

研究報告書

「精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年4月～平成29年3月

研究者: 篠原 美都

1. 研究のねらい

精子幹細胞は一生にわたって増殖し、毎日膨大な数の精子を産生する。幹細胞は精巣に多数(マウス精巣では2-3万個といわれている)あり、精子はそれらが作りだすものの混合体であるが、それぞれの幹細胞が均等に精子を作っているのか、幹細胞の使われ方に偏りがあるのかは不明であった。

本研究では個々の幹細胞が精子形成にどのような動態で寄与するかを明らかにするため、精子幹細胞に試験管内でウイルス遺伝子を感染させ、標識を行った。ウイルス遺伝子はランダムにゲノムに挿入されるため、個々の幹細胞を特異的に標識することができる。この細胞集団を内因性の精子形成が欠損したWマウス精巣に移植した。このマウスの精巣は移植された幹細胞からの精子形成を支持するため、いわば“空”の器の中で精子形成を構築することができる。本研究では、このホストマウスを野生型の雌マウスと交配させ、生まれた仔のゲノムにおけるウイルス遺伝子の挿入パターンから、それぞれの仔がどの幹細胞から生まれたかを判定し、幹細胞が精子形成に寄与する動態の時間的推移を調べた。その結果から幹細胞が精子形成に寄与しうる“機能的寿命”を求めるとともに、数理解析により実際に精子形成に寄与している幹細胞数を推定し、幹細胞が偏って使われているかの判定を試みた。また、それぞれの幹細胞が寄与する間隔を数理解析し、幹細胞の精子形成活性の変動を数式にて表すことを試みた。

また、上記のような幹細胞の活性の変動が、幹細胞のどのような振る舞いによって起きているかについて解明を試みた。幹細胞から精子が形成される効率に影響すると考えられる主要な2つの因子である幹細胞の分裂速度と、その後の分化過程におけるアポトーシス頻度を測定し、精子形成効率への影響を数理解析にて調べた。

精子形成の効率は遺伝病の伝達や、種の進化・保存に影響する重要なファクターである。精子幹細胞の活性の変動や、幹細胞間の競争の存在が明らかになれば、雄の生殖細胞を介する遺伝制御の理解に新たな局面を拓くことになる。また、精子幹細胞の精子形成活性を遺伝子操作などで制御することができれば、家畜の品種改良法に新たな工夫を加えられる可能性や、男性不妊症の治療にも繋がる可能性がある。精子幹細胞をターゲットとして、精子形成活性の制御の可能性を追求することが本研究のねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では内因性の精子形成のない精巣に、ウイルスにより特異的に標識された精子幹細胞集団を移植し、精子形成を再構成することで、個々の幹細胞の精子形成への寄与の動態を調べることを目指した。まず移植によって再構成された精巣が、定常状態を達成している

か否かを検証したところ、移植後2ヶ月ですでに定常状態に達し、正常な精巣に近い精子形成を再現できること、この精巣では約 400–500 個の幹細胞が生着していることが分かった。

この移植の実験系を用いて、レトロウイルスおよびレンチウイルスで標識した幹細胞集団を移植した雄個体を作成し、ホストマウス 10 匹から生まれる仔のゲノム DNA を最長2年にわたってサンプリングした。合計 1325 匹の仔について、サザンブロッティングにてウイルス遺伝子の挿入パターンに基づき、それぞれの仔がどの幹細胞に由来しているかを調べたところ、同じ腹や、違う日に生まれた腹に、同じ幹細胞由来の仔が生まれるケースが頻繁に見られた。全ての幹細胞が一律に精子形成に寄与しているとすると、重複は殆ど起こらないはずであるため、一部の幹細胞が偏って寄与している可能性があると考え、数理解析にて検討した結果、以下のことが分かった。

(1) 幹細胞の機能的寿命(精子形成できる期間)は長く、平均 124 日であり、最も長い例では 482 日である。

(2) 同じ幹細胞から重複して仔が生まれる頻度は有意に高く、一部の幹細胞が偏って使われていることを示している。

(3) 個々の幹細胞からの精子形成数は、増大期と休止期を繰り返す。また、精子形成活性の数式を導くことができ、それによると周期は約 77 日であった。

次に、なぜ精子が形成されない幹細胞があるのかを調べた。造血系では幹細胞そのものが分裂せず休止することが知られている。精子幹細胞で同様に分裂の休止によって精子形成活性が変動しているか否かを明らかにするため、細胞分裂によって蛍光タンパク質の発現が半減する変異マウスを用いて幹細胞の分裂速度を測定したところ、全ての精子幹細胞は休止することなく、常に分裂していることが分かった。一方、精子幹細胞の分化の途中で高い頻度でアポトーシスが起きており、これまで考えられてきたように幹細胞自体の分裂活性が精子形成の効率を決めているのではなく、幹細胞から精子へと分化する過程で、細胞死によって精子形成する幹細胞と、しない幹細胞の選択が起こることが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A 「移植による精子形成の再構成系の検証」

