

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659095

研究課題名(和文)機能的セルトリ細胞の長期培養系の確立

研究課題名(英文)Development of a long-term culture system for functional Sertoli cells.

研究代表者

篠原 隆司 (Shinohara, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30322770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：これまでセルトリ細胞を長期にわたり、その機能を維持しながら培養する方法は確立されていなかった。我々は精子幹細胞のニッチ機能を保持したセルトリ細胞の培養を確立した。この培養では、EGF、FGF2の存在下でセルトリ細胞と精子幹細胞を共培養すると、後者がセルトリ細胞の下に潜り込み、敷石状のコロニーを形成し、5ヶ月以上に渡り試験管内で維持される。こうして維持された細胞は精巣に移植すると、正常な精子を作った。また、この敷石状のコロニー形成はCXCR4もしくはRETの抑制により減少したことから、これらの分子が精子幹細胞のニッチへの移動に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has not been possible to culture functional Sertoli cells for long-term. We have developed a new system for culturing mouse Sertoli cells that provide microenvironment for spermatogonial stem cells. In this culture system, Sertoli cells could maintain spermatogonial stem cell activity for more than five months when they were supplemented with epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2. Spermatogonial stem cells migrated under the Sertoli cell feeder layer and formed cobblestone colonies. Cultured spermatogonial stem cells could produce functional sperm upon transplantation into the seminiferous tubules of infertile mouse testes. Because cobblestone colony formation was suppressed by inhibiting CXCR4 or RET, these molecules may be involved in migration of spermatogonial stem cells to germline niche. Taken together, our novel culture system will provide a new system for functional assay of spermatogonial stem cells.

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：発生学

キーワード：精子形成

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々のグループでは精子幹細胞の培養系を確立し、精子幹細胞を長期にわたり幹細胞活性を持ったまま増殖させることに成功し、この細胞を Germline Stem (GS) 細胞と名付けた。GS 細胞は glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) を添加することにより樹立された。

セルトリ細胞は精細管の中で精子形成細胞と直接接触する唯一の体細胞であり、精子幹細胞の微小環境 (ニッチ) を構成する。この細胞は精子形成の支持のみならず、細胞貪食能および免疫抑制能など多彩な機能をもつユニークな細胞にも関わらず、その性質についてはほとんど分かっていない。セルトリ細胞の研究が進まなかった大きな理由の一つは、その培養系がなかったことであろうと我々は考えている。生後間もなく増殖能を失う上に、その機能をアッセイする実験系がなかったこともセルトリ細胞の研究を妨げてきた。これらの問題点を克服するために、これまでに多くの研究者がセルトリ細胞へがん遺伝子の導入などにより形質転換されたセルトリ細胞株の樹立を行ってきた。しかしながら、これまでに報告されているいずれのセルトリ細胞株も形態、機能的に生体内のセルトリ細胞とは異なっていることが指摘されている。

2. 研究の目的

このように、精子形成の研究を行う上でセルトリ細胞の培養系の確立は非常に重要な役割を果たすものである。そこで本研究ではセルトリ細胞の機能解析に役立つ長期培養系を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

試験管内精子形成が難しい理由の一つには、精巣内における精原細胞の割合が少ないことに起因すると考えられるが、申請者の GS 細胞の樹立により、スタート材料となる精原細胞を十分量準備できるという、これまではない利点がある。また精巣の培養は体細胞の過度の増殖が問題になることが多いが、GS 細胞を利用することで、純粋な生殖細胞を準備することが可能になったため、以前より格段に条件が改善されたと申請者は考えている。大きく分けて以下の二種類の実験を行った。

1) 精子幹細胞無血清培地による初代セルトリ細胞培養系の確立

我々が最近開発した精子幹細胞培養用の培地は、ラミニン上での精子幹細胞の長期培養を可能とするのみでなく、セルトリ細胞についてもその生存を促進することが確認された。血清の存在下ではより早く増殖停止がおこることより、現在の無血清の培養条件を改善することにより長期培養系を確立でき

ることが期待される。現在この培地に添加されているサイトカインは精子幹細胞の自己複製因子 (グリニ細胞由来神経性栄養因子など) が中心となっているが、これまでに分かっているセルトリ細胞の増殖促進因子となる候補サイトカイン、ホルモン (例えば FSH や BMP7 など) を現在の培地を基礎培地として用いることによりセルトリ細胞の試験管内増殖を促進する。

