

## 研究課題別評価

1 研究課題名: ほ乳類の精子形成を支える幹細胞の究明

2 研究者氏名: 吉田松生

3 研究の狙い:

ほ乳類の精子形成においては、長期にわたり極めて多数の精子が産み出される。その一方で、精子は次の世代に遺伝情報を正確に伝達することが要求される。精子形成が品質を保ちながら高い生産性と継続性を実現することは、生物の存在に直結する大切な現象であり、本研究の究極の目標はこのメカニズムを明らかにすることである。

精子形成では、タネとなる「幹細胞」が自分自身を複製しながら精子になる細胞を産み出すと考えられている。しかし、精巣の中で幹細胞を同定しその性質や挙動を知することは、まったく不可能であった。それは、幹細胞が精巣細胞の約1万個に1個と非常に少ないと考えられる上に、特異的な遺伝子発現が知られていなかったことなどから、精巣中で幹細胞を見つける手段がないことが大きな理由であった。研究開始時点で研究者は、マウス精子形成において幹細胞を含むことが実験的に明らかにされている最も少数の細胞集団、「未分化型精原細胞」に特異的に発現する遺伝子として、ngn3 (neurogenin3)を同定していた。本研究では、この遺伝子を利用して、未分化型精原細胞をラベルし、その性質や挙動を調べることで、上記の目標にアプローチした。

4 研究成果

具体的な問題とそれに対するアプローチ、結果を記す。いずれも、未分化型精原細胞あるいは精子形成幹細胞についての新規の知見である。

1. ngn3 遺伝子の発現制御領域を用いて未分化型精原細胞を蛍光タンパク質 GFP でラベルしたトランスジェニックマウスを樹立した。1, 2, 4, 8, 16 個という、2 の n 乗個の細胞が細胞間橋で連結するのが観察された。これは、固定標本の観察から提唱されていた未分化型精原細胞の特徴に一致するもので、生きた組織で初めて可視化されたものである。(文献2)
2. 同様に ngn3 発現細胞に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを樹立、その細胞の子孫の運命を追跡し、成熟精巣で作られる精子の全てが ngn3 陽性細胞に由来することを明らかにした。(文献2)
3. tamoxifen 誘導性の Cre リコンビナーゼを特異的に発現させ、ngn3 陽性細胞をパルスラベルする実験系を確立した。その子孫細胞の追跡と移植により、幹細胞として機能することを明らかにした(文献1、発表準備中)。
4. GFP ラベル精原細胞を生きた精巣中で連続観察する実験系を開発し、長時間(数日間)の連続観察を可能にした。その結果未分化型精原細胞の以下のような挙動が明らかになった(投稿準備中)。1)精細管の中で、間質や血管に面した部分に好んで局在する。2)精細管周期に強く依存して、増殖と移動、細胞死をおこす。3)分裂や細胞死は、原則として、細胞間橋で連結したクローンを単位として起こる。4)連結したクローンがいくつかの断片に分かれてそれぞれ違う挙動をとる場合がある。5)分化段階が進み ngn3 の発現を失った精原細胞(分化型精原細胞)の一部が再び ngn3 の発現を回復する場合がある。これらの知見はいずれも、固定標本の観察からの推定の域を超えておらず謎に包まれていた未分化型精原細胞の挙動を直接的に明らかにしたものである。特に、1), 2)は、精子形成幹細胞がどこに局在するか、どのような微小環境(ニッチ)により維持されているかを明らかにする上で重要な情報である。更に、4), 5)は、連結していない単一細胞である As 精原細胞のみが精子形成幹細胞であるという、現在広く信じられているモデル(As モデ

ル)が必ずしも正しくなく、実際には精原細胞がいろいろな段階で可逆的なプールを作っている(clone fragmentation モデルや  $A_0A_1$  モデルに相当)ことを示唆しており、幹細胞システムの本質に関わる重要な知見と考える。

5. 精子形成の初期段階を詳細に検討し、生後最初の精子形成 (first wave spermatogenesis) では、ngn3 の発現を伴わない特別な分化プログラムによって精子が作られることを明らかにした(文献1)。この精子は正常な受精能を有しており、精子への分化には幹細胞のステップを経る必要がないことが示唆された。

#### 5 自己評価:

本研究は、生物学的には重要でありながらほとんど謎に包まれていた精子形成幹細胞システムを担う細胞を、具体的に目に見える形で同定しその挙動を観察することができた、という点で意義深いと考えている。実験技術としては、マウス個体を用いて日単位の連続観察を行う系は現在まで開発されておらず、オリジナリティーのある研究として評価されてよいと考える。研究開始時にこのようなことができたらいいなあと考えていた実験に挑戦し、個人的には細胞の挙動を楽しく観察することができた。しかし、連続観察の実験系にめどが立つまでに時間がかかり、研究期間中にその結果を論文という形で発表するに至らなかったことが反省される。早期に発表したい。また、研究開始時には、未分化型精原細胞を更に細かく分類して検討するための遺伝子の検索とそれを用いた解析を計画していたが、その進展は遅く、ようやく候補遺伝子を得た段階であることは残念である。この問題は今後も問われるべきものとして残されている。本研究期間の間に精子形成幹細胞研究においては、幹細胞の性質を維持した細胞が in vitro で培養できる系が確立されるという画期的な進展があった。本研究の成果はこれと相補的なもので、今後主に in vivo でユニークな貢献をしていく基盤となると考えている。

#### 6 研究総括の見解:

哺乳類(マウス)について、精子形成幹細胞の究明を目的として着実に研究を展開した。未分化型精原細胞を特異的に標識し、マウスの精巣を直接に生体連続観察しうる未踏の実験系を確立した。この系を活用して、clone fragmentation modelの根拠となりうる成果を挙げたことは高く評価できる。プロジェクトが着実に遂行されているので、成果の積極的公表が望まれる。

#### 7 主な論文等:

1. S. Yoshida, M. Sukeno, T. Nakagawa, K. Ohbo, D. Melton, T. Suda and Y-i. Nabeshima: Leading population of the mouse first wave spermatogenesis is generated by distinct program lacking the stem cell stage (投稿中)
2. S. Yoshida, A. Takakura, K. Ohbo, K. Abe, J. Wakabayashi, M. Yamamoto, T. Suda and Y-i. Nabeshima: Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Developmental Biology* 269, 447-458 (2004)
3. K. Ohbo, S. Yoshida, M. Ohmura, O. Ohneda, M. Ogawa, H. Tsuchiya, T. Kuwana, J. Kehler, K. Abe, H.R. Schöler and T. Suda: Identification and characterization of stem cells in pre-pubertal spermatogenesis in mice. *Developmental Biology* 258, 209-225 (2003)