

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25711014

研究課題名(和文)精子幹細胞の階層性を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular basis controlling the hierarchy of mouse spermatogenic stem cell populations

研究代表者

中川 俊徳(Nakagawa, Toshinori)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教

研究者番号：50456894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞集団は、機能的に異なる二つの集団より構成されており、これらの集団は階層を形成している。この階層性を制御する分子基盤を解明するために、二つの集団を含む細胞分画で特異性を示す遺伝子を明らかにした。スクリーニングを行い、候補となる遺伝子を選定し、機能解析を行った。その結果、解析した遺伝子の一つは、培養精子幹細胞では未分化性を促進したが、条件的遺伝子破壊マウスを用いた解析では、少なくとも著明な表現系は見られなかった。候補遺伝子の機能を明らかにするために、さらなる詳細な解析が必要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：The mouse spermatogonial stem cell population is composed of two functionally distinct subpopulations and these subpopulations form hierarchal relationship. To reveal molecular basis controlling this hierarchy, we identified several genes specifically expressed in these populations from transcriptome analysis. Through the functional screening, we selected candidate genes and found one of the genes regulating transcriptional network to maintain undifferentiated state in cultured spermatogonial stem cells. We did not find the obvious phenotype in conditional knockout mice, and thus further analysis is needed to unveil the role.

研究分野：発生生物学

キーワード：幹細胞 精子 精巣

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類において、精子は生涯を通じて恒常的に産生され続ける。これは、精子幹細胞という精巣にごくわずかに存在する未分化な細胞集団が、自らを安定的に維持し、かつ分化細胞を作り続けることにより実現される。申請者は、漠然と「精子幹細胞」と呼ばれていた細胞集団が、機能的に異なる二つの集団より構成されていることを示した。すなわち、障害のない正常の精巣において実際に自己複製を行う **Actual Stem Cell (ASC)** と、正常の精巣では自己複製せず分化するが、幹細胞能は保持している **Potential Stem Cell (PSC)** である。通常の精子形成では ASC から PSC が生み出され、最終的に精子へと分化する。しかし、障害後の再生時の精巣では PSC は自己複製を行い ASC へと戻ることができる。このような「先祖返り」は、安定的な精子形成を可能にする機構の一つと考えられる。

精子の恒常的産生に最も重要な役割をする ASC の性質や挙動を制御する細胞内外の機構は全く分かっていない。一般的に、組織幹細胞の制御にはそれを取り巻く細胞外環境が重要な役割をすることが知られている。この環境は、組織幹細胞の周囲に存在する細胞がつくりだす多様な分子により構築される。とりわけ細胞外シグナル分子による、組織幹細胞上の受容体を介したシグナル伝達およびその下流の転写因子ネットワークは、組織幹細胞の状態や挙動の制御に重要であると考えられている。

2. 研究の目的

精子幹細胞の階層性を制御する分子機構を解明するために、ASC を ASC の階層に留める未分化性の維持や、ASC から PSC への階層の移行を制御する遺伝子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ASC と PSC の分取するために、GFRa1 受容体の発現レベルを指標に生殖細胞の分取をセルソーターを用いて行った。分取した分画を用いた網羅的遺伝子発現の解析・比較を行った。(1)その結果をもとに、候補となる遺伝子を選定した。(2)候補遺伝子は多数になると予想されたので、培養精子幹細胞を用いて何らかの遺伝子発現を制御する遺伝子をスクリーニングした。(3)培養精子幹細胞を用いて、候補遺伝子の機能を解析した。(4)遺伝子改変マウスを作成し、生理的条件下での機能を解析した。

4. 研究成果

精子幹細胞の階層性を制御する分子機構を解明するために、ASC と PSC を含む細胞分画をセルソーターにて分取し、特異的に発現する遺伝子をマイクロアレイにてスクリーニングし、さらに機能的スクリーニングを行うことにより候補遺伝子を絞った。その結果、既報の多数の遺伝子に加え、報告されてこなかった複数の興味深い遺伝子が見出された。例えば発生段階における中胚葉誘導に重要な役割を果たす *T* 遺伝子、細胞外基質の一種である *Nidgen1*、ジンクフィンガー-DNA 結合配列を有する転写因子 *Krox20*、抑制性 Smad である *Smad6*、HMG ボックスを有しクロマチンの構造を変化させると考えられる *Tox3*、*Barx1*、亜鉛のトランスポーターと複合体を形成する *Tmc6* などが見出された。しかし、以上の遺伝子は少なくとも培養精子幹細胞に強制発現させても幹細胞の維持や分化に関わる遺伝子発現に著明な変化は引き起こさなかった。

そこでさらに機能的スクリーニングを行い、候補となる転写因子を見出した。また、膜タ

ンパク質は細胞外の環境を感知する可能性
があることから、精力的に発現パターンを含
め検討し、以下の(1)転写因子と(2)膜タン
パク質の1種類ずつに絞り、詳しく機能解析を
行った。

(1) 転写因子

本研究で注目した候補転写因子は、間葉系の
細胞に発現し、乳腺幹細胞での発現が特異的
に高い。この遺伝子は上皮間葉転換 (EMT)
に関与することがすでに報告されており、
EMT の際に幾つかの遺伝子を抑制すること
が知られている。このようなことから、精子幹
細胞においても同様に遺伝子 (特に分化に関
わる) の発現を抑制するのではないかと期待
された。

培養精子幹細胞を用いてその機能を検討
した結果、強制発現することにより未分化性
の維持に関わる遺伝子 (GFRa1 など) の発現を
促進することがわかった。その他、現在報告
はされていないが、今回のマイクロアレイに
て ASC に特異的な発現を示す遺伝子 (Barx1
など) の発現を促進することから、候補転写
因子は ASC への何らかの機能を持つと予想さ
れた。その一方で、レチノイン酸による分化
刺激に対する耐性を付与することがわかつた。
すなわち、分化型精原細胞に発現する
c-Kit や減数分裂の開始に重要な役割を持つ
Stra8 といった機能的に重要な因子の誘導を
抑制することがわかった。実際にレチノイン
酸を培地中に添加すると、候補遺伝子を強制
発現させた細胞では、上記の分化に関わる遺
伝子の発現が抑制された。一方で未分化性
に関与する GFRa1 遺伝子の発現は低下しな
かった。

次に培養精子幹細胞で候補転写因子を欠
損させ機能を検討するために、siRNA を培養
精子幹細胞に導入した。セルソーターにて
siRNA が導入された細胞のみを回収し、実際
に標的遺伝子の発現が低下しているか検討

したが、転写産物の減少は確認できなかった。
そこで、若齢の候補遺伝子の flox マウスよ
り培養精子幹細胞株を樹立し詳しい発現を
検討した。Cre レコンビナーゼを導入した細
胞をセルソーターにて回収後、遺伝子発現を
qRT-PCR にて検討した。その結果、未分化維
持 (GFRa1 など) に関与する因子の発現が低
下することがわかった。また予想されたよう
に、ASC に特異的に発現するいくつかの遺伝
子の発現が抑制された。このようなことから、
候補転写因子は、精子形成において重要な役
割をすることが示唆された。

さらに候補遺伝子が幹細胞の挙動に及ぼ
す影響を検討するために、候補転写因子をレ
ンチウイルスで培養精子幹細胞に導入後、生
殖細胞を欠損したマウスの精細管に移植を
行った。移植された細胞は基底膜へと移動し、
幹細胞能を持つ細胞は自己複製と分化細胞
を産生し、精子形成コロニーを形成する。も
し候補遺伝子が未分化性の維持に重要な役
割を果たすならば、候補遺伝子が強制的に発
現することにより、分化と自己複製のバラ
ンスに異常をきたし、正常な精子形成コロ
ニーの形成ができない、特に自己複製にバラ
ンスが偏り、分化細胞の形成を抑制すると
予想される。しかし、予想に反して、正常な
精子形成コロニーを形成し、少なくとも分
化細胞が認められた。このように少なく
とも候補転写因子を強制発現させること
では、著明な挙動の変化は見られな
かった。

次に、生理的条件下での機能を検討する
ために、flox アリルと生殖細胞特異的 Cre
レコンビナーゼを発現するアリルを持つマ
ウス (VasaCreERT2) を用いた。この Cre
レコンビナーゼはタモキシフェン作動性
であり、成体になってからタモキシフェ
ンを投与することにより、ホメオスタ
シスにおける候補転写因子の機能解
析が可能である。その結果、若年
マウス (2 ヶ月から 3 ヶ月時にタモ
キシフェンを投与し、その 2 ヶ月
後に解析) では、

精巣重量や、GFRa1 陽性の幹細胞集団の数には著明な変化は見られなかった。老齢マウスではPSCからASCへの転換が頻度高く起きていると推測されているが、著明な変化は見られなかった。このように、生理的条件下で候補転写因子は幹細胞システムの維持には、少なくとも大きな関与はしていないと考えられた。

ただし、(1)今回用いたマウスの系統は、複数混じり合ったもので純系にすることで何らかの表現系が見られる可能性はある。(2)また幹細胞システムは非常に細胞レベルでフレキシブルな振る舞いをする事が知られており、遺伝子を破壊したことで何らかの影響が出ているにもかかわらず、表面上は著明な変化を示さない可能性などが考えられる。(3)候補転写因子には高度に保存された相同遺伝子が知られており、その遺伝子が上方調節されている可能性がある。今後も引き続き、今回発見した遺伝子のさらなる解析を計画している。

(2) 膜タンパク質

候補膜タンパク質も間葉系の細胞に発現することが知られている。この遺伝子の細胞質ドメインは、非常に短いことから、直接何らかのシグナルを送る可能性は少ないと考えられる。むしろ共受容体としてはたらくことが予想される。事実、この候補膜タンパク質を強く発現する細胞では、GDNFシグナルが強く入力されていることが示唆され、またVEGFのシグナルも入力されている可能性がある。

候補膜タンパク質の解析も基本的には(1)の候補転写因子と同様に行った。まず、候補膜タンパク質の遺伝子を培養細胞に導入したが、検討した精子形成に必須の遺伝子やASCに特異的に発現する遺伝子に影響は見られなかった。またレンチウイルスで培養精子幹細胞に遺伝子を導入後、精細管移植を行ったが、コロニーは正常に形成された。しかし、

移植後の精細管を免疫染色したところ、導入した遺伝子の発現が減弱しており、ほとんど検出できなくなっていたことから、この方法では機能を推定することはできないと考えた。

次に候補膜タンパク質の遺伝子を破壊するために、遺伝子改変マウスの作成を試みた。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成した。それをES細胞に導入し、相同組み替え体を得た。得られたES細胞からキメラマウスを作成した。しかし、生殖細胞系列にES細胞由来の細胞がほとんど寄与せず、floxマウスを得るまで、かなりの日数を要した。得られたfloxマウスとVasaCreERT2マウスを掛け合わせた。2ヶ月齢のマウスにタモキシフェンを投与し、遺伝子の欠損効率を確認後、短期及び長期的間検討したが、著明な変化(精巣重量やGFRa1陽性細胞の数など)は見られなかった。この遺伝子を破壊したマウスの表現系は致死となることが報告されているが、遺伝的背景により異なることが報告されているので、今後遺伝的背景を純化にすることにより、表現系が見られるかもしれない。この遺伝子についても(1)の候補転写因子と同様に引き続きさらなる解析を計画している。

この候補膜タンパク質の発現パターンは興味深く幹細胞の一部に発現すると示唆された。この候補膜タンパク質を発現する細胞の動態を検討するために、免疫染色、精細管移植実験、細胞周期解析を行った。さらに時間経過に伴う細胞の挙動を詳細に検討するために、細胞系譜追跡を行った。その結果、このタンパク質はASCに特異性の高い発現を示すことがわかった。さらにPSCとの比較により、ASCの特殊性を明らかにすることができた。すなわち、細胞の形態的特徴や細胞分裂パターン、周期的な挙動とそれにつづく確率的な挙動といった、今まで全くわかっていなかったASCの細胞レベルの挙動について、

今回の研究の結果をもとに、一部解明することができた。

今回の実験では分子レベルでの階層性の制御の解明は不十分であったが、今回 ASC と PSC の差次的遺伝子発現解析で見出された候補遺伝子のリストをもとに解析することで、さらなる理解が深まると考えられる。また、ASC の特殊性を制御する遺伝子も今回の網羅的発現解析の結果に含まれると予想されることから、さらなる発展によりホメオスタシスを担う ASC の理解を促進されることが期待される。

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)

*:責任著者

[雑誌論文](計1件)

1. K. Hara, T. Nakagawa, H. Enomoto, M. Suzuki, M. Yamamoto, *B. D. Simons and *S. Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* 14:658-672, 2014 (査読あり)
doi: 10.1016/j.stem.2014.01.019.

[学会発表](計0件)

[図書](計0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
<http://www.nibb.ac.jp/germcell/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 俊徳 (NAKAGAWA TOSHINORI)
基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教
研究者番号：50456894

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし