

## 精子幹細胞の新しい自己複製様式の発見

-男性不妊症の原因解明、遺伝病の発症機序の理解に期待-

### 概要

精子幹細胞は精細管の中で体細胞分裂を行っている精原細胞の一部分の細胞であり、生涯にわたり精子を作り続けます。これまで精子幹細胞の自己複製分裂は精巣の体細胞であるセルトリ細胞から分泌されるグリア細胞株由来神経栄養因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF) が担っていると考えられていました。今回の私たちの研究により、精子幹細胞の中には GDNF に依存せず自己複製分裂を起こす新しいタイプの幹細胞が存在することが明らかになりました。この幹細胞は繊維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor 2; FGF2) により試験管内で自己複製を誘導することが可能であり、この二つの幹細胞集団は異なった自己複製様式を持つことも明らかになりました。今回の研究成果は男性不妊症の原因解明と治療法の開発、遺伝病の発症機序の理解につながると期待されます。

### 1. 背景

精子幹細胞は精巣細胞のうち 0.02-0.03%の割合でしか存在せず、特異的な分子マーカーも存在しないためにその解析は非常に困難です。しかしながら、この細胞は生殖細胞の中で唯一自己複製能をもち、雄個体の一生にわたり持続的に精子形成を続け、子孫へと遺伝子を伝えます。精巣の体細胞であるセルトリ細胞から分泌される GDNF は精子幹細胞の自己複製分裂に必要な分子として知られており、過剰量の GDNF は自己複製を亢進し精子幹細胞の分化を抑制する一方で、GDNF の発現量の減少は幹細胞の枯渇による不妊症を引き起こすことが 2000 年にマウスを用いた実験から報告されていました。同様に GDNF の受容体を構成する Ret や Gfra1 遺伝子を欠損したマウスにおいても生殖細胞の欠損が起こることから、セルトリ細胞から分泌される GDNF が精子幹細胞上に発現する Ret/Gfra1 受容体に結合し、自己複製分裂を引き起こしていると考えられるようになりました。

この成果を踏まえ、私たちは 2003 年にマウスの精子幹細胞の長期培養法を確立し、試験管内で大量の精子幹細胞を得ることに成功しました。こうして得られた培養精子幹細胞 (Germline Stem, GS 細胞) は試験管内で精原細胞として 2 年間以上の長期にわたり増殖し、不妊マウスの精巣へ移植すると精子形成を再開する能力を持ちます。GS 細胞を用いることで精子幹細胞の生化学・分子生物学的な解析や遺伝子改変動物の作成を行うことが可能になりました。

GS 細胞の樹立の過程で、我々は GDNF 以外にも FGF2 と呼ばれる増殖因子を添加することが必要であることを見いだしていました。その後の研究で私たちは FGF2 が GDNF シグナルを増強することで試験管内の精子幹細胞の自己複製分裂を促進することも示してきました。しかしながら生体内において FGF シグナルがどのように精子幹細胞に関わっているのかは明らかになっていませんでした。

### 2. 研究手法・成果

GDNF が精子幹細胞の自己複製に必要であるとする研究の根拠となったのは遺伝子改変マウスの解析でした。しかしながら、GDNF/Ret/Gfra1 を欠損するマウスは腎臓形成の異常などにより生直後に死亡することから、その解析が難しい上に精子幹細胞の欠損が機能的に確認されていないという問題がありま

した。そこで我々は全ての幹細胞が GDNF に依存していることを確認するため、GDNF の受容体である Ret 遺伝子の変異マウスに注目して組織学的な解析を行いました。出生直後の精巣を別個体の精巣に移植すると、移植片の中に未分化な精原細胞マーカー分子を発現する細胞が細胞集団を作っていることが免疫組織化学解析から分かりました。この結果は GDNF に依存しない幹細胞が精巣内にあることを強く示唆しました。そこでフローサイトメトリーを用いて GDNF の受容体である Gfra1 の発現を解析したところ、精巣の幹細胞のほとんどが Gfra1 を発現するが、Gfra1 を発現しない分画にも幹細胞が存在することが分かりました。

実際に GDNF 非依存性の細胞が自己複製能を持つ可能性を直接調べるために、私たちは次に精巣細胞を FGF2 の存在下で培養しました。すると培養された精巣細胞から GS 細胞とは異なった形のコロニーを形成する細胞集団 (FGF-dependent spermatogonia :F-SPG) を得ることができました。一方、GDNF を添加した場合には GS 細胞と非常によく似た形態のコロニーをもつ細胞集団 (GDNF-dependent spermatogonia: G-SPG) を得ることが出来ました。両者ともに GS 細胞に比較すると増殖活性は低いものの、5ヶ月以上にわたり培養可能でありました。自己複製分裂のメカニズムを調べるために細胞シグナル伝達分子である Map2k1/2 の抑制を行うと、G-SPG 細胞はその増殖が抑制されるものの、F-SPG 細胞は影響を受けないことから、両者は異なった細胞分裂様式を持つことが示唆されました。いずれの細胞も長期培養を行ったのち不妊マウスの精巣へと移植すると培養細胞由来の精子形成を再開し、それぞれの細胞から正常な子孫を得ることもできました。これらのことから、精巣には少なくとも二種類の異なったタイプの幹細胞があるとの結論に至りました。

本研究は高橋雅英 名古屋大学医学部教授、小倉淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター室長らとの共同研究により行われました。

### 3. 波及効果

精子幹細胞の自己複製は精子形成に大きな影響を与えます。とくに幹細胞は精巣における割合が極めて低いことと特異的な分子マーカーが存在しないことから、幹細胞の存在や異常を検出するのは困難です。マウスでは GDNF の発現量が減少すると生殖細胞が枯渇し GDNF のヘテロノックアウトマウスは精子形成細胞が欠損した雄性不妊症になります。ちょうどこの状態はヒトにおける Sertoli cell only syndrome (セルトリ細胞遺残症候群) に相当します。セルトリ細胞遺残症候群は男性不妊症患者の中では約3割近く存在していますが、その原因は明らかとなっておりません。しかしながら、今回の結果から明らかのように、こうした場合でもごく少数の幹細胞が存在し、その増殖を刺激するような適当な環境を整えてやることで幹細胞を増幅させ精子形成を再開することができる可能性を示唆します。実験動物を用いて幹細胞の増殖要求性をより明確にすることで、我々の研究成果はヒトの精子幹細胞の培養系の確立にも貢献することが期待されます。

精子幹細胞の自己複製制御は遺伝病の発症に関与する可能性があります。雌の生殖細胞は胎児期のごく短い時間に細胞分裂を終えるので、卵子に入った変異が次世代に伝播する可能性は相対的に低いですが、増殖を続ける精子幹細胞では遺伝子の変異頻度はより高く、雄においては雌よりも高頻度に遺伝子変異の蓄積が起りやすいと一般に考えられています。実際に、アペール症候群や軟骨無形成症と呼ばれる遺伝病では父親の年齢が高くなると共に遺伝子異常を持った子供が生まれてくるようになります。こうした患者さんは FGF 受容体に遺伝子変異をもち、FGF シグナルが恒常的に活性化されるため、変異の入った精原細胞は活発に増殖し、その結果としてより多くの異常精子を生み出し次世代に選択的に遺伝

するのではないかとされています。これまでこうした精原細胞の異常増殖が幹細胞の自己複製によるものかどうかは分かっていませんでしたが、今回の結果は FGF シグナル異常により精子幹細胞の自己複製が亢進するために特定のタイプの遺伝病が引き起こされる可能性を示唆しています。

#### 4. 今後の予定

本研究成果は、2015 年 2 月 12 日正午(米国東部時間)発行の科学誌「Stem Cell Reports」に掲載されます。

#### <論文タイトルと著者>

“Functional Differences between GDNF-Dependent and FGF2-Dependent Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal” Seiji Takashima, Mito Kanatsu-Shinohara, Takashi Tanaka, Hiroko Morimoto, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Mayumi Jijiwa, Masahide Takahashi, Atsuo Ogura, and Takashi Shinohara.

#### <用語解説>

**アペール症候群**：FGF2 の受容体分子である FGFR2 遺伝子に点突然変異により発症する症候群。FGF シグナルが過剰入力され頭蓋縫合早期癒合、合指・合趾症が主な症状。

**軟骨無形成症**：FGFR2 点突然変異により発症する。低身長や短い手足を中心とした骨格異常をきたす。