2) cDNA 遺伝子導入および遺伝子ノックダウンによるセルトリ細胞の増殖誘導

これまで作成されたセルトリ細胞株は SV40, polyoma large T 抗原などがん遺伝子を発現させて得られたもののみであり、生理的なセルトリ細胞の増殖制御分子を利用したものはない。現在では多くのノックアウトマウスの研究からセルトリ細胞の増殖に関与する分子が知られている。特に CDKN1B (p27) 遺伝子はセルトリ細胞に高発現しており、そのノックアウトマウスにおいてはセルトリ細胞の増殖亢進が見られ、巨大精巣の表現系を示すことが知られている。また Id2 遺伝子については増殖期のセルトリ細胞で強発現しており、生後の増殖停止と共にその発現が低下する。興味深いことに、巨大精巣を持つノックアウトマウスの場合でも精子形成は正常におこることが知られており、他個体に移植後もセルトリ細胞に精子形成支持機能には影響を与えないと予想される。我々の研究室では、p27 ノックアウトマウスを既に維持しており、実際にセルトリ細胞の増殖を促進するか否かを現在の無血清培養系を利用して調査を行う。

さらに、これらの遺伝子の cDNA および shRNA をレンチウイルスによるテトラサイクリン (Tet-on) による誘導発現系により無血清培養しているセルトリ細胞にして発現させることによりセルトリ細胞の増殖誘導がおこるか否かをスクリーニングを行う。この場合でも、生体内では遺伝子誘導がおこらないために増殖が停止し、通常の休止型のセルトリ細胞に戻ることが期待される。

4. 研究成果

1) 精子幹細胞無血清培地による初代セルトリ細胞培養系の確立

我々はセルトリ細胞を新生児 (0-2 日齢) および成体 (6 週齢) マウスより回収し、精子幹細胞培養用の無血清培地を改変することで、その試験管内での増殖が起ることを確認した。コラゲナーゼおよびトリプシンによる二段階酵素処理によりセルトリ細胞を回収した後、epidermal growth factor (EGF), FGF2,

GDNF, FGF9 を添加した培地に懸濁し、ラミニン上での培養を行うと、生体内のセルトリ細胞マーカーである、Sox9, WT1, claudin 11, vimentin の発現も見られた。さらに新生児に限らず成体由来のセルトリ細胞でも Ki67 の発現が見られたことから細胞分裂も確認された。これらの結果により、通常は増殖が停止したとされている成体のセルトリ細胞も培養条件を変更することで増殖できることが明らかになった。

このことから、本培養条件において培養セルトリ細胞は生体内のセルトリ細胞に近い性質を保持しつつ増殖を行っていることが予想される。そこで、この培養条件を利用して、培養セルトリ細胞が精子幹細胞のニッシュ機能を保持しているかどうかを検討した。c-kit チロシンキナーゼ欠損により先天性不妊になっている WBB6F1-W/W(V) マウス(W マウス)は内因性の精子形成を欠損しており、ほとんどの生殖細胞が見られない。我々はこの W マウスからセルトリ細胞を回収し、これを先に記述した条件でフィーダー細胞として準備した。このフィーダー細胞を mitomycin C 処理により、細胞増殖を停止させた上に GS 細胞を播種し、EGF, FGF2 を添加し、その細胞増殖に与える影響を観察した。

興味深いことに播種された GS 細胞は W マウス由来の精巣フィーダー細胞の下に潜り込んで特有の“敷石状コロニー”を形成した。この敷石状コロニーは血液幹細胞が骨髄細胞のフィーダーで共培養されたときにも観察されることが知られ、未分化な幹細胞に特有の現象であるとされてきた。この敷石状コロニーの数は血液幹細胞においてはその幹細胞活性と深い相関関係があるとされている。

そこで、精子幹細胞においても、この敷石状コロニーが幹細胞活性と関係があるかを調べるために、96穴プレートにて1週間から2週間後に形成されるコロニー数の測定を行ったところ、精巣から alpha6-integrin 抗体により濃縮された精子幹細胞を用いた場合には、敷石状コロニーは有意に増加することが明らかになった。一方、この抗体により精子幹細胞を減少させた場合には、敷石状コロニーの数は減少した。これらの実験に加えて、我々はマイクロマニピュレーションを用いて、もう一連の実験を行った。この実験では、フィーダー下に潜り込んでいる敷石状コロニーフィーダー上にできている生殖細胞コロニーをマイクロマニピュレーションで回収して、精巣フィーダー細胞上に再度播種を行ったところ、敷石状コロニー由来細胞の方がフィーダー上細胞よりも有意に敷石状コロニーを形成することが分かった。これらの結果

は、敷石状コロニー形成は精子幹細胞機能をアッセイする簡便かつ定量的方法であることが分かった。

この敷石状コロニー形成能は CXCR4 もしくは Ret の抑制により消失することから、CXCL12 および GDNF がその形成に関与することが予想された。実際にこれらの分子機能を生体内のセルトリ細胞で抑制すると、精子幹細胞のコロニー形成が減少したことから、幹細胞がニッシュへと移動するのに、これらの分子が必要であることが予想される。

