

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: 精子幹細胞の運命可塑性を利用した移植効率向上の試み

Harnessing spermatogonial stem cell flexibility to increase transplantation efficiency

研究開発実施期間: 令和2年9月16日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: 吉田 松生

YOSHIDA, Shosei

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

基礎生物学研究所 生殖細胞研究部門 教授

Professor,

Department of Germ Cell Biology,

National Institute for Basic Biology,

National Institutes of Natural Sciences

II 研究開発の概要

研究開発の要約：本研究開発課題は、哺乳類の精子幹細胞移植の効率を飛躍的に向上させることを目的として遂行された。そのために、以下の研究開発を行った。第一に、精子形成を支える幹細胞集団の遺伝子発現の不均一性を明らかにし、各亜集団の運命動態とそれを制御する分子メカニズムの解明を進めた。第二に、マウス精子幹細胞を移植した時のドナー幹細胞の運命を制御し、移植効率を向上させることで、当該技術の実用化に近づけた。第三に、ヒトとマウスの精子幹細胞集団の共通点と種特異性の解析を進めた。本課題は日英の国際共同研究の枠組みで遂行され、マウス個体を用いた精子幹細胞の動態研究を行ってきた研究開発代表者（吉田；日本側 PI）と、生物物理学者であり組織幹細胞動態研究のリーダーである Benjamin Simons(英国側 PI; Cambridge 大)、ヒト精子幹細胞動態研究で顕著な業績を挙げている Anne Goriely (英国側 co-PI; Oxford 大)がチームを構成し、相補的かつ相乗的に研究開発を進めた。その結果、①マウス精子幹細胞の不均一性と動態を詳細に解明し、移植後の再構成とホメオスタシスに共通の動作原理が存在することを見出した。②その成果に基づき、薬剤を用いて移植後の精子幹細胞の分化を一時的に抑制することによって、移植効率を顕著に向上させることに成功した。③ヒトとマウスの精子幹細胞集団の構成を情報学的に比較し、マウスには見られないヒト精子幹細胞の特徴を見出した。

研究開発の背景：ヒトを含むほ乳類の精巣では、精子幹細胞の働きによって多数の精子が継続的に作られ、幹細胞の障害は男性不妊に至る。1994年 Brinster らによって、マウス精子幹細胞移植法が開発された。すなわち、精子幹細胞を含む細胞懸濁液（精巣から調整した懸濁液など）を、生殖細胞を除去したホスト精巣に移植すると、ドナーの幹細胞が生着してコロニーを形成し、精子形成を再構成する。この技術は高いポテンシャルをもち、悪性腫瘍患児の治療後の妊性回復や、絶滅危惧種の保全など広範な応用が期待されている。しかし、もっとも研究が進んでいるマウスにおいても、現状の移植効率が低く上記のような実用には距離があった。また本技術は、精巣の構造（および、おそらくは精子幹細胞の基本的な性質）を共有する他の分類群（哺乳類のほか、鳥類、爬虫類）においても精力的に試みられている。具体的には、ヒトへの応用を視野に霊長類を用いた研究、有用産業動物の遺伝資源の保全と個体複製を視野に家畜・家禽を用いた研究、絶滅危惧種保全を視野に多彩な動物を用いた研究などである。しかし、その移植効率は現時点では低く、実用にはいまだ遠いと言わざるを得ない。そこで、精子幹細胞の移植効率を上昇させること、人を含むマウス以外の動物に展開することを目指した。

