

第10回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

精原幹細胞の増殖を調節する因子

久保田 浩司

北里大学獣医学部 動物資源科学科 細胞工学研究室

はじめに

精子形成は精巣において性成熟後の雄個体の生涯を通じて行われるが、その源となる細胞が精原幹細胞である。精原幹細胞は精子細胞へ分化することが決定した精原細胞を産生するとともに、幹細胞自らを自己複製することによって、非常に生産的な精子産生を維持している。成体の卵巣において恒常的に自己複製するような生殖幹細胞の存在は確認されていないため、精原幹細胞は哺乳類の成体に存在する唯一の生殖幹細胞である。換言すれば、成体の様々な組織に存在する幹細胞のなかで唯一、遺伝情報を次世代に伝えることができる能力を持つ幹細胞と言える。1994年にBrinsterらのグループが精原幹細胞の分化能と自己複製能をアッセイする実験系をマウスを用いて開発することによって、精原幹細胞はその機能によって同定可能となった(1)。Brinsterらが開発した精原幹細胞の存在を直接証明する機能アッセイとは、精子形成が行われていない不妊マウスの精巣の精細管内に幹細胞を含むドナー精巣細胞を移植し、ドナー由来の精子形成をみるという方法である。自己複製しない精原細胞は一過性の精子形成を行うだけだが、精原幹細胞は精細管内に定着し、その後自己複製しながら恒常的な精子形成をその個体の生涯を通じて維持する。LacZやGFPなどのレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウス由来のドナー細胞を用いた場合、一幹細胞由来の精子形成コロニーが実体顕微鏡下で同定可能であるため、注入された細胞浮遊液内にいくつの精原幹細胞が含まれていたかを定量的に測定できる。こうして、精原幹細胞の機能アッセイ系は確立された。成体マウ

スの精巣における精原幹細胞の数は、精巣細胞全体のおよそ0.03%と非常に少ないにもかかわらず、このアッセイ系を用いることにより、精原幹細胞をその生物学的機能を指標にして同定することが可能となり、精原幹細胞の性状解析が大きく進んだ(1)。しかしながら、精原幹細胞の生物学的機能を分子レベルで明らかにしたり、その特性を活用した有効な応用技術、たとえば遺伝子操作動物の作成など、を開発する上で*in vitro*の培養系の確立はきわめて重要である。精原幹細胞のユニークな性質は、マウスをはじめとする実験動物のみならず、ヒトや産業動物、あるいは野生動物においても同様に計り知れない価値がある。そこで今回、様々な動物由来の精原幹細胞の培養系を将来的に確立することを視野に入れた汎用性のある精原幹細胞の培養系をマウスをモデルとして用いて確立したので紹介したい(2, 3)。

精原幹細胞の増殖を促す外因性因子

幹細胞を増殖させるための培養系の確立には、幹細胞の自己複製を促す外因性因子を同定することが最も重要である。*in vivo*の実験から、雄生殖細胞の支持細胞であるセルトリ細胞が産生しているGlial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)がマウス精原幹細胞の自己複製を促す増殖因子であることを強く示唆する報告がされていたが(4)、GDNFが*in vitro*においても精原幹細胞の増殖因子として作用するのかどうかは不明であった。血清を含む培養液を用いたマウス精原幹細胞の短期培養において、GDNFが精原幹細胞の増殖を幾分サポートするという報告(5)や、特定のマウスの系統(DBA/2やICR)

で可能となった精原幹細胞の長期培養系に用いられる増殖因子のカクテルの中に GDNF が含まれていること (6) などから、GDNF が *in vitro* の精原幹細胞の増殖に何らかの作用を持つと考えられていた。

マウスの精原幹細胞の *in vitro* における増殖因子を決定するために、我々は独自に培養系から不確定因子を最小限に抑えた無血清培養系を確立した (2)。その培養系は、構成成分が規定され、かつ添加物を最小限にとどめた無血清培地、濃縮した精原幹細胞、そして樹立された細胞株 (マウス繊維芽細胞株 STO 細胞) から調整された均一のフィーダー細胞からなる。DBA/2 マウス由来の精原幹細胞をその無血清培養系にて培養すると、GDNF の単独刺激により幹細胞活性を失うことなく増殖し続けることが明らかとなった (3)。この結果は、少なくとも DBA/2 マウス精原幹細胞の自己複製と増殖において、GDNF が中心的役割を果たしていることを明確に示している。また、すでに *in vivo* で示された GDNF の重要性を裏付ける結果であり、確立された培養系が生体内の生理的環境、あるいは幹細胞ニッチを反映していることを示している。

GDNF が細胞を刺激する機序は、まず GDNF が GPI 膜結合タンパクの GDNF family receptor $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$) と結合し、次にその GDNF/GFR $\alpha 1$ 複合体がチロシンキナーゼ受容体である c-Ret と会合して活性化することによる。興味深いことに、C57BL/6 や 129 系統のマウスでは、GDNF に加え分泌型 GFR $\alpha 1$ と低濃度 (1 $\mu\text{g/ml}$) の bFGF が、*in vitro* での精原幹細胞の増殖に必要であることがわかった (3)。分泌型 GFR $\alpha 1$ は GDNF と結合し、そのシグナル伝達分子であるチロシンキナーゼ受容体 c-Ret をトランスに刺激すると考えられる。分泌型 GFR $\alpha 1$ によって GDNF による c-Ret の活性化が増強されるという報告がなされているので、分泌型 GFR $\alpha 1$ の添加によって *in vitro* における精原幹細胞の GDNF による活性化も増強されていると考えられた。また、Basic fibroblast growth factor (bFGF or FGF2) は GDNF 依存性の増殖を強力にサポートした。GDNF、分泌型 GFR $\alpha 1$ 、bFGF を用いた培養条件においてこれまで試みたすべてのマウスの系統において精原幹細胞の長期増殖が可能であることが確認され、さらに培養した精原幹細胞由来の精子から正常の仔マウスが生

まれることも確認した (3)。

これまで様々な動物種の精巣細胞が免疫不全マウスの精細管内に移植されたが、ほとんどの動物種でその未分化精原細胞がレシビエントマウスの精細管に定着し数ヶ月にわたって維持された (1)。このことは少なくとも精原幹細胞を含む未分化精原細胞の増殖因子あるいは生存因子は種を超えて保存されている可能性が高いことを示している。ヒトにおいて、機能獲得型突然変異をもつ FGF 受容体 (Fibroblast growth factor receptor 2: FGFR2) を発現した精原幹細胞が、精巣内で選択的に増殖している可能性を示唆する報告がなされている (7)。さらに FGFR3 や c-Ret の機能獲得型突然変異も同様な選択に関与していることも示唆されている。これは GDNF とともに、bFGF、あるいはそのファミリー分子が種を超えて共通の精原幹細胞の増殖促進因子である可能性があり興味深い。実際、同様の増殖因子の組み合わせ (GDNF、分泌型 GFR $\alpha 1$ 、bFGF) により、ラットの精原幹細胞も *in vitro* で増殖可能であった (8)。

精原幹細胞の自己複製と分化を調節する転写制御因子

GDNF が c-Ret の活性化を介してマウス精原幹細胞の自己複製を促していると考えられるが、その機序はほとんどわかっていない。上記のマウス精原幹細胞の無血清培養系を用いて、GDNF 刺激によって発現が変動する遺伝子群が DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析された (9)。その結果、POZ/BTB を有する転写抑制因子 Bcl6b (B cell CLL/lymphoma 6 member B)、LIM ホメオボックス転写因子 Lhx1、Ets 転写因子 ERM などの転写が GDNF 刺激によって誘導されることが分かった。これら GDNF 刺激によって発現が誘導される転写制御分子の発現は *in vitro* での GDNF 依存性の精原幹細胞の増殖、あるいは生存に必須であることが示された (10)。今後、こうした GDNF 刺激によって誘導される分子が精原幹細胞の自己複製を維持のためのマスター因子として働くのか、あるいは補助的に作用するのかを明らかにしていくことが重要と思われる。

GDNF による自己複製や増殖機構のメカニズムの研究は精力的に進められている一方で、bFGF がどのように精原幹細胞の自己複製に関わっているのか

は、現時点ではほとんど分かっていない。精原幹細胞の運命決定などの細胞内イベントの解明のためには、bFGF/FGFRsによって制御される分子群の同定も必要となろう。

おわりに

今回紹介したマウス精原幹細胞の無血清培養系は、単に *in vitro* で精原幹細胞を増やすだけでなく、精原幹細胞の自己複製の機序を分子レベルで明らかにするための有用な実験基盤を築いた。さらに、この培養系を用いた精原幹細胞の *in vitro* コロニーアッセイ系の報告もなされており (11)、今後様々な応用が期待できる。ラットの精原幹細胞の自己複製に必要な増殖因子が、マウスと同様であったということと共に、マウス精原幹細胞の培養系を確立するアプローチを用いて、ラット精原幹細胞の培養にも成功したことは重要である (8)。同様のアプローチが今後、他の動物種の精原幹細胞の培養系の確立においても応用できるのではないかと考えられるからである。精原幹細胞の医療や生命科学分野での利用を考えた場合、ヒトを含む様々な動物の精原幹細胞の長期培養系の確立は、その有用性と照らし合わせてみると極めて重要な課題である (12, 13)。そのためには *in vitro* において自己複製を促すために中心的役割を示す因子を一つ一つ明らかにしていき、自己複製を維持するマスター機構を解明することが鍵となろう。

文献

- 1) Brinster RL: Science (2002) 296, 2174-2176.
- 2) Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL: Biol Reprod (2004) 71, 722-731.
- 3) Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL: Proc Natl Acad Sci U S A (2003) 100, 6487-6492.
- 4) Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H: Science (2000) 287, 1489-1493.
- 5) Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL: Biol Reprod (2003) 68, 2207-2214.
- 6) Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T: Biol Reprod (2003) 69, 612-616.
- 7) Goriely A, McVean GA, Röjmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AO: Science (2003) 301, 643-646.
- 8) Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL: Proc Natl Acad Sci U S A (2005) Oct 4; 102(40):14302-14307.
- 9) Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL: Proc Natl Acad Sci U S A (2006) 103, 9524-9529.
- 10) Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL: J Biol Chem (2007) 282, 25842-25851.
- 11) Yeh JR, Zhang X, Nagano MC: Biol Reprod (2007) 77, 897-904.
- 12) Kubota H, Brinster RL: Nat Clin Pract Endocrinol Metab (2006) 2, 99-108.
- 13) Brinster RL: Science (2007) 316, 404-405.