

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590481

研究課題名(和文)精子幹細胞のホーミングにおける aPKC の役割

研究課題名(英文)Role of aPKC molecules in spermatogonial stem cell homing

研究代表者

高島 誠司 (TAKASHIMA, Seiji)

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：40396891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞は自己複製を繰り返しながら個体の生涯にわたり精子形成を維持する。またこの細胞は移植により精子幹細胞ニッチェにホーミングすることで不妊マウスへの精子形成誘導も可能である。これまでの研究で、精子幹細胞のニッチェへの生着にはRac1による密着結合分子CLDN3の発現制御が必要であることを示した。本実験ではCLDN3の発現制御に関与する可能性がある細胞極性制御分子aPKCが精子幹細胞ホーミングに関与するかを検証した。結果、aPKC遺伝子欠損精子幹細胞、活性型aPKC、およびドミナントネガティブ型aPKCを過剰発現させた精子幹細胞にホーミング異常は認められない、という予想外の結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Spermatogonial stem cells (SSCs) are the foundation of spermatogenesis and can colonize genetically infertile testes. Previous result demonstrated that Rac1 mediated CLDN3 expression is necessary for homing of SSCs. Although atypical PKC (aPKC) molecule, such as PKCι and PKCζ are known to regulate expression of tight junction molecules including CLDN3, Role of aPKC in SSC homing remained unknown.

In the present study, we tried to unveil the role of aPKC molecules in SSC homing using aPKC conditional knockout mice. However, our SSC transplantation assay revealed that aPKC molecules were dispensable for SSC homing.

研究分野：生殖生物学 幹細胞生物学 再生医学

キーワード：精子幹細胞 ホーミング 血液精巣関門

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を規定する性質の一つとして、適切な箇所に移植すると幹細胞の自己複製能と分化能を発揮することができる領域（幹細胞ニッチ）に向かって移動し生着する能力『ホーミング』がある。例えば造血幹細胞は血管に注入することで骨髄内に存在する幹細胞ニッチにホーミングし、自己複製と分化を繰り返す。造血幹細胞ではこの現象の分子機序はよく研究されており、 $\beta_1$ -integrin や Rac1 が幹細胞ニッチへのホーミングに関与することが報告されている。

この『ホーミング』する性質は精子幹細胞にも当てはまる。精子幹細胞は精細管に注入することで、精細管の最外側に存在する幹細胞ニッチにホーミングすることが示された。精子幹細胞のホーミングは、(1)精子形成支持細胞であるセルトリ細胞への接着、(2)血液精巣閉門の通過、(3)幹細胞ニッチへの接着と自己複製という3段階で進行すると考えられている。精子幹細胞のホーミング効率は10%にとどまるが、それは血液精巣閉門の通過過程に主に原因があると考えられている。血液精巣閉門の分子実体はセルトリ細胞同士が形成する密着結合帯であることが知られているが、精子幹細胞がこの部分をどのようにして通過するかは明らかにされていない。

こうした背景から申請者は、conditional knockout (cKO)マウスより精子幹細胞を調製し ex vivo で遺伝子破壊した上で移植アッセイにてホーミング活性を判定する実験系を開発、ホーミングに関与する分子の機能解析を進めてきた。その成果として、2008年に $\beta_1$ -integrinを同定し、精子幹細胞のセルトリ細胞への接着、及び幹細胞ニッチに存在するラミニンへの接着に $\beta_1$ -integrinが必要であることを示した。続いて2011年に $\beta_1$ -integrinの下流で制御されるRac1が血液精巣閉門通過に必要であることを発見した。そして更に、精子幹細胞の血液精巣閉門通過機序について解析を進め、Rac1の作用により精子幹細胞自身も血液精巣閉門と同様に密着結合構成分子CLDN3を発現するように

なり、このことで密着結合帯を通過していることを明らかにした(図1)。

Rac1の下流分子の一つにPKC $\lambda$ がある。PKC $\lambda$ はPar3, Par6, Rac1とともに複合体を形成し細胞極性形成や密着結合形成に関与することが分かっている。こうした背景から申請者は、PKC $\lambda$ がRac1の下流因子として精子幹細胞のホーミングに重要な役割を果たすと考え、予備的な検討として精子幹細胞におけるPKC $\lambda$ の発現挙動を検討した。マウス精巣において免疫染色によりPKC $\lambda$ の発現を検討したところ、Rac1と同様に、精細管最外層に局在し精子幹細胞マーカーであるEpCAM陽性の細胞でPKC $\lambda$ の強い発現がみられ、PKC $\lambda$ が精子幹細胞において何らかの機能を担っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

