

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450453

研究課題名(和文) マウス精子幹細胞・分化細胞の運動パターンと制御因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of patterns and regulatory mechanism of undifferentiated spermatogonial motion in mouse testis

研究代表者

原 健士朗 (Hara, Kenshiro)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60551546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精子幹細胞と分化細胞の運動パターンとその制御機構の解明を目的とした。第一の成果は、精子幹細胞は分化直後の細胞と比して活発かつ無秩序に動くことを解明したことである。第二の成果は、ひとつひとつの幹細胞・分化細胞の多様な動きが生み出される仕組みについて、細胞同士の間がかり(精子形成において観察される特殊な現象)と細胞の内在的運動能が関係している可能性を見出したことである。今後の課題は、幹細胞・分化細胞の運動を制御する分子の制御機構とその生物学的意義の解明である。研究期間内、幹細胞の動きについて、幹細胞生物学の専門誌であるセルステムセル誌に報告した(Hara et al., 2014)。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand motion patterns and regulatory mechanisms of stem and differentiating cells in mouse spermatogenesis. In this study, we found that stem cells move actively and randomly, while differentiating cells are less motile. We also found that heterogeneous motion is likely to be generated by two mechanisms: syncytial formation (unique biological event in spermatogenesis) and cell state-dependent motion property. Future analysis for molecular mechanisms of stem/differentiating cell motion and biological significance of stem cell motion will be needed. During this support, we published a paper in Cell Stem Cell (Hara et al., 2014).

研究分野：繁殖生物学

キーワード：精巢 精子幹細胞 精原細胞 細胞運動

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の繁殖期間を通じて恒常的に大量生産される精子は、精巣の中の精細管基底膜上に存在する精子幹細胞の自己複製・分化能に支えられている (図1)。

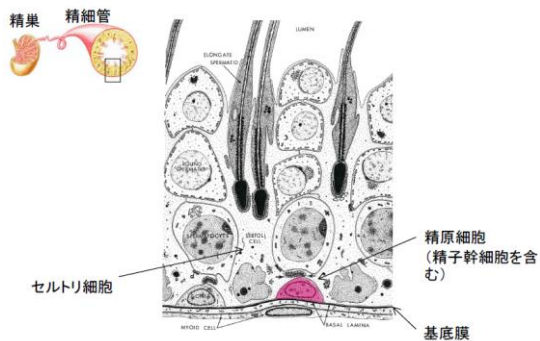


図1 精巣と精子幹細胞。精巣の中には精細管が折りたたまれて存在し、その上皮は体細胞のセルトリ細胞と生殖系列の精子形成細胞によって構成される。精子幹細胞は体細胞分裂期の精原細胞の一部 (マゼンタ) であり、分化後、数回の体細胞分裂を経て減数分裂に移行する。

精子幹細胞は、基底膜上に疎らに分布し、動きまわりながら分化細胞をうみ出す。そして分化細胞は、細胞運動や分裂を経て、正確に精巣全体に分布するようになる (図2)。

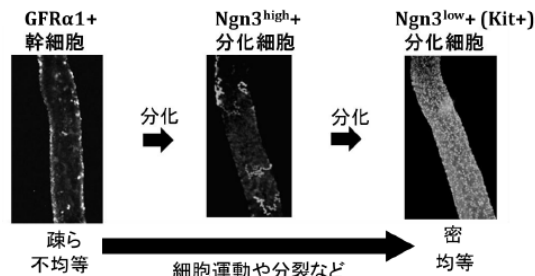


図2 精巣の精細管内における精子幹細胞 ( $GFR\alpha 1+$ ) および一段階分化が進んだ細胞 ( $Ngn3+$ ) の分布。

このように、マウス精巣の中では、精子幹細胞および分化細胞のダイナミックな動きが恒常的な精子生産を下支えしており、動きは精子生産性に直結する重要なメカニズムと言える。従来、精子形成における細胞運動の重要性は認識されてきたものの、その直接的解析は困難であった。近年、精子幹細胞と分化細胞のマーカーに関する知見が蓄積され、*in vivo* 精巣ライブイメージングなど解析技術が確立されつつあり、マウス精子幹細胞・分化細胞の運動パターンと制御要因について検証することが可能になった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 精子幹細胞・分化細胞の運動パターンの解明、および(2) 細胞運動を制御する素因の解明である。

### 3. 研究の方法

(1) 目的(1)の達成のため、*in vivo* 精巣ライブイメージング解析により、幹細胞 ( $GFR\alpha 1-GFP+$ 細胞) と分化細胞 ( $Ngn3-GFP+$ 細胞) (Yoshida et al., *Developmental Biology* 2005; Yoshida et al., *Science* 2007) の運動パターンを明らかにする。この解析により、細胞の形態 (ひとつひとつばらばらの As 細胞、ふたつの細胞が連結した Apr 細胞、4つ以上の細胞が連結した Aal 細胞) および細胞の遺伝子発現 ( $GFR\alpha 1$  と  $Ngn3$ ) の違いと動きの違いの関係性を解明する。

(2) 目的(2)の達成のため、細胞運動に対する合胞体形成の影響を明らかにする。合胞体形成不全モデル (*Tex14-knockout [KO]*) マウス (Greenbaum et al., *PNAS* 2006) と *GFRα 1-GFP* マウスもしくは *Ngn3-GFP* マウスを交配した各二重遺伝子改変マウスのライブイメージング解析により、ひとつひとつばらばらの *Tex14KO;GFRα 1-GFP* +細胞および *Tex14KO;Ngn3-GFP*+細胞の運動能をそれぞれ実測し、各ステートにおける単一細胞の運動能の相違性を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 解析(1)によって、以下の成果が得られた。予備試験として、ライブイメージングデータを解析するための座標取得方法の検討を行い、手動的な取得方法を確立した。同法を利用して画像から得られた細胞の経時的な位置情報をもとに、動きの性質を解析した。

$GFR\alpha 1-GFP+$ 細胞の軌跡は一見して無秩序に見えた。そこで、同細胞の軌跡を統計学的に解析した結果、 $GFR\alpha 1-GFP+$ 細胞の平均二乗変位の値が時間に比例し、 $GFR\alpha 1+$ 細胞の運動は通常拡散の過程と見なせることが示唆された (図3)。

さらに、形態の異なる As 細胞、Apr 細胞、Aal4 細胞について、拡散係数 (拡散のしやすさを示す係数) の比較を行った結果、合胞体の長さ (連結細胞数の多さ) が拡散係数と反比例することが明らかになった。即ち、形態の異なる幹細胞集団は、形態 (As 細胞、Apr 細胞、Aal 細胞) 毎に拡散係数が異なり、最も短い As 細胞が最も大きく拡散することが示された (図3)。合胞体が長くなるほど拡散性が低下するという結果は、合胞体構造が細胞運動を拘束する素因になっている可能性を示唆する。

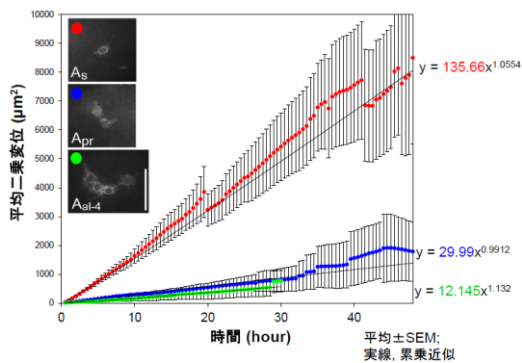


図3 平均二乗変位解析による GFR $\alpha$ 1-GFP+ の拡散解析。As 細胞 (赤)、Apr 細胞 (青)、Aal4 細胞 (緑) の平均二乗変位はそれぞれ、時間に比例していた。また、As の拡散係数 (赤の傾き) が他の合胞体の拡散係数 (青と緑の傾き) に比べて大きいことが分かった。

一方、一段階分化の進んだ Ngn3-GFP+細胞について、平均二乗変位解析を実施した結果、分化初期に一旦停止した後、更に分化が進行すると、方向性を持った動きを示すことが明らかになった。

以上の結果、幹細胞はランダムな運動によって通常拡散し、分化すると一旦停止した後、精細管全体に有方向性の運動を示すことが示された。

個々の幹細胞・分化細胞の運動原理を更に理解するため、今後の研究として、数理モデル解析による運動ダイナミクスの解析を進める予定である。

(2) 解析(2)によって、以下の成果が得られた。合胞体形成不全モデルマウスである、*Tex14KO* マウスを用い、合胞体構造を取らない単一細胞の場合の *Tex14KO*; GFR $\alpha$ 1-GFP+細胞および *Tex14KO*; Ngn3-GFP+細胞 (図4) の動きの違いを解析した。

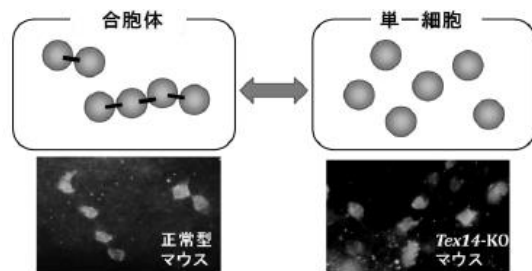


図4 本研究で使用した合胞体形成不全モデルマウス (Greenbaum et al., PNAS 2006)

左: 正常型マウス

右: *Tex14-KO* (合胞体形成不全) マウス

運動速度の解析を行った結果、*Tex14KO*; GFR $\alpha$ 1-GFP+細胞は *Tex14KO*; Ngn3-GFP+細胞に比べて速く運動することが示唆された。この結果から、幹細胞および分化細胞の多様な運動性を決める素因として、合胞体の長さの違いに加えて、単一細胞レベルの運動能の違いが存在する可能性が示唆された。

今後、同データを利用して拡散性の解析を行い、両細胞における運動性の違いを明確化するとともに、運動性の違いを生み出す分子メカニズムの探索を進める予定である。

以上、(1)(2)の結果より、精子幹細胞と分化細胞の運動パターンの解明に成功し、また、その制御素因として合胞体の長さおよび細胞の運動性の違いが重要であることが明らかになった。本成果を基盤として、今後、精子幹細胞・分化細胞の運動制御機構の解明と幹細胞運動の生物学的意義の解明が期待される。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y, Hara K, Mizuguchi H, Sato T, Taketo MM, Sugiyama F, Ogawa T, Kobayashi S, Ueno N, Takahashi S, Takada S, Yoshida S, SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells, *Stem Cell Reports*、査読有、Vol. 8、No. 3、2017、561-575、DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.01.006.

②Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T, Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa, *PLoS One*、査読有、Vol. 11、No. 11、2016、e0167127、DOI: 10.1371/journal.pone.0167127.

③Umezumi K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, Tanemura K, Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle, *Journal of Reproduction and Development*、査読有、Vol. 62、No. 4、2016、409-414、DOI: 10.1262/jrd.2016-055.

④Ikami K, Tokue M, Sugimoto R, Noda C, Kobayashi S, Hara K, Yoshida S, Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis, *Development*、査読有、Vol. 142、No. 9、2015、1582-1592、doi: 10.1242/dev.118695. Epub 2015 Apr 9.

⑤Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, Suzuki M, Yamamoto M, Simons BD, Yoshida S, Mouse spermatogenic stem cells continually

interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states、Cell Stem Cell、査読有、Vol. 14、No. 5、2014、658-672、doi: 10.1016/j.stem.2014.01.019.

〔学会発表〕(計 6 件)

①原健士朗、精子幹細胞挙動の加齢変化、日本分子生物学会、2016年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

②原健士朗、Spermatogenic stem cell dynamics in mouse testis、日本生化学会、2016年9月27日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

③原健士朗、研究会 Cellular Dynamics in tissues、精子幹細胞の運動、2016年1月21日、自然科学研究機構基礎生物学研究所(愛知県・岡崎市)

④原健士朗、第9回家畜DNA西郷シンポジウム、ほ乳類精巣における幹細胞のふるまい：動く生殖細胞は精子だけでない、2015年10月14日、家畜改良センター(福島県・西郷村)

⑤原健士朗、日本畜産学会、精巣から見出された組織幹細胞の知られざる性質、2015年3月28日、宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)

⑥原健士朗、種村健太郎、吉田松生、精細管基底区画における分化軸に沿った精原細胞の局在変化、日本繁殖生物学会大会、2015年9月18日、宮崎大学(宮城県・宮崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

①研究室ホームページ

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/seisyoku/>

②本研究の成果は以下の学術専門誌でハイライト研究として紹介された。

Sperm Spawned by Shifty, Biology of Reproduction 7 May (2014).

③研究成果について、以下のオンライン誌にて、日本語で紹介した。

ライフサイエンス新着論文レビュー (First Author's)、原健士朗、吉田松生、マウスの

精子幹細胞は異なる状態をくり返し行き来している、2014年6月。

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/8753>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原健士朗 (HARA, Kenshiro)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：60551546

(2) 連携研究者

吉田松生 (YOSHIDA, Shosei)  
自然科学研究機構・基礎生物学研究所・教授  
研究者番号：60294138