

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780290

研究課題名(和文) 精原細胞の維持および分化におけるホメオドメイン転写因子 pKnox1 の役割

研究課題名(英文) Function of homeodomain transcription factor pKnox1 on the maintain and differentiation of spermatogonia

研究代表者

河合 康洋 (kawai, yasuihiro)

国立感染症研究所・動物管理室・研究員

研究者番号：00416281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：精子の幹細胞である精原幹細胞の維持および分化過程に関わる転写制御機構は未だ知見が乏しい状況である。本研究では造血幹細胞ならびに他の組織幹細胞の維持に關与する事が知られているホメオドメイン転写因子 pKnox1 の精子幹細胞における機能を様々なコンディショナルノックアウトマウスを用いて解析した。その結果、pKnox1 欠損精原細胞は、c-Kit 陽性細胞で分化が停止し、増殖活性が低下している事が明らかになった。また、pKnox1 欠損精巣では、c-Kit 陽性細胞の増殖に寄与する遺伝子発現の低下も認められた。以上の事より、pKnox1 は、c-Kit 陽性精原細胞の増殖に重要な機能を果たす事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The maintenance, self-renewal, and differentiation of spermatogonial stem cells (SSCs) are tightly regulated processes that are critical for normal spermatogenesis. TALE family homeodomain transcription factors, including pKnox1, are demonstrated to be essential for hematopoietic stem cell maintenance and self-renewal. pKnox1 is preferentially expressed in the male germ cell lineage, there is a possibility that pKnox1 is involved in SSC maintenance and differentiation. Our study shown that pKnox1 deleted spermatogonia was arrested at c-kit positive spermatogonia and proliferative capacity of c-kit positive spermatogonia was significantly reduced. Moreover, at 1 week after pKnox1 deletion induced by tamoxifen treatment, spermatogenesis was normal, although proliferation related genes expression pattern were dynamically changed compared with control testes. These results indicated that pKnox1 is required for proper proliferation of c-kit positive spermatogonia.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 / 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：pKnox1 精原細胞 増殖

1. 研究開始当初の背景

成体マウスの精巣における精子形成過程は、他の組織と同様に幹細胞により維持されている。精子の幹細胞である未分化型精原細胞 ($A_{undifferentiation}:A_{undiff}$) は、精細管周囲の基底膜に接して存在し、最も未分化な単一細胞である A_{single} (A_s)、それが不完全分裂して、2個の娘細胞の細胞質が連結された状態である A_{paired} (A_{pr})、さらに、 A_{pr} が分裂して、4, 8, 16, 32個の細胞が連結した状態である $A_{aligned}$ (A_{al}) に分類され、この分化段階までの細胞には幹細胞としての能力があると考えられている。 A_{al} 精原細胞は、減数分裂に入る前に6回分裂を行い、その過程で幹細胞機能を失った A_1, A_2, A_3, A_4 、そして、Intermediate, B型精原細胞へと分化していく。その後、精子形成は減数分裂を行う精母細胞を経て、半数体の精子細胞、機能的な精子への形態変化と進行していく。

近年、未分化型精原細胞の維持や分化に関わる *Plzf*、*Neurogenin3* (*Ngn3*)、*Nanos2*、*Sox3* などの転写因子が遺伝子欠損マウスを用いた解析により同定されてきており、未分化型精原細胞は機能的に不均一な集団 (long term spermatogonia: 自己複製能の高い集団) ならびに short term spermatogonia: 分化能の高い集団) として存在し、約2週間で継続的に幹細胞の代替えが行われている事が明らかにされてきている。しかしながら、未分化型精原細胞における幹細胞性維持ならびに分化の転写制御機構については、未だに十分な知見が得られていない状況である。

2. 研究の目的

造血幹細胞の分化に関与する *pKnox1* (別名: *Meis4*, *Prep1*) が、精子形成の初期段階である精原細胞より終末分化した精子に発現しており、成体マウス精巣で *pKnox1* を欠損した場合、精子形成不全となるという申請者の知見に基づき本申請研究では、精原細胞の未分化能の維持ならびに精子への分化における *pKnox1* の詳細な発現ならびにその機能について、*pKnox1* コンディショナル欠損マウスならびに *pknos1* 遺伝子座に *LacZ* 遺伝子を挿入した *pKnox1^{LacZ}* マウスを用いて解析し、精原細胞の未分化能の維持および精子への分化の転写制御ネットワークを *pKnox1* の観点から解明する。