本研究項目では精子幹細胞の移植による精子形成系の再構成系において、移植後どのようなタイムコースで定常状態の幹細胞動態が出来上がるかを検証した。

GFP マウスと野生型マウスの精子幹細胞を 1:6 にて混合した細胞集団を W マウス精巣に移植し、移植後2ヶ月、4ヶ月、8ヶ月にレシピエントマウスの解析を行った。EGFP 陽性コロニー数を UV 照射下で観察してカウントし、さらに二次ホスト(生後6–8週齢の W マウス)へ継代移植を行った。一次コロニー数、および自己複製活性 $= (\text{二次ホストコロニー} \div \text{一次ホストコロニー}) \times \text{Seeding efficiency}(10\%)$ と定めて幹細胞の自己複製活性を求めた。その結果、移植後2ヶ月以降、精巣重量・1次コロニー数、自己複製活性とも有意な変動はなく、移植後2ヶ月にて定常状態の精子形成が再構成されていることがわかった。

また、精巣上体尾部より精子のゲノム DNA を採取し、qPCR 法にて Protamine 遺伝子と EGFP 遺伝子のゲノム量をもとに、精子全体のうち何%が EGFP 陽性細胞由来であるかを測

定した。また EGFP 陽性コロニーの数と EGFP 陽性精子の割合のデータから、精巣全体で何個の幹細胞が精子形成に寄与しているかを算出したところ、約 400-500 個程度であることがわかった。

研究テーマB「精子幹細胞の in vitro のクローナルマーキングによる精子形成への寄与の解析」

本項目では精子幹細胞をウイルスにて in vitro でマーキングし、移植によって幹細胞から産生される仔の幹細胞 origin の解析から、幹細胞の動態をクローナルな視点で解明することを目指した。

Venus を発現するレンチウイルス (CSII-IRES-Venus) を感染した精子幹細胞集団を移植したレシピエント (W マウス) を移植後6週間

から、野生型 C57BL/6 雌マウスと自然交配し、産仔ゲノム DNA について Venus プローブにてサザンブロッティングを行い、ウイルス遺伝子の挿入パターンから、どの幹細胞由来であるかを分類した(図1)。10匹のレシピエントから得られた1300匹以上の産仔について解析を行った結果、ウイルス遺伝子の入った幹細胞のパターンの総数は310種類であった。Kaplan-Meyer 法にて最短の寿命を求めたところ、平均221日であり、同じクローンが出てくる最長の間隔は、平均で124日、一番長いものでは482日離れて同じクローンが生まれるものがあった。このことは精子形成の1サイクルがマウスでは35日であることを考えると、これらの結果は幹細胞がかなり長期にわたって機能し続ける事を示している。

また、同じ幹細胞由来の仔が重複して生まれる事が頻繁に観察され、実際に限られた数の幹細胞が使われている可能性が示唆された。そこで最尤推定法にて精子形成している幹細胞数を求めたところ、平均188個程度という結果が得られた。この結果は、研究テーマAにおいて求めた総コロニー数が400-500個程度であるのと比較して低く、一部の幹細胞だけが使われている可能性を示唆している。さらにモンテカルロテストにて実際に同じ腹に同じ幹細胞由来の仔が重複して生まれる事象をシミュレーションしたところ、産仔数が多く十分なサンプル数の得られた一部のレシピエントでは観察された重複の頻度はシミュレーションの結果よりも有意に高いことがわかった。

そこで、幹細胞は長期に精子形成するが、その活性は周期をもって変動しているのではないかと考え、どのような周期をもって変動しているかを調べた。同じクローンが離れた腹で出てくる間隔を調べたところ、特定の幹細胞から仔が生まれる頻度は一旦低下したのち上昇し(図2)、幹細胞の活性が burst と休止期を繰り返している可能性が示唆された。このモデルに基づき幹細胞の精子形成活性を表す確率密度関数を導出し、Monte-carlo シミュレーション

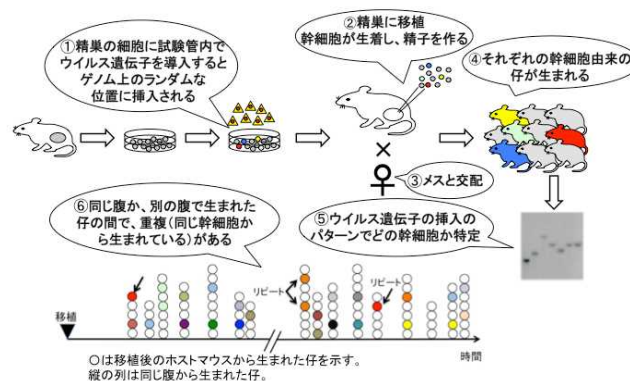


図1

により、実測値と一致することを確認した。

研究テーマ C 「精子幹細胞の分裂とアポトーシスの頻度が精子形成効率に及ぼす影響の解析」

本項目では Rosa26 rtTA/tetO-H2B-GFP マウスを用いて、精子幹細胞の分裂速度を測定した。

成体の Rosa26 rtTA/tetO-H2B-GFP 雄マウスに Doxycycline を含有する水を35日間投与した後、精巣を摘出し、flow cytometry により GFP 発現の割合を測定した。未分化型精原細胞マーカーCDH1CDH1 強陽性の精原細胞集団をゲーティングし、GFP 発現細胞の割合を測定した。Doxycycline 投与終了後最長1カ月まで観察を行ったが、GFP の発現は doxycycline 除去後速やかに減少し、半減期約 3.9 日で分裂しており、かつ造血幹細胞のように分裂休止している細胞はなく、全ての幹細胞が活発に分裂していることが分かった。

そこで、精子形成の休止は幹細胞の分裂速度ではなく、その後の分化過程でアポトーシスにより起きているのではないかと考え、Annexin V 染色にて調べた。Rosa26 rtTA/tetO-H2B-GFP マウスの精原細胞は、フローサイトメトリーにより精原細胞マーカーCDH1 と GFP 発現にて展開すると、5つの population に分けられる。幹細胞があると推察される最も CDH1 の発現の高い細胞集団が最も GFP 発現が高く、CDH1 発現低下に伴って GFP 発現レベルは低下する。Annexin V 染色の結果、未分化な細胞(CDH1 high)に比べて分化度の高い細胞(CDH1 low, 分化型精原細胞マーカーKIT 発現)ではアポトーシスが活発に起きている事が分かった。さらにこれらのデータをもとに精子幹細胞の分裂とアポトーシスの頻度が精子形成効率に及ぼす影響の数理モデルを構築した。

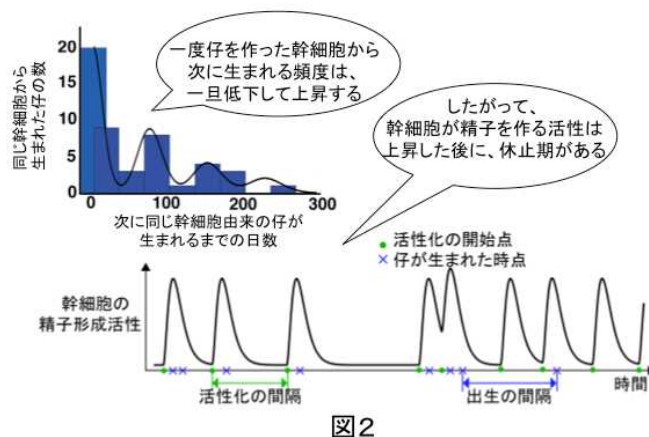


図2

3. 今後の展開

本研究では精子幹細胞の精子形成活性に周期変動があることを見だし、その制御に幹細胞から精子へと分化する過程で起こるアポトーシスが関与している可能性を示した。今後の研究では、(1)幹細胞の精子形成活性の制御に関わる分子機構を明らかにし、その発現操作により精子形成活性を制御する方法の確立を目指す。周期の制御により、特定の幹細胞から精子を選択的に作ることができれば、家畜の品種改良法に新たな工夫を加えられる可能性や、男性不妊症の治療に繋がる可能性がある。また(2)精子形成活性の周期の存在意義は未だ明らかでないが、作られる精子のクオリティーコントロールに必要である可能性もあり、操作して周期を壊すことで検証する。さらに、(3)高齢の男性から遺伝性疾患を持つ子が生まれる頻度が亢進することが知られているが、その原因に周期の破綻が関与している可能性がある。今後の研究では、精子幹細胞活性の周期と疾患の関連についても検討していきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況:本研究の開始時に掲げた課題は、「精子幹細胞の精子形成活性の動態を数理解析にて解く」ことと、「その動態を制御する」ことであった。前者については計画したこととのほぼ全てを達成し、特に数理解析については当初の予想以上の展開が得られた。一方、後者については現在、精子幹細胞の精子形成活性周期の制御に関わる遺伝子をスクリーニングしながら進めているが、未だ関与が確定できる遺伝子が見いだされていないため、スクリーニング対象を広げながら、継続して行う予定である。

研究の進め方: 本研究は大学院生および実験補助者の協力により行った。研究室外からは大学内の支援センターの技術協力と、数理解析に関して共同研究者の協力を得て遂行した。本研究ではできるだけ既存の機器や大学の共通機器を活用し、研究費の大部分を実験動物の飼育や購入、試薬類の購入など、実際の実験に直接活用できるよう努めた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果: 本研究の成果は、生殖・遺伝のメカニズムについて新たな観点を示した点で社会に学術的な効果を及ぼすと期待できる。また本研究で確立した精子幹細胞の移植を用いた、精子形成系の再構成と幹細胞の動態解析法は、精子幹細胞のみでなく他の幹細胞システムの理解にも役立ち、組織幹細胞に基づく再生医療の発展に寄与しうると考えられる。また本研究を発展させ幹細胞をターゲットとして精子形成を制御できるようになれば、家畜の品種改良や男性不妊症の治療に新たな展開をもたらすことも可能である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

クローナルマーキングした精子幹細胞を、内因性の精子形成のない不妊マウス精巣に移植して精子形成を再構成し、レシピエントから生まれる仔を生涯にわたってサンプリングし、幹細胞の由来を同定した。そして、数理モデルの構築に挑戦し、独自のモデル系を構築できたことは大きな財産である。このような地道な辛抱強い研究から、精子幹細胞の機能的寿命と、全部の幹細胞が均一に精子形成に寄与するのではなく偏りがあること、さらに各幹細胞の活性には周期的変動があること、を次々に明らかにした。また、精子形成活性に休止期があることを発見するなど、予想外の成果も得られた。

精巣内で移植した標識幹細胞からの分化を再構成するというユニークなアプローチと、領域内共同研究によってそのモデル化を成功させたことは大きな成果である。アポトーシスの関与という新たな視点からの研究の展開も期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mito Kanatsu-Shinohara, Takashi Tanaka, Narumi Ogonuki, Atsuo Ogura, Hiroko Morimoto, Pei Feng Cheng, Robert N. Eisenman, Andreas Trumpp, Takashi Shinohara.
Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal.

Genes & Development In press
2. Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Lei Z, Rao CV, Shinohara T. The luteinizing hormone-testosterone pathway regulates mouse spermatogonial stem cell self-renewal by suppressing WNT5A expression in Sertoli cells. Stem Cell Reports 2016, 7(2):279-91
3. Kanatsu-Shinohara M, Naoki H, Shinohara T. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. Dev Cell 2016, 38 (3): 248-61
4. Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Shinohara T. Fertility of male germline stem cells following spermatogonial transplantation in infertile mouse models. Biol Reprod 2016, 94(5):112
5. Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Shinohara T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by the stem cell dye CDy1. Biol Reprod 2016, 94(1):13

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

口頭発表

1. Takashi Shinohara, Honda Naoki, and Mito Kanatsu-Shinohara “Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells”文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」による国際シンポジウム 平成28年2月17日-19日

ポスター発表

1. Mito Kanatsu-Shinohara, Hiroko Morimoto, and Takashi Shinohara “Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by a stem cell dye CDy1”文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」による国際シンポジウム Epigenome Dynamics and Regulation in Germ cells Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University 平成28年2月17日-19日

プレスリリース

1. 「一つの幹細胞からできる精子の数は周期的に変動することを発見、一つの幹細胞からできる精子の数は周期的に変動することを発見」2016年8月9日

科学技術振興機構(JST)ホームページ

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160809/index.html>

京都大学広報ホームページ

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/160809_1.html

新聞記事

1. 「効率が種の保存左右 精子形成に周期あり 精巣幹細胞分化が鍵」科学新聞 4面

2016年8月12日

2. 「精子幹細胞研究成果 京大グループ 形成周期的、遺伝子に偏り」 京都新聞 25面
2016年8月19日

一般向けのイベントにおける研究紹介

1. 篠原美都「幹細胞が精子を作る活性には周期がある」 京都大学アカデミックデイ 2016
京都大学百周年時計台記念館 平成26年9月18日
<http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2016/>