

精子幹細胞増殖因子の新しい機能を発見 -ヒトの精子幹細胞の試験管内培養法の開発、男性不妊症の原因解明に期待-

研究成果の概要

精子幹細胞は未分化型精原細胞と呼ばれる未熟な生殖細胞の一部を占めており、男性の生涯にわたり精子を作り続ける幹細胞です。精子幹細胞の生存・増殖は、精子幹細胞の機能をサポートする精巣体細胞が産生するグリア細胞株由来神経栄養因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF) が、そしてその分化はビタミン A 誘導体であるレチノイン酸が担っていることが知られています。これに加え 2015 年、我々は京都大学・理化学研究所・名古屋大学と共同で、繊維芽細胞増殖因子 2 (Fibroblast growth factor 2; FGF2) が試験管内での精子幹細胞の増殖を促進することを見出しました。しかし、FGF2 が精巣内でも同様の機能を示すかは不明でした。

今回の研究では、FGF2 が精巣内でどのような機能を発揮するかを検証し、FGF2 は GDNF と同様、未分化型精原細胞の増殖を誘導するが、FGF2 により増殖した細胞は、より分化しやすい性質を有することを発見しました。さらに FGF2 は、GDNF と異なり、精子幹細胞の機能制御に参与する精巣内体細胞にも作用し、分化誘導因子であるレチノイン酸の作用を強める働きがあることも発見しました。

今回の研究成果は、精子幹細胞が精子を生み出す原理の理解に貢献するだけでなく、男性不妊症の原因解明やその治療法の開発にもつながると期待されます。

1. 背景

精子幹細胞は精巣のすべての細胞のおよそ 0.02-0.03% の割合で存在し、雄性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る役割を果たします。精巣内の体細胞”セルトリ細胞”により産生される GDNF は、精子幹細胞の生存と増殖を強力に促進します。加えてこの分子は、増殖誘導と同時に分化抑制作用を有すると考えられています。実際、精巣内における過剰な GDNF 刺激の入力は、未分化な生殖細胞の腫瘍であるセミノーマのような病態を招くことが確認されています。

京都大学の篠原隆司教授らのグループは、この GDNF の強力な増殖・分化抑制作用を利用し、マウスの精子幹細胞の長期培養法を確立しました。この細胞は Germline Stem cells (GS 細胞) と名付けられており、試験管内で 2 年間以上の長期にわたり増殖させることができます。さらにこの細胞は、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示し、子孫も作製することができます。この GS 細胞培養技術は、不妊治療や遺伝子治療に加え、経済家畜の育種やヒト疾患モデル動物の作出、あるいは絶滅危惧種の保護など、様々な分野で多岐にわたる貢献が期待されています。

私たちは 2015 年、京都大学、名古屋大学、理化学研究所と共同で、FGF2 が精子幹細胞増殖因子として機能しうることを証明しました。この研究では、GDNF 非存在下、FGF2 刺激により培養された GS 細胞は精子幹細胞としての機能を維持しつつ長期間培養増殖させることが可能であることを確認しましたが、FGF2 が生体内でも同じ機能を担うのか、については検証ができていませんでした。

2. 研究手法

我々は今回、マウスの精巣内に直接 FGF2 (あるいは GDNF) による強力な刺激を入力し、生体内の未分化型精原細胞 (精子幹細胞を含む細胞集団) が増殖するか、そしてどのような性質を示すかを検証しました。この際我々は、精巣内での FGF2 の機能を調べるために、ドラッグデリバリーシステムと呼ばれる手法を用いました。この方法は、高分子材料でできた担体に物質を含ませて体内に投与し、担体から徐々に物質を放出させることで、物質の効果を長期間にわたって観察できる、というものです。今回は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の田畑泰彦先生が開発した、ゼラチンを原料としたシステムを用いました。水溶液に溶け込んだ FGF2 や GDNF を直接体内に注入すると、速やかに拡散するため、細胞に持続的な刺激を入力することはできません。しかし、このシステムを用いる

ことで、精子幹細胞を含む未分化型精原細胞と呼ばれる細胞集団を選択的に増殖させることに成功しました。

3. 成果

FGF2、あるいは GDNF を投与すると、精巣内の未分化型精原細胞が増殖することが確認されました。また、FGF2 により増殖した未分化型精原細胞と、GDNF により増殖したものでは、増殖細胞により形成されるコロニーの形が異なること見出されました。これは以前の我々の研究成果と一致するものでした。

細胞やコロニーの形が異なることから、増殖してきた細胞の性質も異なる可能性があると考えられました。実際、蛍光免疫染色という手法で、これらの細胞におけるレチノイン酸受容体 RARG の発現を調べると、FGF2 により増殖した未分化型精原細胞は、GDNF により増殖した細胞と比較し、RARG を発現する細胞の頻度が2倍高いことがわかりました。つまり、同じ精子幹細胞の増殖因子でも、GDNF と FGF2 では増殖してくる細胞の性質が異なることとなります。そしてレチノイン酸は未分化型精原細胞の分化を誘導することを考えると、FGF2 は未分化型精原細胞の中でもより分化しやすい集団を増殖させていると考えられます。

一方、精巣内体細胞は未分化型精原細胞をはじめとする生殖細胞の機能制御を行う重要な細胞であることが知られており、これらの細胞に対する FGF2 の影響も合わせて検証しました。結果、FGF2 刺激を入力すると、精巣内体細胞において、レチノイン酸分解に関与する遺伝子 *Cyp26b1* の発現抑制が見られました。このことは、FGF2 刺激がレチノイン酸分解を遅らせることで、その精巣内活性を維持させる働きがあることが示唆されました。

これらの結果から『FGF2 は GDNF と異なり、より分化しやすいタイプの細胞を増殖させる』『FGF2 は GDNF と異なり、精巣体細胞にも作用することで、レチノイン酸活性の持続性を高めて分化を促進する』ということがわかりました。FGF2 と GDNF は共に、試験管内の精子幹細胞を増殖させる活性を有しているにもかかわらず、FGF2 は精巣内においては分化を促進するという逆の機能を有する、という意外な性質が示されたのです。

本研究は立花誠 徳島大学教授、田畑泰彦 京都大学ウイルス・再生医科学研究所教授、保科和夫、藤森祐紀 長野県畜産試験場職員、天野俊康 長野日本赤十字病院泌尿器科部長、塩沢丹里、石塚修 信州大学医学部教授、保地眞一 信州大学繊維学部教授らとの共同研究により行われました。

4. 波及効果

精子幹細胞の自己複製と分化のバランスは、精子形成とその継続性に大きな影響を与えます。従来、GDNF が自己複製、レチノイン酸が分化を誘導し、その2つの因子の単純なせめぎあいの結果、男性の生涯の長期にわたる精子形成が実現されていると考えられていました。しかし、今回研究から、FGF2 が『分化しやすい細胞の誘導』『分化誘導因子の活性持続』という機能を介し、分化を促進する可能性が示されました。精子形成の持続性を左右する第三の役者が現れた、と言えます。今回の報告では、FGF2 がハツカネズミだけでなく、ドブネズミ・ウシ・ブタ・ヒトの精巣でも産生されていることを確認しています。つまり、ヒトはじめとした様々な哺乳類の精巣でも、FGF2 が同様の機能を果たしていると推察されます。

加齢やストレスにより精子幹細胞の数や機能が低下することはよく知られていますが、その原理は未だ不明です。今回、FGF2 は未分化型精原細胞の分化を促進する可能性が示唆されました。FGF2 はもともと細胞増殖・組織再生因子として知られ、様々な組織で再生を促進する働きがあります。ただ、精巣においては、発揮される機能の都合上、分化を促進する方向に働いてしまい、結果として精子幹細胞の消耗・喪失を招いてしまうのかもしれない。実は、老化した骨格筋では FGF2 が大量に生産され、それが原因で骨格筋幹細胞の数が減少してしまうことが知られています。精巣の機能低下や老化も、もしかすると FGF2 の誤作動が原因である可能性も考えられ、今後追求すべき課題の一つだと考えています。

