

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 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770245
 研究課題名（和文）ほ乳類の精子形成幹細胞を支える分子基盤の解明
 研究課題名（英文）Molecular basis for maintenance of spermatogenic stem cells in the mammalian testis
 研究代表者
 中川 俊徳（NAKAGAWA TOSHINORI）
 京都大学・医学研究科・研究員
 研究者番号：50456894

研究成果の概要（和文）：

哺乳類において、精子の恒常的産生は精子形成幹細胞により保証されている。しかし、その幹細胞性を制御する遺伝子はほとんど明らかにされていない。本研究では、精子形成幹細胞を含む少数の細胞集団を分取する実験系を構築した。これを用いて、精子形成幹細胞分画に特異的に発現する遺伝子の検索を行い、高い特異性を示す遺伝子を複数見出した。次に、生理的条件下におけるそれらの遺伝子の機能を検討するために、条件付きノックアウトマウスの作製を行った。現在、作成したマウスを掛けあわせ、同定した遺伝子の機能を解析中である。本研究で見出された遺伝子を解析することにより、精子形成幹細胞を長期にわたって維持する分子基盤が明らかになると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Spermatogenic stem cells ensure continuous spermatogenesis in the mammalian testis. However, mechanisms to regulate stemness of spermatogenic stem cells remain largely unknown. In this study, I developed a method for isolation of a small population containing spermatogenic stem cells and screened for genes that are specifically expressed in the stem cells. Some genes exhibited highly specific expression in stem cell fraction. To elucidate roles of these genes under a physiological condition of spermatogenesis, floxed mice of these genes have been generated. Now I am investigating their functions using the conditional knockout mice. Elucidation of functions of these genes will lead to a detailed understanding of molecular basis for maintenance of spermatogenic stem cells in mammalian.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：幹細胞、生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

マウスの精巣では、膨大な数の精子が長期にわたって産生される。精子の供給源は、精巣にごくわずかに存在する精子形成幹細胞という未分化な細胞であり、この細胞が精子へと分化する細胞を生み出し続ける。したがって、精子形成幹細胞が生体内で維持されることが恒常的な精子の産生には必須である。遺伝子欠損マウスを用いた研究から、生体内で精子形成幹細胞の維持に必要な遺伝子がいくつか明らかにされた。現在、維持に関与する遺伝子として、GDNF リガンドとそのレセプター、転写関連因子である Plzf や Taf4b、RNA 結合タンパク質である Nanos2 が報告されている。しかし、少数の遺伝子しか報告されておらず、精子形成幹細胞を維持する分子基盤の完全な解明にはほど遠い。

精子形成幹細胞の研究が立ち遅れている理由の一つに、精子形成幹細胞の濃縮・分取が十分ではないことがあげられる。造血幹細胞や小腸の腸管幹細胞の研究分野では、それらの組織幹細胞を高度に濃縮する方法が確立されており、それを用いて幹細胞の性質や挙動が詳細に解析されている。表面タンパク質を利用した精子形成幹細胞の純化は、未分化型精原細胞 (A_{undiff}) と呼ばれる比較的高度に幹細胞が濃縮される幹/前駆体細胞集団 ($Integrin\ alpha\ 6^{high}, Kit^{negative}, SSC^{low}$) を分離したという、2000年の報告以後、大きな進歩はない。 A_{undiff} は、現在のところ実験的に示された幹細胞活性を示す最小の集団であるが、多数の前駆細胞も含まれる。近年 A_{undiff} において、表面タンパク質の発現の不均一性が報告された。しかし、それらの発現で区分された亜分画に、幹細胞活性がより濃縮されるか否かは議論のあるところである。また、 A_{undiff} での発現が報告されているものの、

その一部に発現しているか否か詳細に検討されていない表面タンパク質や、過去の研究で行われたマイクロアレイ等の実験から示された表面タンパク質の中に、一部の A_{undiff} で発現するものが存在する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では精子形成幹細胞の維持を支える分子基盤の解明を目的とした。そのために、以下の項目について実験を行った。

- (1) 精子形成幹細胞を高度に濃縮・分取する実験系の構築
- (2) (1)の方法を用いた精子形成幹細胞に特異的に発現する遺伝子の検索
- (3) 生理的条件下における、(2)で見出された遺伝子の機能の解明のための、遺伝子改変マウスの作成と解析

3. 研究の方法

(1) 精子形成幹細胞を高度に濃縮・分取する実験系の構築

研究開始時点において、申請者はフローサイトメーターや免疫染色にて A_{undiff} 全体を分取する方法を確立しており、これらの実験系を用いて、一部の A_{undiff} に発現する表面タンパク質を検索した。すでに、一部の A_{undiff} に発現すると報告されている表面タンパク質については、それらの発現の確認を行った。また、 A_{undiff} に発現が報告されているものの、その一部に発現しているか否か詳細に検討されていない表面タンパク質や、過去の雄性生殖細胞の研究で行われたマイクロアレイの結果から見出された表面タンパク質を検討した。その他、造血系などの他の組織幹細胞で発現する表面タンパク質についても検討した。見出された表面タンパク質が陽性と