精子幹細胞がニッチへホーミングする際に aPKC 分子が関与するか否かを明らかにすることを目的とした。具体的にはまず、精子幹細胞のホーミングに PKC $\lambda$  が関与するかを、恒常活性型/優勢抑制型 PKC $\lambda$  を強制発現させた培養精子幹細胞株 (germline stem cell: GS cell)、及び PKC $\lambda$  遺伝子破壊精子幹細胞の移植により検討することを計画した。

上記の検討で、PKC $\lambda$  がホーミングにおいて何らかの役割を果たす場合、以下の項目 A)~C)について検討を計画した。

- (1) 精子幹細胞のホーミング過程において、セルトリ細胞への接着、血液精巣閉門通過、ニッチへの接着のどの段階に PKC $\lambda$  が関わっているかの検討。
- (2) PKC $\lambda$  が Rac1 の下流分子として作用するかの検討。
- (3) PKC $\lambda$  はどのような分子機序で精子幹細胞のホーミングを制御しているか、PKC $\lambda$  の下流分子を同定し、その機能を明らかにすること。

これまで、造血幹細胞ホーミングの分子機序については多くのグループにより研究が進められていた。しかしながら精子幹細胞については、適切な実験系が無かったためにあまり進展していない。本研究の特徴は、『精子幹細胞のホーミング』は申請者が世界に先駆けて新規に切り開いたテーマである点であり、申請者のグループが独自に開発した実験系を用いてホーミングに関与する分子の機能解析を行う点にオリジナリティーを有していたと考えている。

本研究から得られる成果は、造血幹細胞など他の幹細胞システムにも通ずる普遍的なホーミング分子機序の解明の突破口を開く研究になりうると考えていた。また本研究の成果は、精子幹細胞の移植効率改善に役立つため、精子幹細胞移植による男性不妊症の治

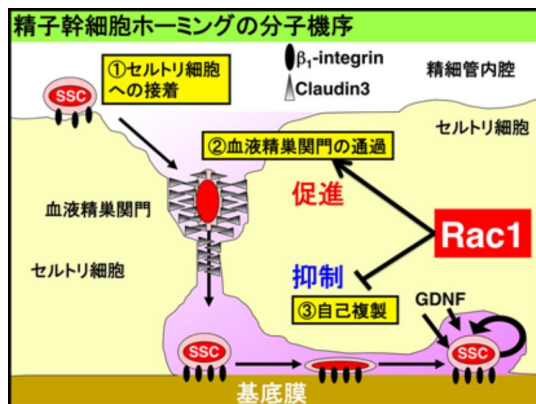


図1: 精子幹細胞ホーミングにおける Rac1及びClaudin3の役割

療法、希少動物や優良家畜の生殖能力保存法、遺伝子改変動物作製効率の改善など医療や産業への貢献が期待された。

### 3. 研究の方法

#### (1) aPKC 欠損精子幹細胞のホーミング能力解析

精子幹細胞ホーミングに PKC が関与するか否かを、PKC ノックアウト精巣細胞の移植アッセイにより検討した。

PKC ノックアウト精巣細胞は以下のように調製した。PKC<sup>flox/flox</sup> マウスと R26R マウス (Cre リコンビナーゼを作用させると lacZ 遺伝子を発現し、X-gal 染色で青染される) を掛け合わせた PKC<sup>flox/flox</sup>;R26R<sup>flox/+</sup> マウス (以後 PKC KO) 及び PKC<sup>+/+</sup>R26R<sup>flox/+</sup> (以後コントロール) マウスを作製した。生後 8~12 日齢の PKC KO 及びコントロールマウスより精巣細胞を調製、Cre を発現する AxCAN Cre アデノウイルスを感染させ、PKC 遺伝子破壊を行った。そして PKC KO / コントロール精巣細胞を成獣の WBB6F1-Kit<sup>W/W-v</sup> マウス (雄性不妊モデル、以後 W マウス) 精巣へ移植した。移植 60 日後に移植マウス精巣より精巣を摘出、移植された精子幹細胞によるコロニーを X-gal 染色によりカウントした。