本申請研究では、成体マウスの精子形成過程における未分化型精原細胞から精子形成に至る過程でのホメオドメイン転写因子 *pKnox1* の発現ならびにその機能について、*pKnox1* コンディショナル欠損マウスならびに *pKnox1^{LacZ}* マウスを用いて解析し、精原細胞における幹細胞性の維持ならびに分化の転写制御ネットワークを *pKnox1* の観点から解明する。以下に、具体的な3項目を挙げる。

1) 精原細胞における *pKnox1* 発現細胞の特定: 精子形成過程における *pKnox1* の機能を解明する上で、未分化型精原幹細胞から精子までの各分化段階の細胞集団 (A_s 、 A_{pr} 、 A_{al} 、 A_1-4 、*Int*、*spermatocyte*、*spermatid*) における *pKnox1* の発現を明らかにする必要がある。そこで、*GFR α 1*、*Plzf*、*c-Kit*、*SCP3*、*Hsc70t* などの既知の精細胞分化マーカー (抗体) を用いて *pKnox1^{LacZ}* の精細管を免疫組織学的に解析することで、精原細胞における *pKnox1* の発現ならびに既知の分化マーカーとの発現様式の差異について明らかにする。

2) 精原細胞の維持ならびに分化における *pKnox1* の機能の解明: 性成熟に達したマウス精巣においてタモキシフェン投与による薬剤誘導的、ならびに生殖系列細胞特異的に *pKnox1* を欠失するマウス (*Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{fllox}*、*TNAP-Cre pKnox1^{fllox}*) を作製し、維持している。*Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{fllox}* マウスにおいて精子形成異常が認められることより、本身体免疫組織学的ならびにフローサイトメトリーを用いた詳細な解析により、精原細胞の維持ならびに分化における *pKnox1* の役割を明らかにする。また、後者のマウスを用いて *pKnox1* 欠損による精子形成不全が生殖細胞内因的、あるいは微小環境による外的な影響による病体か否か明らかにする。

3) 精原細胞における *pKnox1* の標的遺伝子ならびに転写因子間相互作用の解明: *Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{fllox}* マウスにおいて *pKnox1* を欠失させ、*pKnox1* 欠損による遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法により解析し、精原細胞における *pKnox1* の標的遺伝子ならびに精原細胞の維持・分化に関与することの知られている他の転写因子 (*Plzf*、*Sox3*、*Ngn3*、*Nanos2* など) との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

1. 各分化段階の精細胞における *pKnox1* 発現細胞の同定

分化段階の異なる精原細胞 (A_s 、 A_{pr} 、 A_{al} 、 A_1-4 、*int*、*B*)、精母細胞、半数体細胞における *pKnox1* の発現ならびに既知の分化マーカーとの発現様式の差異について、申請者の研究室で維持している *pKnox1^{LacZ}* マウスを用いて解析する。すなわち、*pKnox1^{LacZ}* マウス精細管の X-Gal 染色、ならびに *GFR α 1*、*PLZF*、*c-Kit*、*SCP3*、*HSC70t* などの各分化段階の精細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫染色を行い、各精細胞分化段階における *pKnox1* の発現様式を詳細に解明する。

2. 精原細胞の維持ならびに分化における *pKnox1* の機能の解明 (I. 時期特異的ならびに精原細胞特異的 *pKnox1* 欠損マウス)

スを用いた解析)

タモキシフェン誘導性に Cre リコンビナーゼの機能発現を誘導可能な Rosa26-CreER^{T2} マウス、生殖系列特異的ならびに精原細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する TNAP-cre を pKnox1 遺伝子の第二エクソンを flox したコンディショナルアレルをもつマウス (pknox1^{flox} マウス) と交配し、時期特異的および生殖系列細胞特異的に pKnox1 を欠失するマウス (Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{flox}、TNAP-cre-pKnox1^{flox}、Ngn3-cre-pKnox1^{flox}) を作製、系統維持しており、それらマウスにおける精子形成異常について、病理組織学・免疫組織学的に解析し、精原細胞の維持ならびに分化における pKnox1 の役割を明らかにする。