一方、FGF2 は必ずしも精子幹細胞そのものにとって悪い因子ではありません。実際、マウス GS 細

胞の試験管内培養において、FGF2 はその増殖を強く促進します。現在、培養可能かつ子孫作製もできる GS 細胞はマウス、ラット、ハムスターなどげっ歯類からしか樹立されていません。FGF2 は他の哺乳類あるいは動物種からの GS 細胞樹立にも有用であると考えられます。

また、今回研究で使用したドラッグデリバリーシステムは、増殖因子の持続投与による再生誘導に有効であることが知られており、実際今回研究でも、未分化型精子幹細胞を精巣内で人為的に増やすことができることを実験動物レベルではありますが、実証しております。この手法には主に生体高分子を基盤とした担体が用いられます。本学では生体適合性が高いシルクを材料とした生体制御材料の開発が進められています。今回のようなドラッグデリバリーシステムにもそのような繊維材料を用いることで、生体になじみやすくより安全性の高いシステムが構築できると期待されます。

5. 本研究について

本研究は、日本学術振興会、住友財団、内藤記念科学振興財団、伊藤記念財団、ホクト生物科学振興財団、ひと・健康・未来研究財団、持田記念医学薬学振興財団、金原一郎記念医学医療振興財団、上原記念財団、鈴木謙三記念医科学応用研究財団、武田科学振興財団、及び長野県科学振興会の支援を受け遂行されました。

6. 論文タイトル・著者の情報

本研究成果は、米国科学誌「Stem Cell Reports」の6月号への掲載に先立ち、2018年4月19日正午(米国東部時間)にオンライン掲載されます。

タイトル： FGF2 has distinct molecular functions from GDNF in the mouse germline niche

(精子幹細胞自己複製因子 FGF2 は、精巣内において、もう一つの自己複製因子 GDNF と異なる機能を示す)

著者： Kaito Masaki^{1,a}, Mizuki Sakai^{2,a}, Shunsuke Kuroki³, Jun-ichiro Jo⁴, Kazuo Hoshina⁵, Yuki Fujimori⁵, Kenji Oka⁶, Toshiyasu Amano⁷, Takahiro Yamanaka¹, Makoto Tachibana³, Yasuhiko Tabata⁴, Tanri Shiozawa⁶, Osamu Ishizuka⁸, Shinichi Hochi^{1,2}, and Seiji Takashima^{1,2,a,b}

¹ 信州大学大学院総合理工学研究科繊維学専攻, ² 信州大学繊維学部応用生物科学科, ³ 徳島大学徳島大学先端酵素学研究所, ⁴ 京都大学ウイルス・再生医科学研究所, ⁵ 長野県畜産試験場, ⁶ 信州大学医学部産婦人科学教室, ⁷ 長野日本赤十字病院泌尿器科, ⁸ 信州大学医学部泌尿器科学教室

^a 共同第一著者, ^b 責任著者

7. 注意事項

この発表については、情報解禁日が『米国東部時間 2018年4月19日正午』と指定されています。新聞の場合、日本時間の平成30年4月20日(金曜)の朝刊、その他の情報媒体の場合は平成30年4月20日(金曜)午前1時までは発表を控えていただきますようお願いいたします。ご協力のほど何卒よろしくお願いたします。

8. お問い合わせ先

本件の責任者： 高島 誠司 (信州大学繊維学部応用生物科学科 テニユアトラック助教)

勤務場所の住所： 上田市常田 3-15-1 信州大学上田キャンパス O棟 2階

TEL & FAX: 0268-21-5344 携帯番号 090-4438-4050

e-mail: stakashi@shinshu-u.ac.jp