研究開発の内容と成果①マウス精子幹細胞の動態の詳細な解析：マウス成体精巣より、幹細胞として機能する未分化型精原細胞をセルソーティングによって高度に純化し、シングルセル遺伝子発現解析を行い、定常状態における未分化型精原細胞の高解像度トランスクリプトーム地図を作成した。ここから情報学的に推定された幹細胞亜集団間の状態転換は、並行した遂行した特定の遺伝子発現に注目した細胞状態の記載と、タモキシフェン依存的 Cre リコンビナーゼ(CRE-ER)システムを用いたパルス標識による細胞運命の追跡の結果と一致した (Nakagawa et al., Cell Reports 2021)。さらに、パルス標識とシングルセル遺伝子発現解析を組み合わせ、各状態間の転換の動態とそこで機能する遺伝子パスウェイをさらに追求し、人為的操作の対象の候補を得た。また、移植後の精子幹細胞のクローン動態を詳細に調べ、定常状態における動態と比較した。前者では幹細胞数が増加するのに対して後者では一定の範囲内で安定するという重要な違いがあるが、我々が以前から構築してきた定常状態の幹細胞動態を記載する数理モデルのパラメータと初期条件を変えることで、移植後の動態をも共通して記載できることが明らかとなった(Nakamura et al., Cell Stem Cell 2021)。従来、定常状態と移植後では異なる細胞画

分が、異なる細胞運命挙動をとると考えられてきたが、両者を共通の原理で理解できる可能性を示したことは意義深い。

研究開発の内容と成果②精子幹細胞移植の効率の向上：移植後の幹細胞動態の解析の結果、移植直後には多数の幹細胞が生着するが、ランダムに細胞分化や細胞死を行う結果、それらに由来するクローンの大部分が消滅し、ごく一部のみが長期に持続するコロニーを形成することがわかった。この知見から、移植後にクローンの多くが消滅する時期に幹細胞の分化を一時的に抑制すれば、クローンの喪失が抑制され、長期の移植効率が向上するのではないかと想起した。そこで、幹細胞（未分化型精原細胞）が不可逆的に分化する時に必須なレチノイン酸シグナルを、レチノイン酸合成酵素の阻害剤（WIN18,446）を投与することで一時的に阻害した。その結果、より多くの幹細胞が未分化状態で残存し、長期の移植効率（精子形成の再構成効率）は5-10倍向上した。さらに、通常では効率が低いために自然交配では産仔が得られない条件でWIN18,446を投与すると、ホスト精巣の顕著に広い領域で精子形成が再構成され、自然交配により健康で妊孕性のある次世代が得られた（Nakamura et al., Cell Stem Cell 2021）。この知見は、通常の移植において精子形成を再構成しない幹細胞（再構成する幹細胞は、このわずか数十分の一）も、再構成ポテンシャルを同様に有していること、それらを再構成する幹細胞プールに動員することが可能であることを示す。WIN18,446による効率の向上が5-10倍であることから、潜在的にはさらに数倍程度の向上が期待できる可能性が残されている。成果①で得られた知見を元に、さらなる向上が可能かの検討もおこなった。

研究開発の内容と成果③ヒトとマウスの精子幹細胞集団の比較：ヒト精子幹細胞の動態についての研究は、試料へのアクセスが困難であることに加えて、細胞運命追跡が不可能であることが大きな制限となっている。しかし近年、シングルセル遺伝子発現解析と、その結果の情報学的解析技術の発展により、ヒト精子幹細胞研究は一気に加速している。本課題では、主に情報学的な手法を用いて、ヒト精子幹細胞集団とその動態を解析（推定）し、マウスのそれと比較した。本課題の終了時までには、様々な年齢のヒト精巣細胞のシングルセル遺伝子発現解析が多数報告されたが、精巣の中で精子幹細胞を含む精原細胞の割合が少ないために、個々のデータから精原細胞の亜集団構成を正確に解析することは困難であった。そこで、情報学的に多数のヒト精巣細胞データを統合して、十分な数の精原細胞を含むシングルセル遺伝子発現アトラスを作成した。そこに、マウスなど他の動物種のデータを投影することで、種間比較を実現した。その結果、ヒトや霊長類、家畜などの大型動物には存在するが、マウスやラットには存在しない精原細胞集団が明らかとなった（未発表）。この細胞集団と、寿命すなわち生殖期間の長さに関わっている可能性が想起される、興味深い知見である。

今後の展望：本研究開発の成果は、上記に加えて幾つかの波及効果をもたらすと期待される。第一に、組織幹細胞生物学一般に対する波及効果である。具体的には、定常状態（ホメオスタシス）とは異なるモードにあると解釈されてきた組織再生プロセスの理解が進み、共通の支配原理が存在することを示唆したことにより、「(組織) 幹細胞」の概念をより一般化することが期待される。第二に、ヒトを含む他の生物種における精子幹細胞移植効率の向上が期待される。そのためには、精子幹細胞システムの種による共通点と相違点に基づいた幹細胞運命の人為的制御に繋げる必要があり、本課題ではその基盤となる知見を得ることができた。ヒト精子形成幹細胞の再生機能への洞察が深まることが、精子幹細胞移植と共に、残存する精子幹細胞からの再生を促す新たな戦略につながると期待される。

Summary of Research: The following projects were developed to improve the efficiency of mammalian sperm stem cell transplantation. First, we elucidated individual subpopulations of the sperm stem cells and studied each subpopulation's fate dynamics and regulatory mechanisms. Second, we controlled the fate of mouse sperm stem cells after transplantation and improved transplantation efficiency, bringing this technology closer to practical application. Third, we analyzed the commonalities and species-specificities of human and mouse sperm stem cell populations. An international collaboration between Yoshida (Japanese PI; mouse developmental biologist), Benjamin Simons (UK PI; a biophysicist at Cambridge University), and Anne Goriely (UK co-PI; Oxford University, a human sperm stem cell research expert) was formed to these aims. As a result, 1) we clarified the heterogeneity and dynamics of mouse sperm stem cells in detail and found a common operating principle in their behavior. 2) We improved transplantation efficiency by suppressing the donor stem cells' differentiation using drugs. 3) By comparative informatics analysis, we found characteristics of the human sperm stem cell population that is not found in that of mice.

Background: The testes of mammals, including humans, continuously produce a large number of sperm through the function of sperm stem cells. In 1994, Brinster et al. developed a mouse sperm stem cell transplantation technique, which has a high potential for a wide range of applications, including fertility restoration after treatment of children with malignant tumors and conservation and restoration of endangered species. However, the low transplantation efficiency of sperm stem cells, even in mice, has limited their practical use. Therefore, this project was undertaken to increase the transplantation efficiency of sperm stem cells and to expand the use of sperm stem cells to animals other than mice, including humans.

Results 1) Mouse sperm stem cell dynamics: Undifferentiated spermatogonia functioning as stem cells in adult mice were purified and subjected to single-cell gene expression analysis to generate a high-resolution transcriptomic map. The stem cell state transition inferred informatically from these data was consistent with the results of cell state and pulse labeling cell fate tracking experiments that emphasized specific gene expression (Nakagawa et al., Cell Reports 2021). In addition, pulse labeling and single-cell gene expression analysis were combined to explore further the dynamics of conversion between each state and the gene pathways that function there. We also analyzed the clonal dynamics of sperm stem cells after transplantation and found that they can be commonly described by the mathematical model of steady-state stem cell dynamics we had established (Nakamura et al., Cell Stem Cell 2021).

Results 2) Improvement of transplantation efficiency: Although many stem cells settled immediately after transplantation, through random differentiation and cell death, the majority of donor clones disappeared, with only a tiny fraction of clones forming long-term colonies. This suggested that temporary inhibition of differentiation, when most clones disappear, may suppress clonal loss and improve transplantation efficiency. When the differentiation of stem cells (undifferentiated spermatogonia) was temporarily inhibited by an inhibitor of retinoic acid synthase (WIN18,446), many stem cells remained undifferentiated, and the long-term transplantation efficiency (reconstitution efficiency of spermatogenesis) was improved by 5-10 fold (Nakamura et al., Cell Stem Cell Stem Cell 2021).

Results 3) Comparison of human and mouse sperm stem cells: In recent years, with the development of single-cell gene expression analysis, human sperm stem cell research has accelerated drastically; single-cell gene expression analysis of human testicular cells of various ages has been reported. Therefore, we integrated many human testicular cell data by informatics to create a single-cell gene expression atlas containing a sufficient number of spermatogonial cells. Data from other animal species, such as mice, were projected onto it to achieve interspecies comparisons. As a result, spermatogonial populations that exist in large animals, such as humans, primates, and domestic animals, but not in mice and rats were identified (unpublished).