3. 精原細胞の維持ならびに分化における pKnox1 の機能の解明 (II. 精原細胞の維持・分化に關与する既知分子との相互作用を解明)

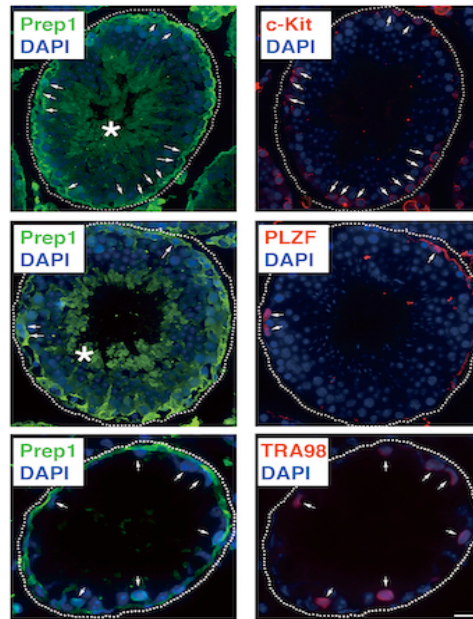
精原細胞の維持・分化に pKnox1 の機能していた場合、精原細胞の維持・分化に關与することが明らかになっている転写因子 (Plzf, Sox3, Ngn-3 など) については、精細管の特異抗体を用いたホルマウント免疫染色を行い、これら転写因子の発現制御における pKnox1 の役割を解析し、精原細胞における転写制御ネットワークを明らかにする。また、精原細胞以降の分化過程(減数分裂、精子変態)に pKnox1 の機能していた場合、染色体標本の作製、およびそれらの分化過程に關与する既知の遺伝子発現を解析し、それら遺伝子の発現制御における pKnox1 の役割を解析する。

4. 研究成果

1. 各分化段階の精細胞における pKnox1 発現細胞の同定

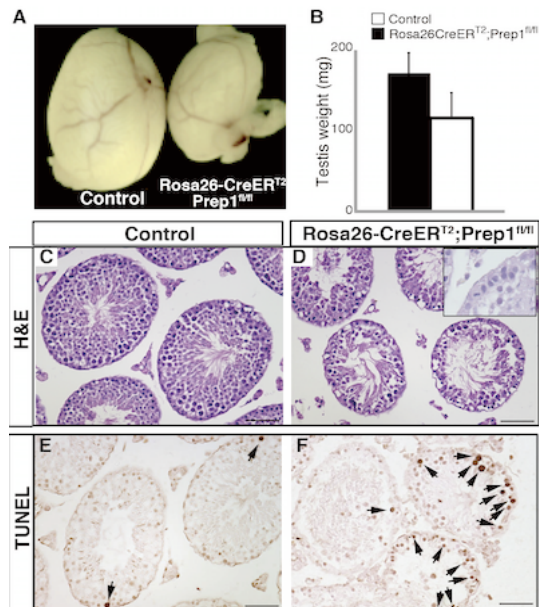
各精細胞分化段階における pKnox1 の発現様式の詳細な解析を行うため、分化段階の異なる精原細胞 (A_s、A_{pr}、A_{al}、A1-4、int、B)、精母細胞、半数体細胞における既知の分化マーカーを用いた免疫組織学的解析を行った。

その結果、基底膜上に存在するほとんどの精細胞において pKnox1 が局在しており、初期精原細胞のマーカーである PLZF (A_s、A_{pr}、A_{al4}~)、および、その後の精原細胞のマーカーである c-Kit (A_{al4}~、A1-4、B) と共局在する事が明らかとなった。また、精原細胞のみが存在することが知られている W/W^v マウス精巣において、別の精原細胞マーカーである TRA98 と pKnox1 が共局在していた。さらに、精細管内腔に存在する半数体細胞においても pKnox1 は局在していた。