陰性の A_{undiff} をセルソーターで分取し、精子形成幹細胞の維持に必須であると報告のある遺伝子発現を検討した。また、幹細胞活性を定量的に評価できる精細管内移植を用いて、分取した分画の幹細胞活性を比較検討を試みた。何らかの要因（例えば、細胞分取時に使用する抗体が、細胞機能に影響を及ぼすなどが考えられる）により細胞移植をしてもコロニーを作らなかった場合、形態的に未成熟な細胞に発現する遺伝子を次の実験に用いることにした。細胞形態と遺伝子発現を同時に観察するために、細胞の連結が確認できる精細管のホルマウント標本を用いた免疫染色をおこなった。

(2) (1)の方法を用いた精子形成幹細胞に特異的に発現する遺伝子の検索

(1)で見出された表面タンパク質が陽性と陰性の A_{undiff} をセルソーターにて分取した。幹細胞分画に特異的な発現を示す遺伝子を抗体や qRT-PCR 等を用いた方法により検索した。(1)と同様に、過去に報告された未分化な生殖細胞に発現する遺伝子のトランスクリプトーム解析の結果や、他の組織幹細胞で重要な役割を行う遺伝子を中心に発現差のあるものを調べた。特異的な発現を示す遺伝子のうち、転写制御因子や増殖因子のレセプターに特に注目し、幹細胞で機能する候補遺伝子として(3)の実験に用いた。

(3)生理的条件下における、(2)で見出された遺伝子の機能の解明のための、遺伝子改変マウスの作成と解析

候補遺伝子のノックアウトマウスの作製準備を行う。BAC リコンビネーション技術を用いて、迅速にターゲティングベクターを作製した。それを ES 細胞に導入し、相同組換え体を得た。

4. 研究成果

(1)精子形成幹細胞を高度に濃縮・分取する実験系の構築

精子形成幹細胞を濃縮できると報告のある表面タンパク質 (CD49f、c-Kit、E-cadherin 等) に対する抗体とセルソーターを用いて、 A_{undiff} の分取を行った。得られた分画で精子形成幹細胞の維持に必須の遺伝子 (GFRa1, c-Ret, Plzf, Nanos2, ID4 など) が高発現していることを確認した。しかし、この分画には前駆細胞が多数含まれており、精子形成幹細胞はごく一部である。そこで、表面タンパク質の発現をフローサイトメトリーや qRT-PCR 等を用いて詳細に検討したところ、複数のものが A_{undiff} の一部の細胞に発現することを見出した。また精細管のホルマウント標本を用いて免疫染色したところ、 A_{undiff} の一部に発現することを確認した。発現を詳細に検討したところ、 A_{undiff} の細胞集団のなかでも形態的に未成熟なものに発現する遺伝子も見出した。以上の結果から、本研究で見出された表面タンパク質に対する抗体を用いることで高度に精子形成幹細胞を濃縮できると考えられた。

(2) (1)の方法を用いた精子形成幹細胞に特異的に発現する遺伝子の検索

(1)で見出された表面タンパク質が陽性と陰性の A_{undiff} をセルソーターにて分取した。これらの分画間で、発現差のある遺伝子を免疫染色や qRT-PCR 等で検討した。特に、他の組織幹細胞で重要な役割を行う遺伝子や、過去に報告された未分化な生殖細胞の分画に発現する遺伝子のトランスクリプトーム解析の結果を参考にした。スクリーニングの結果、複数の転写因子や膜タンパク質が候補として挙げられた。これらの遺伝子の発現をホ

ールマウントの精細管を用いて免疫染色したところ、ごく限られた生殖細胞に発現することが示された。その中には A_{undiff} でも、より形態的に未成熟なものに発現する遺伝子も見出した。これらの得られた転写制御因子の中には精子形成に重要と考えられている遺伝子のファミリー分子が見られた。また、膜タンパクに関しては、精子形成における機能が不明であるも見出された。また、精子形成には必要ではないものも見出されたが、このような膜タンパク質も、今後の精子形成幹細胞の純化に寄与する可能性がある。

(3) 生理的条件下における、(2)で見出された遺伝子の機能の解明のための、遺伝子改変マウスの作成と解析

(2)で得られた精子形成幹細胞の制御に関与する遺伝子の候補について、生理的条件下での機能を検討するために、条件付きノックアウトマウスの作成を試みた。ターゲティングベクターを作成するために BAC 相同組換え法を用いた。作成したベクターを、ES 細胞に導入し、相同組換え体を得た。得られた ES 細胞からキメラマウスを作成し、それらが生殖系列キメラであることを確認した。現在、作成したマウスを掛けあわせ、同定した遺伝子の機能を解析中である。本研究で同定した遺伝子を詳細に解析することで長期にわたって安定的に精子を賛成し続けるメカニズムの一端が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

[その他]

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/se03/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 俊徳 (NAKAGAWA TOSHINORI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50456894

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし