

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850224

研究課題名(和文) 精細管内移植後におけるマウス精子形成幹細胞のホーミング機構の解明

研究課題名(英文) Homing mechanisms of mouse spermatogenic stem cells following transplantation.

研究代表者

中村 隼明 (Nakamura, Yoshiaki)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・特別協力研究員

研究者番号：30613723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞は、不妊宿主の精巣内に移植するとホーミングして精上皮を再構築できる。研究代表者は、宿主マウスを麻酔下で維持し、蛍光標識した精子幹細胞を顕微鏡下で約3日間連続観察した。その結果、精子幹細胞が仮足を伸ばして宿主マウス精細管の内腔から基底膜上へ遊走することを発見し、ホーミングには精子幹細胞の能動的な運動が関与していることが示された。続いて、宿主マウスの精細管周期を人為的に同調後、継時的に精子幹細胞を移植することにより、精細管周期とホーミングが関連するか検討した。その結果、移植2ヶ月後のコロニーの数と長さは周期による差がみられず、精細管周期とホーミングが関連しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Spermatogenic stem cells (SSCs) can undergo homing then reconstitute seminiferous epithelium following transplantation into infertile recipient recipients. To dissect homing mechanism of SSCs, the behavior process of mouse SSCs following transplantation was observed by in vivo live-imaging. The live-imaging study has revealed that SSCs actively migrate from lumen to the basal membrane of recipient seminiferous tubules with extend lobopodia, suggesting that homing of SSCs associates with active cell movement of SSCs. To examine whether the seminiferous epithelial cycle of recipient mice has relevance to SSC homing, SSCs transplantation was carried out at the several time intervals after artificial synchronization of recipient seminiferous epithelial cycle. No significant difference of post-transplantation colony number and length was observed among cyclical stages of recipient mice, suggesting that the seminiferous epithelial cycle is relevant to SSC homing.

研究分野：発生工学

キーワード：精子幹細胞 ホーミング マウス

1. 研究開始当初の背景

精巣内の精細管内に存在する精子形成幹細胞は自己複製と分化のバランスを保つことにより、大量の精子の生産を支える。マウスにおいて精子形成幹細胞の移植法(精細管内移植法)が確立された(引用文献 および) ことにより、家畜における雄性遺伝資源の保存や遺伝子改変のみならず、ヒトにおける男性不妊治療への応用が期待されている。しかし現状では、精子形成幹細胞の移植効率は数百~数万個に1個と非常に低く(引用文献)、これが実用化を阻んでいる。このため、精子形成幹細胞の移植効率が低い原因となっているステップを明らかにし、移植効率の向上を図ることは急務であった。

マウス精細管は、セルトリ細胞同士のタイトジャンクション(TJ)から構成される血液精巣関門(BTB)によって、基底側と内腔側に仕切られている。精細管内移植では、内腔側に注入された精子形成幹細胞が、通常の精子形成とは逆方向に、BTBを通過して基底膜に向かって移動する。このプロセスはホーミングと呼ばれる。BTBが形成されていない幼若マウスへの移植では、成熟マウスを用いた場合と比較して精子形成幹細胞の移植効率が9.4倍向上する(引用文献)。このことから、BTBの通過を伴うホーミングが、精子形成幹細胞の移植効率の主な障害になると考えられていた。しかし、移植した精子形成幹細胞のホーミング機構、すなわち、精子形成幹細胞がどのようにしてBTBのバリア機能を損なうことなくTJを通過するかについてはほとんど明らかにされておらず、移植効率の改善を図るための方法の見当がつかなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスをモデル動物に用いて、精子形成幹細胞のホーミングのメカニズムを細胞レベルで明らかにし、さらにそれを制御して移植効率の向上に挑戦することである。本研究では、(1)ライブイメージングによるホーミングの連続観察、および(2)精細管周期とホーミングの関連性の検討により、目標達成を目指した。

(1) *in vitro*においてTJを可視化した培養細胞の連続観察から、TJは切断と結合を繰り返しており、極めてダイナミックに振舞うことが知られている(引用文献)。また、マウス精巣のBTBにおいてもTJの新生と消失が起こることが示唆された(引用文献)。そこで、移植した精子形成幹細胞のホーミングと、BTBのダイナミックな再編成が関連するという仮説を立てた。もし、仮説通りであれば、BTBは全体のバリアを破綻させることなく、精子形成幹細胞の移動が成立する。本研究では、ドナー精子形成幹細胞とBTBを可視化し、ライブイメージング法により上記の仮説について検討を

試みた。

(2) マウスの精子形成は、8.6日を周期に分化制御されており、同調した分化段階の精子形成細胞が精細管の長軸方向に規則正しく並び(精細管周期: I~XIIのステージから構成)。通常の精子形成では、精母細胞のBTB通過を伴う移動は周期依存的に起こる(ステージVIII~IX)。興味深いことに、精細管内移植の宿主に用いる精子形成不全マウスにおいても、セルトリ細胞において精細管周期の進行が認められる(引用文献)。それでは、精細管周期は移植した精子形成幹細胞のホーミングと関連しているのだろうか? 精細管周期は、ビタミンA欠乏マウスにビタミンAを投与することによって同調することができる(引用文献)。本研究では、この実験系を用いて人為的に精細管周期を調節することにより、精細管周期とホーミングと、精子形成幹細胞の最終的な移植効率に関連するか検討した。

3. 研究の方法

(1) マウスにおいて精子への分化能を維持した精子形成幹細胞の*in vitro*培養法が開発された(引用文献)。セルトリ細胞特異的にZO-1とEGFPの融合タンパク質を発現する二重トランスジェニックマウス(*Tg(AmhCre); Rosa26^{ZO-1-EGFP(loxP/loxP)}*)にブスルファンを投与して予め内在性の生殖細胞を除去し、宿主マウスとして用いた。赤色の蛍光色素(PKH26)で標識したドナー*in vitro*精子形成幹細胞を宿主マウス精細管内に移植した。宿主マウスを麻酔下で維持し、ドナー*in vitro*精子形成幹細胞の挙動をマウス精巣内ライブイメージング法(引用文献)により移植直後から約3日間連続観察した。

(2) ビタミンA欠乏マウスへのビタミンA投与により、精細管周期のステージはVIIに同調し、その後精巣全体で同調したまま再び8.6日間隔で周期が繰り返す(引用文献)。予め内在性の生殖細胞を除去したビタミンA欠乏マウスにビタミンAを投与した。ビタミンA投与から0日(直後: ステージVII)、2日(ステージX)、4日(ステージI)、6日(ステージIV~V)、8日(ステージVII)後に、全身でGFPを発現する遺伝子改変マウス(*Tg(UBI-EGFP)*)より得た精巣細胞を 1×10^6 個ずつ宿主マウスの精細管内に移植した。移植2ヶ月後に精巣を採材し、GFP陽性コロニーの数および長さを計測することにより、精子形成幹細胞の移植効率を測定した。

4. 研究成果

(1) ライブイメージング法による連続観察の結果、ドナー*in vitro*精子形成幹細胞は仮説を伸ばして宿主精細管の内腔から基底膜上へ移動することを発見し、ホーミングには精

子形成幹細胞自体の能動的な運動が関与していることが新たに示された(図1)。マウス精巣内ライブイメージング法(引用文献)は、当研究室で開発された技術であり、他の追従を許さない。しかし、この方法では、本研究に用いた二重遺伝子改変マウス(*Tg(AmhCre); Rosa26^{ZO-1-EGFP(loxP/loxP)}*)のGFPの蛍光は検出することができず、BTBの動態は未だ謎に包まれている。上記のマウスの精細管を免疫染色法により解析した結果、GFPを発現するBTBが確認された。そこで現在、GFPのシグナルを増強する目的で*Rosa26^{ZO-1-EGFP(loxP/loxP)}*をホモに持つマウスを交配により準備している。このマウスを用いて生きた状態でBTBの可視化を試みる。これにより、ドナー精子形成幹細胞がどのようにBTBを通過するか明らかにしていく予定である。また、正常な精子形成において精母細胞がBTBをどのように通過するか直接観察し、両者のBTBを通過するメカニズムを比較検討する予定である。

