochemical analyses. **International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animal and Plants. Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting(MCBEEC).** (Poster) Hotel Nagoya Garden Palace. Nagoya (Japan) 2012.11.12-16.
- 9) 伊藤千鶴、大和屋健二、兼子 智、年森清隆 抗 perinuclear theca MN13 抗体を使った新しい精子評価法 第 57 回日本生殖医学会総会・学術講演会(口演)長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール(長崎県) 2012 年 11 月 9 日
- 10) 大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆 先体反応過程における精子膜と先体膜タンパク質の変化 第 57 回日本生殖医学会総会・学術講演会(ポスター)長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール(長崎県) 2012 年 11 月 8 日
- 11) 年森清隆 精子膜に起こる配偶子認識と融合に関する超微形態および分子レベルの解明 新学術領域研究 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第 5 回領域会議 下田東急ホテル(静岡県) 2012 年 6 月 13 日
- 12) 年森清隆 生殖細胞の分化と受精/初期発生: 制御機構と不妊症治療への応用研究 第 88 回千葉医学会学術大会(招待講演)千葉大学医学部附属病院 第一講堂(千葉県)

- 2012年6月12日
- 13) 年森清隆 S-4 バイオイメージングにより明らかにされた動・植物の有性生殖メカニズム Fertilization *in vivo* revealed by live imaging and electron microscopy. 日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会(シンポジウム) つくば国際会議場(茨城県)2012年5月14日
 - 14) 伊藤千鶴、大和屋健二、陳城、前川眞見子、年森清隆 B-1 Live cell/ molecular imaging 先体膜タンパク質 Equatorin を指標したマウス先体形成の解析 Acrosomal biogenesis by tracking acrosomal membrane protein Equatorin in mice. 日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会(口演)つくば国際会議場(茨城県)2012年5月14日
 - 15) 大和屋健二、伊藤千鶴、陳城、前川眞見子、年森清隆 初期の先体反応における精子の形態とタンパク質の解析 Analyses of morphology and proteins of sperm in early stage acrosome reaction. 日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会(ポスター)つくば国際会議場(茨城県)2012年5月14日
 - 16) 前川眞見子、陳城、大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆 マウス精巣および精子におけるベシジン分子の解析 Analysis of basigin in the testis and sperm in the mouse. 日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会(ポスター)つくば国際会議場(茨城県)2012年5月14日
 - 17) Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. Unique integration of fertilization-related protein Equatorin (EQT) into the acrosomal membrane during spermatogenesis. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (Symposium) 山梨大学甲府キャンパス、ベルクラシック甲府(山梨県)2012年3月28日
 - 18) Yamatoya K, Ito C, Cheng C, Maekawa M, Toyama Y, Toshimori K. Separation of early stage acrosome reacted sperm and analysis of the proteins. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (ポスター) 山梨大学甲府キャンパス、ベルクラシック甲府(山梨県)2012年3月28日
 - 19) 前川眞見子、大和屋健二、陳城、伊藤千鶴、外山芳郎、年森清隆. マウス精巣および精子におけるモノカルボン酸トランスポーターの局在 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (ポスター) 山梨大学甲府キャンパス、ベルクラシック甲府(山梨県)2012年3月28日
 - 20) Toshimori K, Ito C, Yamatoya K, Maekawa M, Toyama Y. Fertilization analyzed by live imaging in the mouse. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (講演) 山梨大学甲府キャンパス、ベルクラシック甲府(山梨県)2012年3月26日
 - 21) 片桐洋子、佐藤伴、大和屋健二、井上菜穂子、伊藤千鶴、年森清隆 GalNAc beta 1,3-linked paragloboside carries the epitope of a sperm maturation-related glycoprotein that is recognized by the monoclonal antibody MC121. 新学術領域研究 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第 4 回領域会議 (ポスター) 筑波大学総合研究棟 A (茨城県)2012年1月11日
 - 22) Mizuno Y, Ninomiya Y, Iseki M, Iwasa H, Akita M, Tsukui T, Ito C, Toshimori K, Shimozawa N, Nishimukai M, Hara H, Maeba R, Okazaki T, Horai Y, Watanabe M, Motegi H, Wakana S, Noda T, Kurochkin Igor V, Mizuno Y, Schoenbach C, Okazaki Y. Tysnd1 deficiency interferes with mouse peroxisomal functions. 第 34 回日本分子生物学会年会 (口演)パシフィコ横浜(神奈川県)2011年12月15日
 - 23) 年森清隆、伊藤千鶴 Clinical application of sperm study 精子研究の臨床応用 シンポジウム 9 男性不妊を見直す-特に造精機能の観点から 第 56 回日本生殖医学会学術講演会・総会(シンポジウム)パシフィコ横浜(神奈川県)2011年12月9日
 - 24) 年森清隆 セッション1:Sperm Preparation 精子のDNA fragmentation 第 14 回日本 IVF 学会(シンポジウム)品川プリンスホテルアネックスタワー5F(東京都)2011年10月22日
 - 25) 伊藤千鶴、大和屋健二、年森清隆 精子核周囲物質MN13と卵活性化能 日本アンドロロジー学会 第 30 回学術大会 第 17 回精子形成・精巣毒性研究会 (シンポジウム)都市センターホテル コスモスホール(東京都)2011年7月22日
 - 26) 大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆 先体反応開始まで先体を安定化させる膜タンパク質の解析 日本アンドロロジー学会 第 30 回学術大会 第 17 回精子形成・精巣毒性研究会 (口演)都市センターホテル コスモスホール(東京都)2011年7月22日
 - 27) 大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆 先体反応開始に関わる膜タンパク質の解析 新学術領域研究 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第 3 回領域会議(ポスター)関西セミナーハウス(京都府)2011年6月30日
 - 28) Toshimori K, Ito C. Role of the acrosome and perinuclear theca substances for sperm head formation. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society of Microscopy. (Symposium) Fukuoka