敷石状コロニーは5ヶ月以上にわたり保持され、長期培養された細胞を W マウスの精巣に移植したところ、正常な精子形成を再開することが確認された。またこの移植によりできた精子を顕微授精法により卵子にマイクロインジェクションすると、正常な産仔を得ることができた。これらの結果は、敷石状コロニーとして保持された精子幹細胞は機能的に正常なものであることを示す。

3) cDNA 遺伝子導入および遺伝子ノックダウンによるセルトリ細胞の増殖誘導

本実験においては、生体から回収されたセルトリ細胞へ上記の無血清培地を用いて SV40 large T 抗原および small T 抗原をレンチウイルスベクターを用いて導入を行った。遺伝子導入効率は極めて高く、外来遺伝子の発現は確認された。この遺伝子導入と共に細胞の形態が変化し、形質転換が起こることが分かった。この方法を用いて我々は10ラインの細胞株を得ることができた。

一方で p27 ノックアウトマウスからは無血清培地を用いてもセルトリ細胞の増殖を誘導することができず、4-5回の継代をおこなうと、細胞がひろがり、それ以上は増殖を誘導することができなかった。これは p27 ノックダウンを行った場合も同様であった。これらの場合の細胞増殖の速度や形態の変化についても野生型細胞と殆ど違いが見られなかった。

また、ラットにおいては Id2 遺伝子を導入すると、セルトリ細胞を長期に培養できると報告されているが、我々も同様に Id2 遺伝子をマウスおよびラットセルトリ細胞に導入を行ってみたが、p27 ノックアウトマウスを用いた場合と同様に、特にセルトリ細胞の増殖誘導を確認することが出来なかった。

最終的にこれらの手法により樹立できたセルトリ細胞株を用いて GS 細胞との共培養を行ったが、いずれもその増殖を維持するものは見当たらなかった。

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 14 件)

1. Ishii K., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Cell-cycle-dependent colonization of mouse spermatogonial stem cells after transplantation into seminiferous tubules. *J. Reprod. Dev.* 60(1), 37-46 (2014).
2. Kanatsu-Shinohara M., Mori Y., Shinohara T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells based on aldehyde dehydrogenase activity. *Biol. Reprod.* 89(6), 140 (2013).
3. Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu. Rev. of Cell and Developmental Biology* 29, 163-187 (2013).
4. Takashima S., Hirose M., Ogonuki N., Ebisuya M., Inoue K., Kanatsu-Shinohara M., Tanaka T., Nishida E., Ogura A., Shinohara T. Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes Dev.* 27(18), 1949-1958 (2013).
5. Morimoto H., Iwata K., Ogonuki N., Inoue K., Ogura A., Kanatsu-Shinohara M., Morimoto T., Yabe-Nishimura C., Shinohara T. ROS are required for spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 12(6), 774-786, 2013.
6. Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Shinohara T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression. *Biol. Reprod.* 87(6), 139 (2012).
7. Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Takashima S., Takehashi M., Ogonuki N., Morimoto H., Nagasawa T., Ogura A., Shinohara T. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell* 11, 567-578 (2012).
8. Ishii K., Kanatsu-Shinohara M., Toyokuni S., Shinohara T. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAPK2K1 activation. *Development* 139(10), 1734-1743 (2012).
9. Takehashi M., Tada M., Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Kazuki Y., Oshimura M., Tada T., Shinohara T. Hybridization of testis-derived stem cells with somatic cells and embryonic stem cells in mice. *Biol. Reprod.* 86(6), 178 (2012).
10. Morimoto H., Lee J., Tanaka T., Ishii K., Toyokuni S., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection. *Biol. Reprod.* 86(5), 148, 1-11 (2012).
11. Takashima S., Kanatsu-Shinohara M., Tanaka T., Takehashi M., Morimoto H., Shinohara T. Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier. *Cell Stem Cell* 9(5),

463-475 (2011).

12. Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Ishii K., Shinohara T. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One.* 6(8), e23663 (2011).
13. Kanatsu-Shinohara M., Kato-Itoh M., Ikawa M., Takehashi M., Sanbo M., Morioka Y., Tanaka T., Morimoto H., Hirabayashi M., Shinohara T. Homologous recombination in rat germline stem cells. *Biol. Reprod.* 85(1), 208-217 (2011).
14. Shinohara T., Ishii K., Kanatsu-Shinohara M. Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *J. Reprod. Dev.* 57(2), 288-295 (2011).

〔学会発表〕(計 1 件)

Brinster symposium

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

新聞での報道

2011年11月5日 京都新聞朝刊 27面
京大グループ 精子幹細胞の増殖に働くタンパク質特定 移植治療への応用に期待

2012年10月5日 京都新聞朝刊 24面
精子幹細胞 増殖環境を再現 京大など、試験管内に 移植治療に応用期待

2012年10月5日 産経新聞朝刊 23面
精巣内定着率向上 タンパク質特定 京大グループ

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠原 隆司 (SHINOHARA, Takashi)

研究者番号 : 30322770

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :