

氏 名 伊神 香菜子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1805 号

学位授与の日付 平成27年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 レチノイン酸応答性の異なる幹細胞集団が恒常的なマウス精子形成を保證する

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 吉田 松生
准教授 田中 実
教授 林 克彦 九州大学大学院

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

The integrity of tissue homeostasis is supported by stem cells that are capable of both maintaining undifferentiated cells and generating differentiated cell type(s). In some tissues, like mammalian intestinal crypts, stem cells cluster in an anatomically specialized (“closed”) niche that determines the stem cell fates. In these “closed” niche-supported systems, cells located within the niche will be maintained in an undifferentiated state, and their displacement from the niche leads to differentiation. In mouse testis, in contrast, spermatogenic stem cells appear to be distributed over the basal compartment and intermingled with differentiating progeny, representing “open” niche-supported stem cell systems. Here, the mechanism controlling the balances generation of undifferentiated cells and the differentiating cells are largely unknown. In this study, I propose a novel mechanism that allocates these different stem cell fates under an open niche environment.

In mice, the vast majority of spermatogenic stem cell activity resides in a small primitive subset, called “undifferentiated spermatogonia” (A_{undiff}). A_{undiff} population is found to persist in seminiferous tubules. Whereas, A_{undiff} produce the differentiating $KIT^+ A_1$ spermatogonia triggered by the periodical elevation of retinoic acid (RA). In accordance with this, when mice are made deficient for Vitamin A (VA), the precursor of RA, spermatogenesis is affected by the inhibition of $A_{undiff} \rightarrow A_1$ differentiation. When VA is added back to VA-deficient (VAD) animals, this process and subsequent spermatogenesis resumes. However, all of A_{undiff} do not differentiate, but some A_{undiff} always remain undifferentiated when tissue RA level increases. Although this is extremely important for the long-term maintenance of the stem cells and the integrity of spermatogenesis, the underlying mechanism has been largely unknown. In this study, I questioned the mechanism that determines whether each A_{undiff} differentiate or not in response to RA.

Since A_{undiff} is composed of $GFR\alpha 1^+$ and $NGN3^+$ spermatogonia, I challenged this question by examining the response of $GFR\alpha 1^+$ and $NGN3^+$ population to RA. First I investigated the kinetics of $Gfra1^+$, $Ngn3^+$ and Kit^+ cells after VA administration in VAD mouse by *in situ* hybridization. When VA was replaced, Kit^+ spermatogonia appeared and the number of $Ngn3^+$ cells was decreased. However, the number of $Gfra1^+$ cells remained unchanged. This prompted me to raise a working hypothesis that $NGN3^+$ cells differentiate in respond to RA but $GFR\alpha 1^+$ cells do not differentiate.

Then, I examined the fate of each subpopulation of A_{undiff} spermatogonia in the VAD model using Cre-loxP based pulse-labeling system. I first pulse-labeled the $NGN3^+$ cells using *Ngn3-CreERTM;CAG-CAT-EGFP* mice. In particular, $NGN3^+$

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

spermatogonia were irreversibly labeled with GFP by a single pulse of 4OH-tamoxifen (TM). After VA administration, almost all the GFP-labeled cells became KIT⁺ in 4 days. Then, I investigated the response of GFR α 1⁺ spermatogonia to RA using *Gfra1-CreER^{T2};CAG-CAT-EGFP* mice, and found that a constant number of cells remained to be GFR α 1⁺, following VA re-administration. Moreover, I discovered that the pulse-labeled GFR α 1⁺ cells proliferated and generate NGN3⁺ cells under the continuous VAD situation.

Next, I sought to identify the mechanisms that cause the differential RA responses between GFR α 1⁺ and NGN3⁺ spermatogonia. For this purpose, DNA microarray analysis was performed using sorted fractions of GFR α 1⁺ and NGN3⁺ spermatogonia. It was found that *Retinoic acid receptor gamma (Rarg)* was preferentially expressed in NGN3⁺ cells. To address the significance of the differential expression of RAR γ , I generated *Gfra1-CreER^{T2};CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* mice, in which injection of TM induces FLAG-tagged RAR γ expression in GFR α 1⁺ cells. The fate of FLAG-RAR γ expressing GFR α 1⁺ cells was tested in the VAD/VA administration model. When VA was replaced, FLAG-RAR γ ⁺ cells immediately became KIT⁺. These results indicate that enforced expression of RAR γ provides the GFR α 1⁺ cells with competence to differentiate to KIT⁺ cells in respond to RA. These results inferred that, when exposed to a high concentration of RA, RAR γ drives the NGN3⁺ cells to differentiation, while the absence of RAR γ allows the GFR α 1⁺ cells to remain undifferentiated.

By assembling all the aforementioned findings, I propose how the stem cell system is coordinated along the seminiferous epithelial cycle. Before the elevation of RA, the entire A_{undiff} population is composed of a mixture of GFR α 1⁺ (RAR γ ⁻) and NGN3⁺ (RAR γ ⁺) cells. When the RA amount increases, to which both GFR α 1⁺ and NGN3⁺ spermatogonia appear to be equally exposed, only NGN3⁺ cells that express RAR γ respond and differentiate into KIT⁺ cells, while GFR α 1⁺ cells remain undifferentiated. Then, the GFR α 1⁺ cells replenish NGN3⁺ cells through a RA-independent mechanism. This scenario would be paradigmatic for other “open” niche-supported tissue stem cells, since it would allow the stem cell population to maintain the undifferentiated pool while periodically producing the differentiating progeny.

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

申請者は、マウス精子幹細胞システムの解明を目的に研究を行った。一般に幹細胞は、特殊な微小環境（幹細胞ニッチ）に位置することで未分化性を保ち、ニッチから外れると分化すると考えられている。しかし、マウス精子幹細胞は物理的に限られたニッチは存在せず、このような環境で幹細胞が未分化の維持と分化をバランス良く行うメカニズムは知られていなかった。マウス精子形成においては、未分化型精原細胞（A_{undiff}）が幹細胞の役割を担う。A_{undiff}は GFR α 1+細胞と NGN3+細胞の2種からなるが、これらの性質の違いは不明であった。また、マウス精子形成は周期性を示し、ビタミン A（VA）から分化誘導シグナルであるレチノイン酸（RA）が周期的に合成される。VA を人工的に欠乏させた（VAD）マウスの精巣では、A_{undiff}から分化型精原細胞への分化が停止するが、VA を再投与すると精子形成は再開する。

申請者はまず、VAD 実験系を用いて GFR α 1+細胞と NGN3+細胞の RA の反応性を比較した。はじめに、NGN3+細胞の運命を追跡するために、VAD 状態の *Ngn3-CreERTM; CAG-CAT-EGFP* マウスにタモキシフェンを投与して NGN3+細胞をパルスラベルした後、VA を投与して分化を誘導した。その結果、ラベル細胞のほとんど全てが速やかに KIT+細胞へと分化した。同様に *Gfra1-CreER^{T2}; CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて、GFR α 1+細胞の運命追跡を行った。すると GFR α +細胞は VA 投与後も速やかに分化することなく、その数を一定に維持していた。また、GFR α 1+細胞をラベルした後に VAD 条件下で飼育し続けると、GFR α 1+細胞から NGN3+細胞への転換が起こっていた。以上から、NGN3+細胞は RA 刺激により分化するが GFR α +細胞は分化しないこと、GFR α 1+細胞から NGN3+細胞への転換には RA 刺激が必須でないことが明らかとなった。

次に申請者は、GFR α 1+細胞と NGN3+細胞の RA 反応性の違いを生み出す分子メカニズムを検討した。GFR α 1+細胞と NGN3+細胞を FACS により採取し、マイクロアレイを行ったところ、RA シグナルに関連する遺伝子の中で、RA 受容体の一つ *Rarg* の発現が NGN3+細胞で有意に高いことを見出した。さらに、RAR γ の発現の有無が性質の違いを生み出すのかを検討するため、タモキシフェン投与によって GFR α 1+細胞で FLAG タグつき RAR γ を異所性に強制発現させる、*Gfra1-CreER^{T2}; CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスを作成した。このマウスを VAD 状態にして GFR α 1+細胞で RAR γ を強制発現させた後に VA を投与すると、FLAG-RAR γ +細胞は速やかに KIT+細胞へ分化した。以上の結果から、NGN3+細胞では RAR γ の発現が高いために RA シグナルを受けて分化し、RAR γ を発現しない GFR α 1+細胞は RA シグナルを受けられずに未分化のまま留まることが示唆された。また、培養精原幹細胞である GS 細胞を用いて、RAR γ の発現制御に関与する因子の探索を行った。

以上から、生体内において A_{undiff}は RAR γ を発現しない GFR α 1+細胞と、RAR γ を発現する NGN3+細胞で構成され、RA 合成が起こると NGN3+細胞のみが反応して分化し、

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

GFR α 1+細胞は RA の有無に関係なく NGN3+細胞を生み出し続けていると考えられた。このように、分化シグナルである RA に対して反応性の異なる 2 種の細胞をつくることで、精子形成は滞りなく行われていると考えられた。

本研究は精子幹細胞のみならず、ニッチが存在しない組織における幹細胞システムを理解する上で重要な知見を与えるもので、学位論文審査に十分値する研究であると判断した。