上記のマウスに加え、PKC $\zeta$  遺伝子もノックアウトされた PKC $\lambda$  $\zeta$  ダブルノックアウトマウス (PKC<sup>flox/flox</sup>;PKC $\zeta$ <sup>-/-</sup>;R26R<sup>flox/+</sup>) も作製し、同様の実験を行った。

#### (2) 恒常活性化型 / 優勢抑制型 aPKC を強制発現した細胞のホーミング能力解析

aPKC の恒常活性化型 / ドミナントネガティブ型を強制発現させ、ホーミングにおける aPKC の役割を検証した。このために、EGFP トランスジェニックマウス由来の培養精子幹細胞 (Germline Stem cell: GS 細胞) に活性化型 PKC $\lambda$  (constitutive active PKC $\lambda$ : caPKC $\lambda$ ) / ドミナントネガティブ型 PKC $\lambda$  (dominant negative PKC $\lambda$ : dnPKC $\lambda$ ) を強制発現させた GS 細胞を作製した。遺伝子導入はレンチウイルスベクターを用い、Puromycin による薬剤選択にてトランスフェクタントを得た。同時に、同じベクターを用い EYFP を強制発現させた細胞も作製し、コントロール細胞として使用した。

得られた GS 細胞は W マウス精巣に移植し、3 ヶ月後にレシピエントを犠牲させ、精巣中のコロニー計数と病理切片作製による精子形成異常の有無の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) aPKC 欠損精子幹細胞のホーミング能力解析

PKC $\lambda$  欠損精子幹細胞を移植し形成されたコロニーの数はコントロールとの差がみられなかった。形成されたコロニーについて病理切片を作製し精子形成における異常の有無も解析したが、形態的な異常も認められなかった。

PKC $\zeta$  KO マウスは精子形成を含め、形質の以上はみられないことが既に報告されていた。しかし、ホーミングについては検証されていない、PKC $\lambda$  欠損を補完している可能性がある、という二つの可能性が考えられた。そこで次に、PKC $\lambda$ <sup>flox/flox</sup>;PKC $\zeta$ <sup>-/-</sup>;R26R マウスを作製し同様の検証を行った。しかしながら、このマウスの精子幹細胞もまたホーミングに関しては野生型と有意な差は認められなかった。

上記の移植アッセイにより形成された精子形成コロニーは形態的に正常であり、野生型と同様に精子形成が認められた。

#### (2) 恒常活性化型 / 優勢抑制型 aPKC を強制発現した細胞のホーミング能力解析

(1) の結果は aPKC がホーミングに関与しないことを強く示唆するものであったが、他の PKC 分子による補完の可能性を排除するものではない。そこで、内在性の aPKC 活性に対し抑制的に働くと期待される dnPKC $\lambda$  を強制発現させた GS 細胞を作製した。この細胞はコントロール GS 細胞と形態、増殖に関して差異は認められなかった。そこで、この細胞を W マウス精巣へ移植しホーミング能力を検討したところ、コントロールと有意な差は認められなかった。また、caPKC $\lambda$  を恒常的に発現する GS 細胞についても同様の検討を行ったが、こちらも有意な差は認められなかった。

dnPKC $\lambda$  あるいは caPKC $\lambda$  を発現する GS 細胞は移植するとコロニーを形成し、精子形成に関する異常も認められなかった。

密着結合分子が細胞表面に表出し正しく機能するには aPKC による細胞極性制御が必須であるという知見から本研究を着想した。しかしながら、本研究で用いた手法では、ホーミングにおける aPKC の機能を見いだすにはいたらなかった。

aPKC は細胞極性制御に関与する分子複合体の構成分子であるが、このほかの構成分子として Rac1, Cdc42, Par3, Par6 がある。MDCK 細胞等の上皮細胞では aPKC を含めたこれらの分子が細胞極性制御に働くことが示されている。しかし、上皮細胞とは形態的に大きく異なる精子幹細胞は、必ずしも細胞極性分子のすべてを必要としているわけではない

のかもしれない。今後は、未解析の構成分子 Cdc42, Par3, Par6 が精子幹細胞ホーミングへ関与するか否かを順次検証する予定である。

#### 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 1 件)

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Takashima, S., Takehashi, M., Ogonuki, N., Morimoto, H., Nagasawa, T., Ogura, A., Shinohara, T. (2012). "Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture", Cell Stem Cell, 11, 567-578. (査読有り、doi: 10.1016/j.stem.2012.06.011)

〔その他〕

ホームページ等

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.jUyUyayV.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高島 誠司 (TAKASHIMA, Seiji)

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：40396891