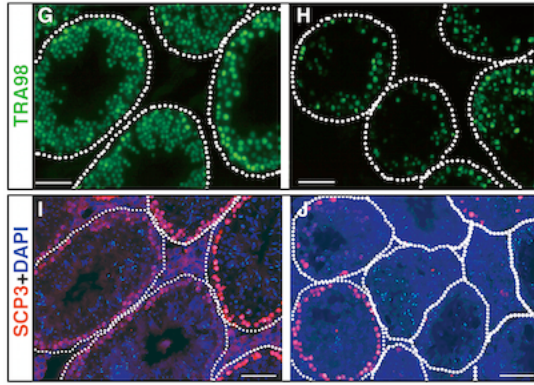
2. 精原細胞の維持ならびに分化における pKnox1 の機能の解明 (I. 時期特異的ならびに精原細胞特異的 pKnox1 欠損マウスを用いた解析)

精原細胞の維持ならびに分化における pKnox1 の役割を明らかにするため、時期特異的ならびに精原細胞特異的な pKnox1 欠損マウス (Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{flox}、TNAP-cre-pKnox1^{flox}、Ngn3-cre-pKnox1^{flox}) を用いて、これらマウスにおける精子形成異常について、病理組織学・免疫組織学的に解析を行った。



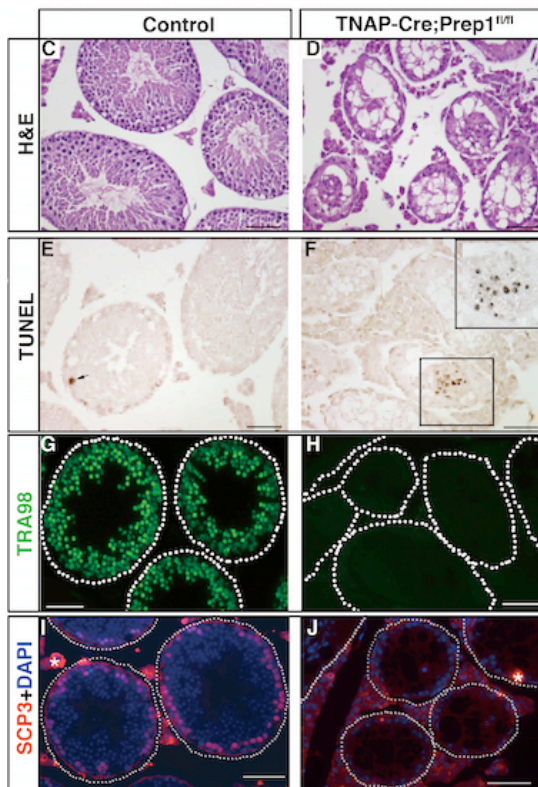
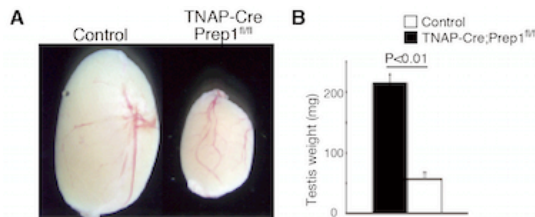
まず、成体精巣における pKnox1 の役割を解析する為、性成熟に達した成体雄マウスにタモキシフェン誘導性に全身において pKnox1 を欠損した。その結果、タモキシフェン投与 3 種間後、精巣は著しく収縮し、空胞化した精細管が散在していた(上図 A-D)。また、TUNEL 染色の結果、精細管内には対象区のマウスに比べ有意に多くのアポトーシス

した精細胞が存在していた(上図 E, F)。さら



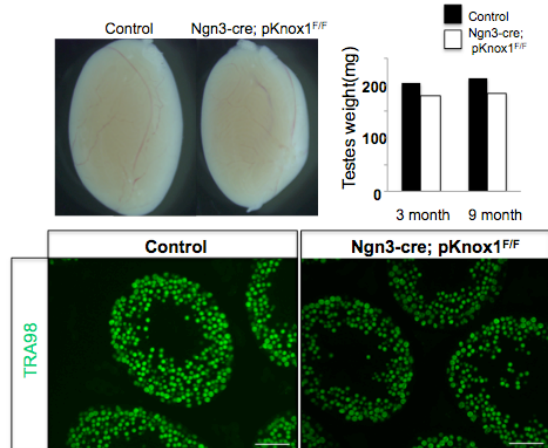
に、生殖細胞のマーカである TRA98 および精母細胞のマーカである SCP3 の抗体を用いた免疫組織学的解析の結果、pKnox1 欠損精巣において精母細胞に分化した精細胞が著しく減少していた(上図 G-J)。つまり pKnox1 が精母細胞に至るまでの分化あるいは増殖に寄与している可能性が示唆された。

Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{fllox} マウスは全身性に pKnox1 を欠損しうることから、この表現型が生殖細胞内因的か否かを検討とするため、始原生殖細胞から pKnox1 を欠損しうる TNAP-cre-pKnox1^{fllox} マウスの解析を行った。成体雄マウスにおいて pKnox1 を欠損した場合より重篤な表現型が観察された(下図 A-J)。これらの結果から、この表現型は生



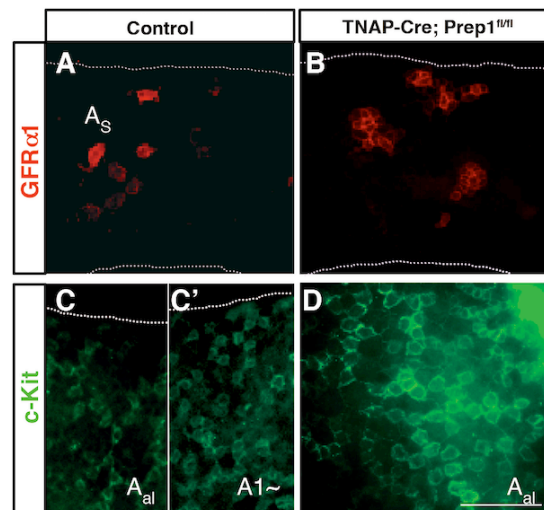
殖細胞内因的であり、pKnox1 は精子形成過程における精母細胞までの分化過程に寄与していることが確認された。

TNAP-cre-pKnox1^{fllox} マウスの解析結果より、生殖細胞内因的に pKnox1 が精原細胞の分化あるいは増殖に寄与している事があきらかとなったので、次に初期精原細胞特異的に pKnox1 を欠損しうる Ngn3-cre-pKnox1^{fllox} マウスの解析を行った。その結果、pKnox1 欠損



マウス精巣において、これまで認められた精子形成の異常は認められなかった(上図)。Ngn3 遺伝子は初期精原細胞のマーカとして用いられているが、近年、生殖幹細胞はヘテロジェネイティな細胞集団であると報告がある事から、Ngn3 発現細胞以外の精原幹細胞によって正常な精子形成が保持されたと考えられた。

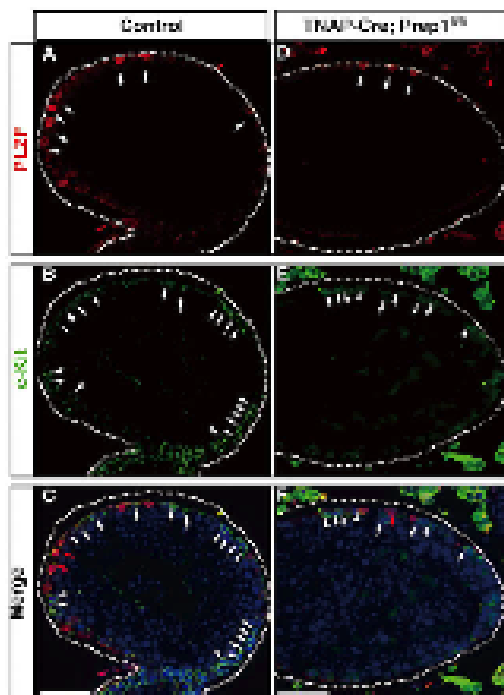
これらマウスを用いた実験から pKnox1 が精原細胞の分化あるいは増殖に寄与する事が明らかとされた為、初期精原細胞のマーカである GFRA1 および c-Kit を用いてより詳細に解析した。その結果、pKnox1 欠損精巣に



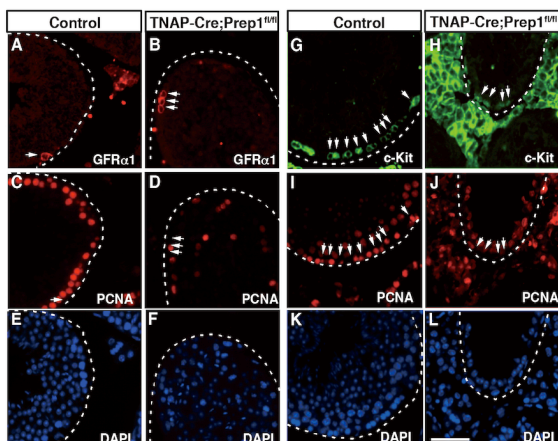
において c-Kit 陽性の精原細胞で分化あるいは増殖不全となっている事が明らかとされた(上図下段)。また、c-KitGFRA1 陽性細胞での分化/増殖不全により、未知のフィードバック機構が働き GFRA1 陽性細胞の凝集が形成されたと考えられた(上図上段)。

pKnox1 欠損精巣において c-Kit 陽性細胞で

の分化停止が認められたが、c-Kit 陽性細胞に分化する機構に異常があるか否かを確認するため、精原細胞の自己複製に必須であり、精原細胞における c-Kit 発現を抑制している事が知られている PLZF の抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。その結果、対象区精巣と同様に pKnox1 欠損精巣においても c-Kit 陽性細胞と PLZF 陽性細胞が共局在する事なく、それぞれの陽性細胞が単独で存在する事が確認された(下図)。

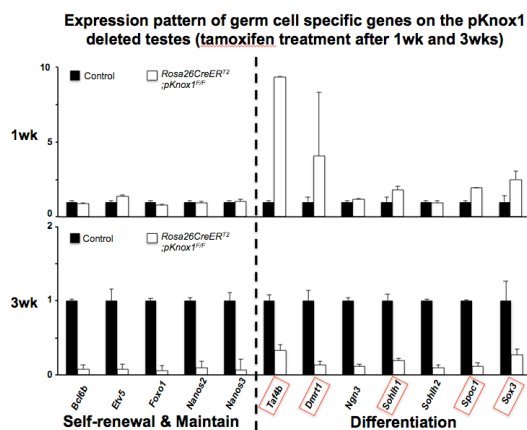


pKnox1 欠損精巣では c-Kit 陽性精原細胞までの分化に異常がないことが明らかとなったので、c-Kit 陽性精原細胞における増殖能を PCNA 抗体を用いて調べた。その結果、対象区 c-Kit 陽性細胞では PCNA 陽性であるのに対し、pKnox1 欠損精巣においては PCNA と共局在する細胞が認められなかった(上図 G-L)。また、GFRα1 陽性細胞においてはどちらの精巣においても PCNA 陽性細胞は認められなかった(上図 A-F)。つまり pKnox1 は c-Kit 陽性精原細胞の増殖に寄与している事が明らかとなった。



3. 精原細胞の維持ならびに分化における pKnox1 の機能の解明 (II. 精原細胞の維持・分化に関する既知分子との相互作用を解明)

実験 2 の結果より、pKnox1 が c-Kit 陽性精原細胞の分化あるいは増殖に寄与する事が示された為、精原細胞の分化あるいは増殖に関する既知分子との相互作用を定量的 PCR によって解析した。解析には、Rosa26-CreER^{T2}-pKnox1^{fllox} マウス精巣を用いて行った。表現型の出現するタモキシフェン投与 3 週間後、および表現型が認められない 1 週間後の精巣 RNA から cDNA を合成し、対象区精巣と発現量の比較を行った。



その結果、表現型が認められないタモキシフェン投与 1 週間後の pKnox1 欠損精巣において、分化に関する遺伝子(TAF4b, Dmrt1, Sohlh1, Spoc1, Sox3)に有意な発現増加が認められた。一方、精原幹細胞の自己複製や維持に関する因子の発現に変化は認められなかった。これらの結果より、pKnox1 は c-Kit 陽性細胞へ分化した後の分化/増殖に重要な転写因子である事が明らかとされた。

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 1 件)

Ryo Nakahara, Yasuhiro Kawai, Akihisa Oda, Akikazu Murakami, Takachika Azuma, Yoichiro Iwakura, and Ryo Goitsuka Tlx1-CreER-Venus Mice: A New Tool for the Study of Spleen Development, (2014), *Genesis*, submitted

[学会発表] (計 1 件)

Yasuhiro Kawai, Ryo Goitsuka ホメオドメイン転写因子 pKnox1 は c-kit 陽性精原細胞の増殖および生存性を正に制御する. 2012 年 12 月 11~14 日. 日本分子生物学会 マリンメッセ福岡

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 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 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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：