

マウスモデルを用いた精原幹細胞純化系の 開発とその不妊治療への応用

研究課題番号(13670012)

科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
平成13年度～平成14年度

研究成果報告書



平成15年3月

研究代表者 篠原隆司

(京都大学医学研究科・助手)

科研
2002
337

はしがき

精原幹細胞は成体の中で唯一個体の遺伝情報を子孫に伝えることのできる幹細胞である。しかしながらその重要性にも関わらず、この幹細胞の研究は他の体細胞系の幹細胞に比較すると極めて遅れている。これは一つには1) この幹細胞を同定する方法がなかったこと、さらには2) この幹細胞が精巣の中では極めて少数の細胞集団(マウスの場合 10000 個につき 2-3 個)であることという 2 つの大きな理由があったからである。1) に関しては 1994 年に精原幹細胞移植法という技術がペンシルバニア大学のプリンスターらにより開発され、この幹細胞を機能的に同定することが可能になった。幹細胞は自己複製能というユニークな生物学的特徴をもっており、これを同定するにはその機能による。その点で、この移植法の開発によりこの幹細胞を retrospective に同定することが可能になった。

2) に関しては我々が中心となり、この幹細胞の濃縮が行われてきた。幹細胞上の抗原を同定し、その組み合わせにより幹細胞をセル・ソーターで濃縮するというアプローチはこれまでに既に報告されている血液幹細胞でのアプローチをベースにしたものであり、この方法の開発により我々は精原幹細胞を 20-30 個に 1 個のレベルにまで濃縮することに成功した。

本研究の目的は、これまでの研究成果を更に発展させ、この濃縮幹細胞の濃縮レベルを更に向上させること、また精原幹細胞の濃縮の技術を応用し、精原幹細胞移植による不妊症治療へと発展させることにある。もしこの幹細胞を純粋に大量に取ることができれば、幹細胞がどのような性質を持つのか、分子生物学的・生化学的解析を行うことができるようになる上に、大量の幹細胞を移植することができれば不妊の回復も効果的に行われることが期待され、精原幹細胞の研究を行う上で大いに貢献する可能性がある。

本研究の結果、我々は精原幹細胞上に新規の抗原を同定することに成功し、実際にその抗原が精原幹細胞上に発現していることを精原幹細胞移植法を用いて証明した。さらに我々は、この濃縮レベルを改善するためには、これまで通常用いられていた成熟したホストマウスを用いるよりかは、生後間もない未成熟のホストを用いれば、移植効率を 10 から 20 倍に改善し、移植を受けた不妊マウスの 70-80% 以上のものが不妊を回復することに成功した。このように本研究はこれまで非常に非効率であった不妊回復率を改善した点で

特に意義がある。

香取 久美子

本報告書は平成13年から平成14年にかけて行われた文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)一般「マウスモデルを用いた精原幹細胞純化系の開発とその不妊治療への応用」(研究課題番号 13670012)の研究成果をまとめたものである。我々の研究を支援して下さいった文部科学省、京都大学医学研究科および多くの共同研究者の方々に深く感謝する。

この報告書は、平成13年から平成14年にかけて行われた文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)一般「マウスモデルを用いた精原幹細胞純化系の開発とその不妊治療への応用」(研究課題番号 13670012)の研究成果をまとめたものである。我々の研究を支援して下さいった文部科学省、京都大学医学研究科および多くの共同研究者の方々に深く感謝する。

この報告書は、平成13年から平成14年にかけて行われた文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)一般「マウスモデルを用いた精原幹細胞純化系の開発とその不妊治療への応用」(研究課題番号 13670012)の研究成果をまとめたものである。我々の研究を支援して下さいった文部科学省、京都大学医学研究科および多くの共同研究者の方々に深く感謝する。

この報告書は、平成13年から平成14年にかけて行われた文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)一般「マウスモデルを用いた精原幹細胞純化系の開発とその不妊治療への応用」(研究課題番号 13670012)の研究成果をまとめたものである。我々の研究を支援して下さいった文部科学省、京都大学医学研究科および多くの共同研究者の方々に深く感謝する。

この報告書は、平成13年から平成14年にかけて行われた文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)一般「マウスモデルを用いた精原幹細胞純化系の開発とその不妊治療への応用」(研究課題番号 13670012)の研究成果をまとめたものである。我々の研究を支援して下さいった文部科学省、京都大学医学研究科および多くの共同研究者の方々に深く感謝する。

この報告書は、平成13年から平成14年にかけて行われた文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)一般「マウスモデルを用いた精原幹細胞純化系の開発とその不妊治療への応用」(研究課題番号 13670012)の研究成果をまとめたものである。我々の研究を支援して下さいった文部科学省、京都大学医学研究科および多くの共同研究者の方々に深く感謝する。

研究組織

研究代表者：篠原隆司（京都大学医学研究科・助手）

研究経費

直接経費

平成13年度 2,100千円

平成14年度 1,400千円

間接経費

計 3,500千円

研究発表 (本報告書には*で示した論文を添付する)

(1) 学会誌等

1. * Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R. and Brinster, R. L. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6186-6191 (2001).
2. Kanatsu-Shinohara, M., Ogura, A., Ikegawa, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Tashiro, K., Toyokuni, S., Honjo, T. and Shinohara, T. Adenovirus-mediated gene delivery and in vitro microinsemination produce offspring from infertile male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1383-1388 (2002).
3. Orwig, K. E., Shinohara, T., Avarbock, M. R. and Brinster, R. L. Functional analysis of the rat spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 66, 944-949 (2002).
4. * Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R. and Brinster, R. L. Germ line stem cell competition in the postnatal mouse testis. *Biol. Reprod.* 66, 1491-1497 (2002).
5. Shinohara, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Nakata, K., Kurome, M., Nagashima, H., Toyokuni, S., Kogishi, K., Honjo, T. and Ogura, A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular piece and in vitro microinsemination. *Hum. Reprod.* 17, 3039-3045 (2002).
6. * Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S., Honjo, T. and Shinohara, T. Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. *Biol. Reprod.* 68, 167-173 (2003).

(2) 口頭発表

1. 篠原隆司 Manipulation of male germline by virus vectors (平成13年度哺乳動物遺伝学研究会、北海道札幌、平成13年6月)
2. 篠原隆司 The development of Sertoli cell transplantation technique (文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究「生殖細胞系列の制御機構と発生工学」による公開シンポジウム「生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティックス」、京都、平成15年1月)

(3) 出版物

該当なし。

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし。

研究成果

精原幹細胞は精子形成の源になる細胞であり、雄の精子形成を一生にわたり支えることの出来る細胞である。1994年に精原幹細胞移植法が開発され、この幹細胞をある個体から別の個体へと移植することが可能になった。この方法により、繁殖能を持つ雄の精巣細胞を酵素処理をしてバラバラにしてやり、不妊の雄の精細管内にマイクロインジェクションしてやることによって、不妊マウスの繁殖能を回復することが可能になった。この方法は雄の不妊治療において極めて画期的な手法であったが、その効率は極めて低く約100匹に1匹程度の雄において成功例が認められたに過ぎなかった。

その低成功率を改善すべく、我々は移植する幹細胞を濃縮し、ドナー由来の幹細胞の移植数を増やしてやることを試みた。その研究によりこれまでのところ、マウス精原幹細胞は alpha6-integrin 陽性、beta1-integrin 陽性、c-kit 陰性、alphav-integrin 陰性という表現形をとることが明らかになってきた。この表現形を基準にしてマウスの精巣細胞をフローサイトメーターにより分離してやると約30個に1個の細胞が精原幹細胞であるというレベルまで濃縮を進めてくることができた。こういった細胞を移植した場合、雄の不妊回復率は向上し、約5匹に1匹の雄がドナー細胞の移植後5ヶ月—8ヶ月の期間でドナー由来の子供を生むことができることが分かった。

本研究において我々はこの濃縮率を向上させることで不妊マウスの繁殖能の回復率をさらに高めることを目的にして研究を開始した。我々はマウス精原細胞を認識することのできる新規抗原を複数同定することに成功し、その抗原が実際に精原幹細胞に発現されているということを精原幹細胞移植法を用いて確認した。さらに、移植されるホストのステージを変えてやることで、不妊マウスの回復率を飛躍的に改善させることができるということも見いだした。以下に本研究の主要な成果を要約する。

1. マウス精原幹細胞上の新規抗原の同定

精原幹細胞は極めて少数の細胞集団であり、マウスにおいては10000個あたり2—3個しか存在していない。我々はこれまでに開発したセル・ソーターを用いた精原幹細胞濃縮法を用い、この幹細胞を濃縮し、ラットへ免疫することでマウス精原幹細胞に対する抗体を作成した。

精原幹細胞を認識するか否かについては、3段階で行った。まず第一段階としてその判定を組織染色により行った。マウスの精巣の凍結切片を作成し、

抗体が精原細胞に特異的に染色するかどうかを調べた。次にこの陽性のクローンの中で濃縮精原幹細胞を認識するかどうかをフローサイトメトリーを用いて、解析し新規の抗原か否かを検討を行った。こうして調べた中で本当に精原幹細胞に発現するか否かの最終判定は磁気ビーズを用いた細胞分離法を用いて、野生型の精巣由来の幹細胞を含む精巣細胞集団を選択、選択された細胞と選択前の細胞（コントロール群）の同数を不妊マウスの精巣に精原幹細胞移植を行い、コロニー数が有意に増加しているか否かで判定した。

この結果によると、この未知抗原を用いて選択した細胞集団はコントロール群に比較して、105個の細胞あたり4.5倍多くの幹細胞数を濃縮することが分かった。この抗原はその精巣の組織学的染色、フローサイトメーターでの染色のパターンにより、これまでに我々が同定してある抗原、即ち alpha6-, beta1-integrin 分子とは異なる分子であることが分かっている。現在我々はこの抗原の構造決定を行いつつある。

2. マウスモデルにおける不妊症治療

これまでの我々の実験成果では精原幹細胞を移植することにより、不妊症のマウスの精子形成および不妊症の回復ができることが示されていた。この場合の実験に用いられたホストマウスは通常成熟したステージのものであり、6-10週齢のマウスの場合は不妊回復までに約5-6ヶ月かかる。

今回我々はこのステージを変え、更に若い未成熟なマウス（5から10日齢）をホストとして用いると移植効率が格段に向上することを見いだした。移植に用いるドナーマウスとしてはホストマウスと同ステージの未成熟マウス（5から10日齢）と停留睾丸処置した成熟マウス（12-16週齢）のものを用いた。ドナーマウスには大腸菌由来の LacZ 遺伝子が発現しており、移植後2ヶ月の段階でホストマウスの精巣を LacZ 染色し、そのコロニー数とコロニーの面積を測定し、移植効率を判定した。コロニー数は幹細胞の数、コロニーの面積は幹細胞の増殖の度合いを示す指標だと考えられている。またホストマウスとしては先天的に生殖細胞を欠損し不妊症になっている W マウスを用いた。

移植実験の結果によるとドナーのステージに関わらず未成熟マウスの精巣への移植効率は高いことが認められ、成熟マウスをホストマウスに用いる場合に比較して、未成熟なドナーの場合は10.9倍、成熟ドナーからは7.8倍多く

のコロニーが見つかった。またコロニーの面積についても未成熟なドナーでは4.1倍、成熟ドナーの場合は3.8倍の広い面積を占めることが分かった。即ち、これらの結果はホストマウスの精巣にはより多くの幹細胞が生着し、かつ生着後の増殖も促進されているということを示す。

われわれは次に実際にホストマウスの生着効率の改善が不妊回復率にどのように影響を及ぼすのかを調べるために雌マウスとの交配実験を行った。この実験ではドナーのマウスは停留睾丸処置をされた成熟マウスを用い、ホストマウスとしては3匹の未成熟マウスと6匹の成熟マウスを用いた。移植後約4-5週間して、雌マウスを同居させ不妊回復が起こるか否かを調べた。

その結果、移植を受けた未成熟マウスは全例において(3匹中3匹)不妊を回復した。一方、成熟マウスでは移植後6ヶ月間における期間では全く不妊回復は起こらなかった。未成熟マウスの不妊回復はその効率のみならず、期間も短縮されており、移植後77-84日で初めの子供が得られている。これは野生型のマウスが繁殖能を獲得する時期と一致しており、精原幹細胞移植で先天不妊のホストマウスが正常に繁殖する能力を獲得したことを意味する。

以上の結果より、精原幹細胞移植を効率良く行うには未成熟なホストを利用すれば良いということが明らかになった。

3. まとめ

本研究は精原幹細胞移植により効率良く不妊回復を行うシステムを確立した点で重要な意義を持つ。すなわち、従来用いた成熟ステージのホストを用いるよりかは未成熟なステージのホストが不妊治療には適しているということを明らかにした。また今回の研究で我々は精原幹細胞上の新規の抗原を同定することにも成功した。これらの新規の抗原を組み合わせること幹細胞の純度を向上させることで成熟したホストにおいても不妊回復を効率よく行える条件を今後模索する予定である。