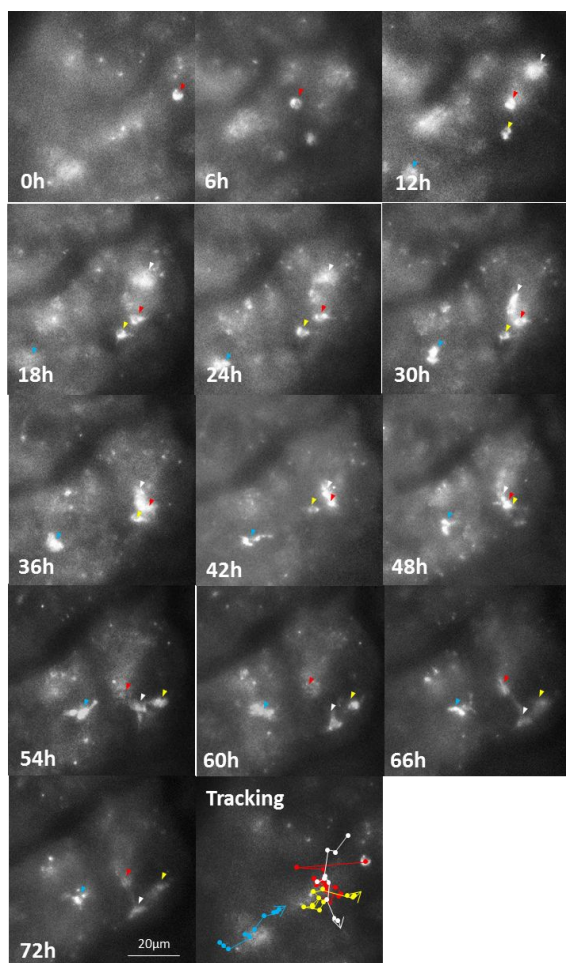


図1. 宿主精細管内腔に注入した *in vitro* 精子形成幹細胞のライブイメージング。 *in vitro* 精子形成幹細胞は内腔から基底膜上へと仮足を伸長して移動する様子が観察された。4個の *in vitro* 精子形成幹細胞の軌跡をそれぞれ白、黄、赤、水色で示した。

(2) ビタミン欠乏マウスにビタミンAを投与

して人為的に精細管周期を同調した後、継時的に精子形成幹細胞を移植することにより、精細管周期と精子形成幹細胞のホーミングの関連性について検討した。その結果、移植2ヶ月後のGFP陽性コロニーの数と長さに有意な差はみられなかった。また、精細管周期を同調させた宿主マウスと同調させていない宿主マウス(コントロール区)を比較した場合においても、コロニーの数と長さに有意差はなかった。これらの結果から、精細管周期とホーミングが関連しないことが示唆され、精細管周期を調節する方法では精子形成幹細胞の移植効率を改善することが困難であると考えられる。

予備試験において、精子形成幹細胞の最終的な移植効率に占めるホーミングの重要性を検討した結果、驚くべきことにホーミング効率が約1/11であるのに対してコロニー形成効率は約1/52であることを見出しつつある。このことから、従来考えられてきた定説とは異なり、実はコロニー形成のステップが精子形成幹細胞の最終的な移植効率により大きな影響を与えることが明らかになってきた。このことから、双方のステップをそれぞれ効率化することが重要であり、さらにこれらの技術を組み合わせることにより、現在非常に低い精子形成幹細胞の最終的な移植効率を実用可能なレベルまで向上させることができると期待される。

<引用文献>

Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 91: 11298-11302. (1994)

Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 91: 11303-11307. (1994)

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction*, 69: 612-616. (2003)

Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 98: 6186-6191. (2001)

Sasaki H, Matsui C, Furuse K,

Mimori-Kiyosue Y, Furuse M, Tsukita S. Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 100: 3971-3976. (2003)

Smith BE, Braun RE. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science*, 338: 798-802. (2013)

Sugimoto R, Nabeshima Y, Yoshida S. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mechanisms of Development*, 128: 610-624. (2012)

van Pelt AMM, de Rooij DG. Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A deficient mice. *Biology of Reproduction*, 43: 363-367. (1990)

Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, 317: 1722-1726. (2007)

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

中村隼明．精子幹細胞による遺伝資源の保存を目指して -単一細胞レベルの解析から移植の効率化を図る-，日本畜産学会第119回大会，宇都宮大学，宇都宮，栃木県，2015年3月28日

Yoshiaki Nakamura, Shosei Yoshida. Single-cell level dynamics of mouse spermatogonial stem cells after transplantation. World Congress of Reproductive Biology 2014, Edinburgh, United Kingdom, 3, September 2014.

中村隼明，吉田松生．精子幹細胞の精細管内移植で何が起こるのか？ -マウス精子幹細胞の単一細胞レベルでの運命解析-，第107回日本繁殖生物学会大会，帯広畜産大学，帯広，北海道，2014年8月22日．

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 隼明 (Nakamura, Yoshiaki)
基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・特別協力研究員
研究者番号：30613723

(2)研究協力者

吉田 松生 (Yoshida, Shosei)
基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授
研究者番号：60294138