- (Japan) 2011.5.16-18.
29) **Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, Toshimori K.** Analysis of fertilization-related protein Equatorin with transgenic mice. **The 67th Annual Meeting of the Japanese Society of Microscopy.** (Poster) Fukuoka (Japan) 2011.5.16-18.

[図書] (計 3 件)

- 1) **年森清隆**、川内博人 第 2 版 人体の正常構造と機能. VI.生殖器. 坂井建雄、河原克雄編、総ページ数：88 ページ、2012 年 1 月 11 日出版. 日本医事新報社.
- 2) **年森清隆**、川内博人 第 2 版 人体の正常構造と機能 (縮刷版). VI.生殖器. 坂井建雄、河原克雄編、総ページ数：904 ページ、2012 年 1 月 11 日出版. 日本医事新報社
- 3) **年森清隆**、**伊藤千鶴** 卵子学 第 XVI 章-73 卵子の受精能 受精障害の検出 779-787 京都大学学術出版会 2011 年 9 月 10 日発行

[産業財産権]

- 取得状況 (計 1 件)
名称：精子機能の検査方法
発明者：年森清隆
権利者：同上
種類：特許
番号：5092149 号
取得年月日：2012 年 9 月 28 日
国内外の別：国内

[その他]

- (1) ホームページ
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devbio1/>
- (2) 報道関連情報
 - ① 新しい検査法に基づく精子の機能診断法、選別保存法の開発と生殖医療応用 2012 年 4 月 11 日 産経新聞
 - ② 新しい精子の機能診断法、選別保存法の開発と生殖医療応用 千葉日報 2012 年 4 月 11 日
 - ③ VB コンペ受賞者決定 日刊工業新聞 2012 年 4 月 11 日
報道内容 URL
http://www.vbl.chiba-u.jp/public_relations/index.html
- (3) 受賞歴
 - ① 年森清隆 なのはなコンペ 2012 ベンチャー志向先端研究部門 なのはな賞 (教員版) 受賞 2012 年 4 月 9 日
 - ② 年森清隆 なのはなコンペ 2012 ベンチャー志向先端研究部門 双葉電子記念財団助成金

ちばぎんひまわり賞受賞 2012 年 4 月 9 日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
年森 清隆 (TOSHIMORI KIYOTAKA)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20094097
- (2) 研究分担者
伊藤 千鶴 (ITO CHIZURU)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：80347054
- (3) 連携研究者
前川 眞見子 (MAEKAWA MAMIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20181571

大和屋 健二 (YAMATOYA KENJI)
千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員
研究者番号：80447309
(平成 24 年度より研究協力者)

神村 今日子 (KAMIMURA KYOKO)
千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員
研究者番号：20422264

武藤 透 (MUTOH TOHRU)
千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員
研究者番号：30422265