

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証する

伊神 香菜子

基礎生物学研究所 生殖細胞研究部門  
444-8787 岡崎市明大寺町字東山 5-1

本学位論文の一部は、以下の論文として刊行された。

Ikami K., Tokue M., Sugimoto R., Noda C., Kobayashi S., Hara K., and  
Yoshida S. (2015). Hierarchical differentiation competence in response to  
retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis.  
*Development* *142*, 1582-1592

## 目次

I.	序	4
II.	材料および方法	10
III.	結果	22
IV.	考察	40
V.	謝辞	52
VI.	参考文献	54
VII.	図表	66

## I. 序

幹細胞は自己維持（自己複製）と分化細胞の産生を両立することにより、組織の恒常性を維持している。一般に、幹細胞は幹細胞ニッチによって自己維持と分化細胞の産生のバランスをとっていると考えられている。幹細胞ニッチとは、幹細胞を維持する微小環境と定義される。実際、多くの組織で幹細胞の辿る運命は幹細胞ニッチによって制御されている。すなわち、幹細胞ニッチに隣接している細胞が幹細胞として維持され、ニッチから離れた細胞が分化する運命をたどる。ショウジョウバエの精巣と卵巣における生殖腺末端部や、哺乳類の小腸陰窩などのように、これまで研究が進んでいる多くの幹細胞システムでは幹細胞ニッチの空間は非常に限られている (Fuller and Spradling, 2007; Snippert et al., 2010)。このようなニッチを“definitive niche”あるいは“closed niche”とよぶことが提唱されている (Morrison and Spradling, 2008; Stine and Matunis, 2013)。closed niche では、ニッチ領域に位置できる細胞数が物理的に限られているために、幹細胞の数は一定数で維持される。一方で、幹細胞が限定された領域に存在せず、広範囲に散らばって存在する組織も少なくない。このような様式のニッチを、closed niche と区別して、“facultative niche”あるいは“open niche”とよぶ。open niche をもつ組織は、哺乳類の毛包間表皮や、ショウジョウバエの中腸などがある。これまで、closed niche で幹細胞運命が決定されるメカニズムは広く研究されてきたが、open niche で幹細胞が維持されるメカニズムほとんど解明されていない。

哺乳類の精子形成は精細管の内部で起こる (Russell et al., 1990)。精子幹細胞



は精細管内で特定の場所に集まることなく広範囲に散らばり、open niche に支えられる幹細胞システムの代表されるものの一つである (図 1a、図 2)。マウス精子形成では「未分化型精原細胞 ( $A_{undiff}$ )」と呼ばれる少数の細胞集団が幹細胞として働いており、恒常的なマウス精子形成を支えている。 $A_{undiff}$  は自身の細胞集団を維持しながら、同時に  $A_1$  と呼ばれる分化型精原細胞をうみ出す。 $A_1$  は数回の体細胞分裂 ( $A_1 \Rightarrow A_2 \Rightarrow A_3 \Rightarrow A_4 \Rightarrow In \Rightarrow B$  型) の後、減数分裂前期のプロレプトテン期 (PL) に入り、減数分裂を経て精子へと分化する。精子形成は、基底膜側から内腔側に向かって進む。 $A_{undiff}$  は基底膜と、セルトリ細胞が形成するタイトジャンクションの間 (基底コンパートメント) に位置する。さらにその中でも、精細管の外部を走る血管近傍に偏って分布する (Chiarini-Garcia et al., 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; Yoshida et al., 2007)。しかし、 $A_{undiff}$  は限定された領域のみに集まっているのではなく、分化型精原細胞と同じ領域に散在している。さらに近年、ライブイメージングによる研究が進み、基底膜上で  $A_{undiff}$  がセルトリ細胞の間を縫うように移動する現象が観察されている (Hara et al., 2014; Yoshida, 2012)。このとき  $A_{undiff}$  はしばしば血管近傍を移動するが、特別なルートをたどるようには見えず、ニッチを規定できるような特殊な構造は見当たらない。

$A_{undiff}$  は、基底膜上で自己複製や分化を誘導するシグナルを受ける。セルトリ細胞から分泌される GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor : グリア細胞株由来神経栄養因子) が、 $A_{undiff}$  を維持するために必須なシグナル分子として同定されている (Meng et al., 2000)。GDNF は精子幹細胞の培養においても必須な因子である (Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Kubota et al., 2004b)。一

方、 $A_{undiff}$  から  $A_1$  への分化はビタミン A (VA) の活性代謝物であるレチノイン酸 (RA) によって誘導される (Hogarth and Griswold, 2010)。RA は、セルトリ細胞や分化細胞で発現する酵素である Aldh や Cyp26 ファミリータンパク質などにより、合成・分解される (Sugimoto et al., 2012; Vernet et al., 2006)。 $A_{undiff}$  から  $A_1$  への分化における RA の必要性は、VA 欠乏餌を与えることで誘導される VA 欠乏 (VAD) マウスの実験から証明されている。VAD マウス精巣には  $A_{undiff}$  しか存在しないが、VA を投与すると  $A_{undiff}$  から  $A_1$  がうみ出されて精子形成が再開する。従って、VAD マウスでは  $A_{undiff}$  から  $A_1$  への分化が停止していると考えられている (図 3) (de Rooij and Russell, 2000; van Pelt et al., 1995)。

精細管では、精細管周期とよばれる、精子形成が周期的に進行する現象が知られている (Oakberg, 1956; Russell et al., 1990)。マウスでは、この 1 周期は I-XII のステージに分けることができ、1 周期に 8.6 日かかる (Russell et al., 1990)。分化細胞 ( $A_1$ ) はみな同じタイミング (ステージ VII-VIII) で  $A_{undiff}$  から生み出され、その後、同調的に分裂、成熟する。8.6 日後には再び新しい  $A_1$  がうみ出され、より分化段階の進んだ細胞は内腔側へ移動する。その結果、層状の精細管上皮の構造が形成される (図 1a、b)。そのため、それぞれのステージにおける精細管断面では常に同じ分化段階の細胞がセットになって層構造をつくっている。精細管を長軸方向に辿っていくと、この周期が波を打つように進んでいる。 $A_{undiff}$  から  $A_1$  が生み出されるのは、ステージ VII-VIII である。このステージでは RA 濃度が上昇すると考えられている。これは、セルトリ細胞や分化細胞における RA 合成酵素や分解酵素の発現パターンから、ステージ VII-VIII では RA 合成が促進されるとともに、分解が抑制されることが示唆されているた

めである(Hasegawa and Saga, 2012; Sugimoto et al., 2012)。また、近年では、精細管周期を精巣全体で同調させたマウスを用いて、精細管のステージごとの RA レベルが測定されており、RA 濃度の周期的な変動が裏づけられている(Hogarth et al., 2014)。RA の合成や分解に関わる酵素の発現は精細管の全周で観察され、ステージVII-VIIIには精細管全体が高濃度の RA に暴露されると考えられる。また、このステージでは RA の下流のイベントである Stra8 の発現が精細管全周にわたって起こっており、RA が精細管の広範囲で合成されているという考えを支持している(Zhou et al., 2008)。しかしながら、ステージVII-VIIIを経ても全ての A<sub>undiff</sub> が分化する訳ではなく、一定数の A<sub>undiff</sub> は分化せずに未分化状態を維持する。そのため、A<sub>undiff</sub> は精細管周期を通して観察される(Huckins and Oakberg, 1978; Tegelenbosch and de Rooij, 1993)。では、なぜ A<sub>undiff</sub> 全体が RA に暴露されるのにも関わらず、全ての A<sub>undiff</sub> が分化せず、かつ分化細胞を生み出すことができるのだろうか？

RA は、A<sub>undiff</sub> から A<sub>1</sub> への分化誘導だけではなく、分化の進んだ細胞での減数分裂の開始の誘導にも関与することが知られている。RA の標的遺伝子である Stra8 が高発現すると減数分裂を開始するが、近年、A<sub>undiff</sub> から B 型精原細胞で高発現している DMRT1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) が RA 刺激時に引き起こされる Stra8 の発現レベルを抑えることで、精原細胞の減数分裂の開始を抑制していることが示唆されている (Matson et al., 2010)。すなわち減数分裂の開始は、RA 刺激とともに、それを受容する精原細胞自身における DMRT1 の発現の有無によって厳密に制御されているのである。一方で、A<sub>undiff</sub> も減数分裂に入る直前の分化型精原細胞と同じように基底コンパートメ

ントに存在し、同じように RA に暴露される (図 2)。同一の環境にいる同系列の細胞が、同時に同じシグナルを受けるにもかかわらず 2 通りの異なった反応を見せることは興味深い現象である。この反応性の違いを生み出す要因を明らかにするためにも、 $A_{undiff}$  から分化型精原細胞を生み出すメカニズムについて明らかにすることは意義深い。

哺乳類の精子形成細胞は娘細胞同士が細胞質でつながった不完全分裂をすることにより、細胞間橋によって連結した合抱体を形成する (Russell et al., 1990)。 $A_{undiff}$  は単一細胞のもの ( $A_s$ )、2 つの細胞がつながったもの ( $A_{pr}$ )、さらに多くの細胞がつながった合抱体 ( $A_{al}$ ) の、形態的に異なる細胞集団で構成されている (Huckins, 1971; Oakberg, 1971)。

それに加え近年では、 $A_{undiff}$  は遺伝子発現に関しても不均一であることが明らかとなってきた (Hara et al., 2014; Hofmann et al., 2005; Meng et al., 2000; Sada et al., 2009; Suzuki et al., 2012; Suzuki et al., 2009; Yoshida et al., 2004; Zheng et al., 2009)。 $A_{undiff}$  は  $GFR\alpha 1$  (Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1) を発現する細胞と  $NGN3$  (Neurogenin3) を発現する細胞の 2 つの細胞群に大きく分けることができる (Nakagawa et al., 2010; Yoshida, 2012)。 $GFR\alpha 1$  陽性 ( $GFR\alpha 1+$ ) 細胞は主に  $A_s$  や  $A_{pr}$  を、 $NGN3$  陽性 ( $NGN3+$ ) 細胞は大多数の  $A_{al}$  と、少数の  $A_s$  や  $A_{pr}$  を構成している。 $Cre$  リコンビナーゼ/ $loxP$  システムを用いたパルスラベル実験により、 $GFR\alpha 1+$ 細胞および  $NGN3+$ 細胞の挙動を調べることが可能となった。正常な精子形成を恒常的に行うマウス精巣内でこれらの細胞の挙動を検討した結果、 $GFR\alpha 1+$ 細胞集団は自身の細胞数を維持しながら  $NGN3+$ 細胞を生み出す、

「真の幹細胞」としてふるまっていることが明らかとなった (Hara et al., 2014; Sada et al., 2009)。一方の NGN3+細胞は、定常状態ではほとんどが分化型精原細胞である KIT 陽性 (KIT+) 細胞となる (図 1c) (Nakagawa 2010)。しかしながら、NGN3+細胞は GFR $\alpha$ 1+細胞に戻り再び幹細胞としてふるまう能力を保持し続けている。この逆戻りは定常状態ではほとんど起こらず、精子形成が傷害を受けた時や、薬剤処理などによって精巣内の細胞を排除した宿主マウスにドナーマウスの生殖細胞を移植したときなどに高頻度で観察される (Nakagawa et al., 2007; Nakagawa et al., 2010)。

このように、GFR $\alpha$ 1+細胞および NGN3+細胞は共に自己複製を行う能力を持っている。しかし実際の組織の中では、GFR $\alpha$ 1+細胞は「真の」幹細胞 (“actual” stem cell) として、NGN3+細胞は「潜在的」幹細胞 (“potential” stem cell) として働いている (Hara et al., 2014; Nakagawa et al., 2007; Nakagawa et al., 2010; Yoshida, 2012)。actual stem cell が減少しても、potential stem cell がそれを補うことから、このような A<sub>undiff</sub> の不均一性によって恒常的な精子形成が支えられているといえる (Nakagawa et al., 2007)。しかし、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞のこのようなふるまいの違いを生み出す分子的な基盤は不明である。さらに、細胞外環境で合成される分化誘導因子の RA と A<sub>undiff</sub> の関係性についても詳細は明らかでない。

本研究では GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の性質の違いを明らかにし、自己を維持しつつも分化細胞が生み出されるメカニズムの解明に迫った。その結果、RA と A<sub>undiff</sub> の関係性から、継続した精子形成を支えるメカニズムの一端が明らかになった。

## II. 材料および方法

本研究の遂行にあたっては、組換え DNA 実験、動物実験が含まれた。いずれも、当該法律・指針等規則およびその精神を遵守し、基礎生物学研究所組換え DNA 実験安全委員会および自然科学研究機構岡崎 3 機関動物実験委員会、筑波大学組換え DNA 実験委員会および動物実験委員会の承認を受けて遂行した。

### 1. 実験動物

野生型 (WT) マウス、および、*Ngn3-CreER<sup>TM</sup>* (Yoshida et al., 2006)、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>* (Hara et al., 2014)、*CAG-CAT-EGFP* (Kawamoto et al., 2000)、*Ngn3-EGFP* (Yoshida et al., 2004) および *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* トランスジェニックマウスを使用した。*CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* トランスジェニックマウスは、次項に記す方法で筑波大学筑波大学生命科学動物資源センターで作成した。その他の全てのマウスの繁殖、飼育は基礎生物学研究所モデル生物研究センターで行った。全てのマウスは C57BL/6J (Japan SLC, Japan CLEA) 系統の遺伝的背景で使用した。

### 2. *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスの作成

FANTOM cDNA クローン G370007N15 (DNAFORM) から制限酵素 *Bam*HI、*Xba*I で切り出した *Rarg* ORF 部位と、pCMV-3Tag-6 プラスミド (Agilent Technologies) から切り出した 3xFLAG エピトープをコードする DNA 断片を *pCAG-CAT* (Kawamoto et al., 2000) プラスミドへ挿入し、

*pCAG-CAT-3xFLAG-Rarg* プラスミドを作成した。*pCAG-CAT-3xFLAG-Rarg* 部位を切り出し、C57BL/6J×C57BL/6J マウスの受精卵の前核に注入しトランスジェニックマウスを筑波大学生命科学動物資源センターにて高橋智博士に作製いただいた。計 8 系統を樹立し (#3, #12, #14, #17, #20, #24, #41, #47)、そのうち#47 系統を使用した。

### 3. VAD マウスの作成

*WT*、*Ngn3-EGFP*、*CAG-CAT-EGFP*、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>*または *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* 雌マウスを VAD 餌 (Chubu Kagaku Shizai) で 4 週間飼育した後、*WT*、*Ngn3-EGFP*、*Ngn3-CreER<sup>TM</sup>*、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>*、*CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* または *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>* 雄マウスと交配させ、それぞれ *WT*、*Ngn3-EGFP*、*Ngn3-CreER<sup>TM</sup>*; *CAG-CAT-EGFP*、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>*; *CAG-CAT-EGFP* および *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>*; *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスを作成した。VAD 餌を与え続け、体重の増加が起こらなくなった時期 (10-14 週齢) に VAD マウスとして使用した。精子形成を再開させる場合は、25 $\mu$ l のエタノール (Sigma) と 75 $\mu$ l の胡麻油 (Nakalai Tesque) に溶解した 0.5mg の酢酸レチノール (Sigma) を腹腔内投与するとともに、以降は VA を含んだ通常餌 (CA-1、CLEA Japan) を与えた。

### 4. パルスラベル法

4OH-タモキシフェン (TM) (Sigma) を *Ngn3-CreER<sup>TM</sup>*; *CAG-CAT-EGFP* の VAD マウスに 0.5mg/個体、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>*; *CAG-CAT-EGFP* と、

*Gfra1-CreERT<sup>2</sup>; CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* の VAD マウスと正常マウスに、それぞれ 1.0、2.0mg/個体 腹腔内に投与した。TM は約 10 $\mu$ g/ $\mu$ l の濃度のものを用い、これは 25mg の TM を 140 $\mu$ l ジメチルスルホキシド (Nakalai Tesque)、200 $\mu$ l エタノールに溶解した後、胡麻油 2500  $\mu$ l に溶解して作成した。

*Ngn3-CreERT<sup>TM</sup>; CAG-CAT-EGFP*、*Gfra1-CreERT<sup>2</sup>; CAG-CAT-EGFP* の VAD マウスに関しては、TM 投与前に VAD 状態に導入したマウスを使用した。パルスラベル法に関しては、Nakagawa et al., 2007 を参考にした。

## 5. *In situ* hybridization に用いるプローブの作成

*Gfra1*、*Ngn3*、*Kit* の RNA プローブは各遺伝子の配列全長を含んだ cDNA クローンを用いて作成した。cDNA クローンについては、*Gfra1* は EST clone IMAGE 6390018、*Ngn3* は RIKEN clone 2010001M19、*Kit* は EST clone IMAGE 3154101 を用いた。cDNA を含むプラスミドを大腸菌で増幅させ、*Gfra1* と *Kit* を含むプラスミドは *Asp718*、*Ngn3* を含むプラスミドは *NotI* の各制限酵素を用いて切断して、これを RNA 合成の鋳型とした。*Aldh1a2*、*Cyp26b1*、*Stra8* の RNA プローブは、各遺伝子の配列を pBluescript ベクターに導入し、これを鋳型として PCR で得た転写産物を用いて作成した。用いたプライマーは、*Aldh1a2* は 5'-TGAATGGCAGAACTCAGAGAGTGG-3' と 5'-ATACTGTGGGTTGAAGGGAGCTAG-3'、*Cyp26b1* は 5'-CTGTATGCCCATGACAGTGTTAGC-3' と 5'-ATCTACAGAGGTGAGACGGGTATC-3'、*Stra8* は 5'-TTTCCTGCGTGTTCACAAGTGTC-3' と 5'-AGGCTTTTGAAGCAGCCTTTCTC-3'。その後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)



によって精製し、これを RNA 合成の鋳型とした。プローブ合成は DIG RNA labeling kit (Roche) を用い、付属のプロトコールに従って行った。各クローンに対して T7 RNA ポリメラーゼを使用してジゴキシゲニン標識アンチセンス RNA プローブを合成した。精製したプローブは 1mM Dithiothreitol (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan) を含むアルカリ処理液 (63mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Wako)) による断片化を行った。

## 6. *In situ* hybridization

成体 *WT* マウスをアバチンの腹腔内投与により麻酔を施し、経心室的にパラホルムアルデヒド (4% (w/v) PFA) を溶解した PBS で還流固定した後、精巢を採取した。4%PFA 溶液中で、4°C、12 時間以上固定した後にパラフィンに包埋、ミクロトーム (RM2255, Leica) を用いて 7µm 厚のパラフィン切片を作成した。サンプルはキシレンで脱パラフィンし、エタノール系列により脱水した。PBS で 3 分間 3 回洗浄し、4%PFA で 15 分間固定した後、PBS で 2 分間洗浄した。その後、7.5µl/ml のプロテイナーゼ K (Merck Millipore) を 37°C で 30 分から 1 時間処理することでタンパク質を部分分解した。その後再び 4%PFA で 10 分間固定した後、PBS で 2 分間洗浄した。次に、0.2M HCl を含んだ DEPC 処理水で 10 分間処理し、PBS で 1 分間洗浄した後、0.1M トリエタノールアミンを含む 0.25% (v/v) 無水酢酸溶液を 10 分間処置してアセチル化した。再び PBS で 2 分間洗浄した後、70%、100%メタノールを 15 秒間浸透させ、その後 30 分間風乾させた。プローブを 200-500ng/mL の濃度になるよう hybridization buffer (50% (v/v) ホルムアミド、5x SSC (pH4.5 の 20x SSC (0.3M クエン

酸ナトリウム、3M 塩化ナトリウム) を 4 倍希釈して使用)、1% (w/v) SDS、50µg/mL tRNA、50µg/mL ヘパリン) で希釈し、85°Cでプローブを変性させた後、55°Cで 16 時間 hybridization を行った。hybridization の後、50%ホルムアミドを含む 2x SSC で 55°C15 分間洗浄し、TNE(10mM Tris-HCl、1M NaCl、1mM EDTA) で 37°C30 分間処置した後に、TNE に溶解した RNase A (0.02mg/ml) を 37°C 30 分間処置することにより余剰のプローブ及び、ハイブリダイズしていない一本鎖 RNA を分解した。その後、TNE 37°C 5 分間、2x SSC 50°C 15 分間を 2 回、0.2x SSC 50°C15 分間を 2 回、TBST で 5 分間洗浄し、1% Blocking reagent (Roche) を含む TBST により 15 分間室温でブロッキングした。その後、同溶液で 200 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) を室温で 2 時間反応させた。その後、20mM の levamisole を含んだ TBST で 10 分間 2 回洗浄して、発色緩衝液(100mM Tris-HCl pH9.5、100mM NaCl、50mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% (v/v) Tween-20、20mM levamisole) で 15 分洗浄した後、BM purple AP substrate (Roche) を 1 時間-3 週間反応させて発色を行った。発色後、PBS で洗浄して Nuclear fast red により対比染色を行い、エタノールで脱水後にキシレンで透徹して封入した。

## 7. Whole-mount 免疫染色

ネンブタール麻酔下、あるいは頸椎脱臼により安楽死させたマウスから精巣を採取し、PBS 内で精細管を単離した後、4%PFA で 4°C 3 時間固定した。精細管を MAS コートスライドガラス (松波硝子工業) に付着させ、約 90 秒乾燥させた後、PBST で洗浄した。その後、25%、50%、75%、100% (2 回) のメ

タノールにそれぞれ 7 分間処置することで脱水し、これを逆行して再び水和させた。PBST で 10 分間 2 回洗浄した後、4%ロバ血清と 0.001% (v/v) Hoechst 33342 (Invitrogen)を含んだ 0.05% (w/v) Blocking reagent (PerkinElmer)を含む TNB blocking buffer で 1 時間ブロッキングした。次に、一次抗体（ウサギ抗 GFP 抗体 / 1:300 (Invitrogen, #A11122)、ラット抗 GFP 抗体 / 1:200 (Nacalai Tesque, #04404-84)、ニワトリ抗 GFP 抗体 / 1:200 (Abcam, #13970)、ヤギ抗 GFR $\alpha$ 1 抗体 / 1:200 (R&D Systems, #AF560)、ラット抗 KIT 抗体 / 1:200 (BD Biosciences, #553352)、ウサギ抗 RAR $\gamma$  抗体 / 1:200 (Cell Signaling Technologies, #8965)、ウサギ抗 DDDDK (FLAG) 抗体 / 1:500 (MBL, #PM020)、マウス抗 FLAG 抗体 / 1:500 (Sigma, #F1804)、マウス抗 PLZF 抗体 / 1:50 (Calbiochem, #OP128) をそれぞれ TNB blocking buffer で希釈し、4°C で 12 時間反応させた。ウサギ抗 FLAG 抗体希釈溶液は 0.3% (w/v) アセトンパウダーを 4°C で 24 時間インキュベートした後に遠心して得られた上清を使用した。アセトンパウダーは、液体窒素で凍結したマウス胚をすりつぶした後に懸濁液の 4 倍のアセトンを添加、9000g で 15 分遠心して得られた沈殿物に -20°C のアセトン 30ml を混合し、0°C で 10 分放置後、9000g で 15 分遠心して得られた沈殿物を乾燥させて作製したものを使用した。続いて TNBT で 10 分間 2 回洗浄した後、2 次抗体（Alexa-488、-594、-647 標識 抗ウサギ IgG 抗体 (1:400; invitrogen)、Alexa-488、-594、-647 標識 抗ヤギ IgG 抗体 (1:400; invitrogen)、Alexa-488、-594 標識 抗ラット IgG 抗体 (1:400; invitrogen)、Alexa-488 標識 抗マウス IgG 抗体 (1:400; invitrogen)) を TNB blocking buffer で希釈して 1 時間室温で反応させた。その後、PBST で 10 分間 2 回洗浄し、VECTASHIELD

(Vector) で封入した。精巢をほぐす際には MZ12.5 実体顕微鏡 (Leica)、観察には BX51 蛍光顕微鏡 (Olympus)、TCS SP8 共焦点顕微鏡 (Leica) を用いた。

## 8. マイクロアレイ解析

セルソーター (Coulter Epics Alter、MoFlo XDP IntelliSort II (Beckman Coulter)) を用い、10-12週齢の *Gfra1-EGFP* マウスと *Ngn3-EGFP* マウスからそれぞれ *GFR $\alpha$ 1-EGFP+* 細胞と *Ngn3-EGFP+* 細胞画分を採取した。KIT+細胞は、*Ngn3-EGFP* マウスから Cyanine5 標識した抗KIT+抗体 (Cosmo Bio) を用いた染色により、GFP+, KIT+の細胞群として採取し、NGN3+細胞はGFP+, KIT-の細胞群として採取した。GFR $\alpha$ 1+, NGN3+, KIT+細胞はそれぞれ、3、6、3匹のマウスから3サンプルずつの細胞画分を得た。RNeasy micro Kit (Qiagen) を用いて、これらのサンプルからtotal RNAを抽出した。Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用い、RNAからcDNA、Cyanin3-CTPラベルしたcRNAを作成した。Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies Japan) を用いてハイブリダイゼーションを行った後、基礎生物学研究所 生物機能情報分析室、および北海道システムサイエンスにて解析を行った。DNAチップ (Agilent Technologies) はSurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray (Agilent Technologies) を使用した。基礎生物学研究所 生物機能解析室ではAgilent microarray scanner (G2565CA) を、北海道システムサイエンスではAgilent Technologies Scanner (G2505C) を用いてスキャンを行い、共にFeature Extraction ver.10.7.3.1 (Agilent Technologies) を用いて数値化

した。アレイデータについては、Gene Spring v12.0.0.0 (Agilent Technologies Japan) を用いて解析し、以下の条件でサンプル間の補正を行った (Threshold raw signals to 1.0、normalization algorithm: Percentile Shift、Shift to percentile 75)。表3、図22で表示した遺伝子はRAシグナリングに関連する因子、核内受容体が転写する際に関与する因子(Perissi and Rosenfeld, 2005)の遺伝子を抽出するため、GeneSpring中の以下の Gene Ontology (GO) termを抽出した: retinoic acid receptor activity、retinoic acid receptor signaling pathway、regulation of retinoic acid receptor signaling pathway、retinoic acid 4-hydroxylase、histone acetyltransferase complex、mediator complex、histone acetylase complex、ligand-dependent chromatin remodeling、ATP-dependent chromatin remodeling。

## 9. 細胞培養

C57BL/6JとICRマウスの交配から得られた生後7日齢のF1の精巣から樹立されたGS (Germline stem) 細胞を、横浜市立大学 小川毅彦博士より譲与していただいた。GS細胞の培養に関してはKanatsu-Shinohara et al., 2003を参考にしてみた。GS細胞の培養にはマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) (Oriental Yeast) をフィーダー細胞として使用した。培地はStemPro-34-SEM (invitrogen) に以下の試薬を添加したものを使用した (2.6% (v/v) StemPro-34 supplement (invitrogen)、25µg/ml インスリン (Nakalai Tesque)、100µg/mlトランスフェリン (Wako)、60µM プトレシン (Sigma)、30µM 亜セレン酸ナトリウム (Sigma)、6mg/ml d-(+)-グルコース (Sigma)、200µg/mlピルビン酸 (Sigma)、

1 $\mu$ l/ml dl-乳酸 (Sigma)、5mg/ml ウシ血清由来アルブミン (MP Biomedicals)、2mM l-グルタミン (Sigma)、5x10<sup>-5</sup>M メルカプトエタノール (Sigma)、1% (v/v) MEM Vitamin solution (Invitrogen)、1% (v/v) Nonessential amino acids (Invitrogen)、1x10<sup>-4</sup>M アスコルビン酸 (Sigma)、10 $\mu$ g/ml d-ビオチン (Sigma)、60ng/ml プロゲステロン (Sigma)、100U/ml ペニシリンS-トレプトマイシン (Gibco)、1% (v/v) FBS (Hyclone)、20ng/ml EGF (MP Biomedicals)、15ng/ml GDNF (Perotech Inc.)、10ng/ml FGF2 (Perotech Inc.) (Kanatsu-Shinohara et al., 2003)。培地交換は2日おきに行った。GDNFとFGF2の影響を調べる実験では、上記の培地に含まれる試薬のうちFGF2を添加しない培地、GDNFを添加しない培地、FGF2とGDNFの両方を添加しない培地を作成し、実験に使用した。

## 10. 定量RT-PCR

マイクロアレイと同様の方法で採取したGFR $\alpha$ 1+細胞とNGN3+細胞から、mirVana<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (Life Technologies) を用いてtotal RNAを調整した。DNA-free<sup>TM</sup> Kit (Life Technologies) を用いてゲノムDNAを除去した後、オリゴ(dT)とランダムヘキサマーの混合プライマーを含むSuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) を用いて逆転写を行った。FACSにより採取した細胞由来のRNAを用いた定量PCRは、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) とプローブを含むTaqMan gene expression assay kit (*Rarg*; Mm00441091\_m1、*Rara*; Mm01296312\_m1、*Actinb*; Mm00607939\_s1) を用い、LightCycler 480 System (Roche) により行った。*Rarg*遺伝子のイントロン配列に由来する転写産物の定量は

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて定量PCRを行い、*Actinb* で補正した。*Rarg*イントロン認識プライマーの配列は5'-TGATTGTTTGATTG CATATGGGTTG-3' と 5'-AGTTGCCTTCTGACCTCTGC-3'、*Actinb*は 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' と 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCAT GT-3'。GS細胞におけるmRNAの発現解析には継代数が20回以内の細胞を使用し、mRNAはRNeasy micro Kit (Qiagen) を用いて抽出した。MEF上で培養しているGS細胞を室温で5分間トリプシン処理を行うことにより単一細胞に分離した後、ゼラチン (関東科学) でコートした10cm培養プレート (IWAKI) 上で3-5時間培養して、培地中に浮遊している細胞を回収した。これにより接着能の差を利用してGS細胞のみを回収した。MEFを除いたGS細胞を、ラミニン (BD) コートをした24ウェルプレート (IWAKI) で $1.5 \times 10^5$  cells/wellの濃度で培養した。24時間後に適当な培地 (GDNF、FGF2を含む、又は含まない培地、細胞培養の項目を参照) に交換し、さらに48時間培養した細胞を用いた。培養細胞の定量PCRはTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mixを用いて行った。培養条件により*Actinb*の発現が変化したため、培養細胞におけるmRNA発現は*Tbp*により補正した。使用したプライマーは、*Rarg*は5'-GCATCAGCACTAAGGGAGCA-3' と 5'-GGTTCTCCAGCATCTCTCGG-3'、*Ngn3*は5'-CGGGAGAACTAGGATG GCGCCT-3' と 5'-ACTTCGTGGTCCGAGGCTCCGG-3'、*Gfra1*は 5'-CTCCTGGCCTACTCGGGACTGATTG-3' と 5'-CCACTGTTGCTGCAAT CGGACCA-3'、*Ret*は5'-GCATGTCAGACCCGAACTGG-3' と 5'-CGCTGAG GGTGAAACCATCC-3'、*Tbp*は5'-CCTTGTACCCTTCACCAATGAC-3' と 5'-ACAGCCAAGATTCACGGTAGA-3'。

## 11. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイには、継代数が20回以内のGS細胞を使用した。上記の定量RT-PCRの項目で記した方法と同様の方法でMEFを取り除いた。MEFを除いたGS細胞を、ラミニンコートした48ウェルプレート (IWAKI) で  $6 \times 10^4$  cells/wellの濃度で培養した。約24時間後に、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いて遺伝子導入を行った。1wellあたり  $0.2 \mu\text{g}$  のDNAを  $10 \mu\text{l}$  のOpti-MEM® (Life Technologies) に溶解し、これを  $10 \mu\text{l}$  のOpti-MEM®に  $0.4 \mu\text{l}$  のlipofectamin 2000を添加して5分間静置したものと混合し、さらに20分間静置した後にこれを添加した。RNAiを用いた実験では、1wellあたり  $0.15 \mu\text{g}$  のDNAと  $3 \text{ pmol}$  のsiRNAを同様の方法で使用した。培地交換を要する実験では、遺伝子導入24時間後に培地交換してから48時間後の細胞を採取した。培地交換を要さない実験では遺伝子導入48時間後に細胞を採取した。RAを処置する実験では、遺伝子導入24時間後に、エタノールで溶解した  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  のRA (Sigma) を添加して濃度が  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  になるように調整した培地と交換し、24時間後に細胞を採取した。ルシフェラーゼ活性はDual-Luciferase assay systemとGlomax a 20/20 luminometer (Promega)を用いて測定した。内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼを発現するpGL4.7 (Promega) ベクターを共導入し、ホタルルシフェラーゼの値をウミシイタケルシフェラーゼの値で補正した。

## 12. プラスミドおよびsiRNA

(RARE)<sub>9</sub>-pGL3pは*nodal*をコードする配列に含まれるRAREの9回反復配列をpGL3プラスミドの*SmaI*と*HincII*間に挿入したもので、大阪大学 濱田博司博



士より譲与していただいた。(Uehara et al., 2009)。RAR $\gamma$ -lucはC57BL/6ゲノムDNA断片を含むBACクローン (B6Ng01-192E19、B6Ng01-041i09、B6Ng01-191C03 (RIKEN Bioresource Center))由来の、*Rarg*配列の上流7kbpと第三エクソンの開始コドンまでの配列を含むDNA断片を、pGL4.10 (Promega) プラスミドの*Eco*R1と*Nco*I間に挿入した (図39c参照)。Ngn3-lucは*Ngn3*配列の上流6.8kbpの配列をpGL4.10のプラスミドの*Xba*Iと*Nco*I間に挿入した (図39a参照) pcDNA3-Ngn3プラスミドはPCRで増やした*Ngn3*配列をpcDNA3 (Clontech) の*Hind*IIIと*Xba*I間に挿入した。*pCAG-CAT-3xFLAG-Rarg*プラスミドは*CAG-CAT-3xFLAG-Rarg*マウスの作成の項目に記載している。使用したsiRNAはS62708 (Ngn3 #1) とs201064 (Ngn3 #2)、コントロールはSilencer® Select Negative Control #2 siRNA を使用した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. GFR $\alpha$ 1+精原細胞と NGN3+精原細胞のレチノイン酸に対する反応性の違い

本研究では、A<sub>undiff</sub>が RA に応答して分化細胞を生み出すメカニズムを検討するために、VAD マウスモデルを用いた。VAD マウスは精子形成における RA の影響を検討する上で有用なモデルである。このマウスでは、精細管にはセルトリ細胞と A<sub>undiff</sub>しか存在しないが、RA の前駆体である VA を投与することにより分化型精原細胞が生み出される (図 3) (Morales and Griswold, 1987; van Pelt et al., 1995)。しかし、この RA シグナルによって A<sub>undiff</sub> が全て分化してしまふことはない。A<sub>undiff</sub>はどのようなメカニズムによって自己を維持しながら分化細胞を生み出すのであろうか? このメカニズムを明らかにするために、A<sub>undiff</sub>を構成する GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞が RA に反応してどのように挙動するかを明らかにする必要があると考えた。そこで VAD マウスを用いて、これら細胞の性質の解明を試みた。

##### 1-1. ビタミン A 投与後の *Gfra1*+精原細胞と *Ngn3*+精原細胞の数の変化

VAD マウスに VA を投与すると、生体内で RA へと代謝されて組織の RA 濃度が上昇する。精細管内で RA が合成されると A<sub>undiff</sub> から KIT 陽性の分化型精原細胞 (A<sub>1</sub>) が生み出される (Morales and Griswold, 1987; Sugimoto et al., 2012; van Pelt and de Rooij, 1990)。そこでまず、VA 投与によって A<sub>1</sub> が生み出される過程における、*Gfra1*+細胞数、*Ngn3*+細胞数、および *Kit*+細胞数の経

時的な変化を検討した。VAD マウスに VA 投与して 0、2、4 日後の *Gfra1*+細胞、*Ngn3*+細胞、*Kit*+細胞を、*in situ hybridization* 法 によって検出し、これを計数した (図 4)。VA 投与前は、*Gfra1*+細胞と *Ngn3*+細胞の存在が認められ、*Kit*+細胞の存在は認められなかった (表 1、図 5、6 day 0)。しかし、投与 2、4 日後にかけて *Kit*+細胞が出現、増加し、反対に *Ngn3*+細胞は VA 投与前の 5% 以下までに減少した。一方で、*Gfra1*+細胞の数はほとんど変化せず VA 投与後も一定して存在していた (表 1、図 5、6)。これらの結果から、*Gfra1*+細胞と *Ngn3*+細胞群が、RA に対して異なった動態を示すことが明らかとなった。そこで私は、RA によって *GFRα1*+細胞は分化しないが *NGN3*+細胞は *KIT*+細胞に分化する、という作業仮説を立て、以下これを検証した。

## 1-2. レチノイン酸に対する *NGN3*+精原細胞の応答

*NGN3*+細胞が、RA シグナルによって *KIT*+細胞に分化するかどうかを検証するため、VAD マウスに VA を投与して精子形成を再開させる実験系において、*NGN3*+細胞の運命追跡を行った。VAD 状態で飼育した *Ngn3-CreER<sup>TM</sup>*; *CAG-CAT-EGFP* マウスに、TM を単回投与することで *NGN3*+細胞を GFP 発現により不可逆的にラベルした。その後 VA を投与後 0、2、4、6 日の精細管を whole-mount 免疫染色することで、TM 投与時に *Ngn3* を発現していた細胞 (*GFP*+細胞) が *GFRα1*+, *NGN3*+, *KIT*+のいずれの細胞へと変化したかを検討した (図 7)。*GFRα1*+細胞と *KIT*+細胞はそれぞれ *GFRα1*、*KIT* 認識抗体を用いて標識した。*A<sub>undiff</sub>* は *GFRα1*+細胞と *NGN3*+細胞で構成されること、*A<sub>undiff</sub>* から生み出された分化細胞は *KIT* の発現を継続する (*A<sub>1</sub>*-*B* まで) という知見に

基づいて、GFR $\alpha$ 1 陰性 KIT 陰性の GFP+細胞は NGN3+, GFP+細胞にほぼみなすことが出来るため、NGN3+細胞としてこれを計数した。予想通りに、VAD 状態ではほとんど全ての GFP+細胞が GFR $\alpha$ 1-A<sub>undiff</sub> (NGN3+) 細胞だった (96%以上) (図 8、9 day 0)。しかし、VA 投与 4、6 日後にはほとんど全ての GFP+細胞の細胞膜上に点状の KIT が現れた (KIT 陽性) (90%以上) (図 8、9)。以上の結果から、NGN3+細胞は RA に反応して迅速に KIT+分化型精原細胞へと転換することが明らかとなった。

### 1-3. レチノイン酸に対する GFR $\alpha$ 1+精原細胞の応答

次に、*Gfra1-CreERT<sup>2</sup>; CAG-CAT-EGFP* マウスに対して同様の方法を用いることで、GFR $\alpha$ 1+細胞の RA に対する応答性を検討した (図 10)。VAD 状態にしたこの遺伝子改変マウスに TM を投与して GFR $\alpha$ 1+細胞をラベルし、VA 投与により精子形成を再開させた。VAD 状態では、予想通り GFP+細胞の大部分は GFR $\alpha$ 1+細胞であった (図 11a、12 day 0)。VA 投与後、GFP+細胞全体の数は徐々に増加していった。しかし、NGN3+細胞の追跡実験 (図 9) で観察されたような、速やかな KIT+細胞への移行は観察されず、VA 投与 10 日後でも多くの KIT-, GFP+細胞が観察された (図 11b)。さらに注目すべきことに、KIT-, GFP+細胞のうち、GFR $\alpha$ 1+細胞は常にほぼ一定の数存在し、その数は追跡した VA 投与 10 日後まで維持されていた (図 11a、12)。一方で、GFR $\alpha$ 1+, GFP+細胞から転換したと考えられる GFR $\alpha$ 1-A<sub>undiff</sub>, GFP+ (NGN3+, GFP+) 細胞は、VA 投与 8 日後までゆっくりと増加を続けた。その後、VA 投与 8 から 10 日後の間で NGN3+, GFP+細胞の数は急激に減少し、同時に KIT+, GFP+細胞数が

増加した (図 12)。これは、VA を投与してから精細管周期 (8.6 日) が一周し、再び精細管内で RA が合成されたために、NGN3+細胞が KIT+細胞へ分化した結果と考えられる (図 8、9 参照)。以上の結果から、GFR $\alpha$ 1+細胞は RA に対して速やかに反応せず、自己を維持しながらゆっくりと NGN3+細胞や KIT+細胞を生み出していることが示された。

#### 1-4. GFR $\alpha$ 1+精原細胞は直接 KIT+精原細胞に分化するか

図 12 において、VA 投与後 8 日以前にも、KIT+, GFP+細胞は少数ながら観察され、次第にその数を増やす現象が観察された。この結果は、GFR $\alpha$ 1+細胞から直接 KIT+細胞への分化が RA によって緩やかな速度で引き起されていることによっても説明することが可能である。そこで、VA 投与後に観察される GFP 標識された KIT+細胞が GFR $\alpha$ 1+細胞から直接生じたのか、それとも NGN3+状態を経由したのかを *Ngn3-EGFP* マウスを用いて検討した。GFP は個体内で 2-3 日の半減期を持つため、*Ngn3-EGFP* マウスでは過去数日の間に *Ngn3* を発現していた KIT+細胞が GFP+, KIT+細胞として検出できる。そこで、VAD 状態にした *Ngn3-EGFP* マウスに VA を投与して、生み出された KIT+細胞において GFP タンパク質が検出されるかを免疫染色により検討した (図 13)。その結果、VA を投与して 2、4 日後には、99%以上の KIT+細胞で GFP タンパク質が検出された (表 2、図 14)。したがって、RA によって生み出される KIT+細胞のほとんど全てが NGN3+の状態を経由していることが明らかとなった。以上の結果から、図 12 で RA 投与後 8 日以前に観察される KIT+細胞は、VAD 状態で少数観察される NGN3+細胞 (図 12 day 0) から供給されたもの、あるいは GFR $\alpha$ 1+

細胞が供給した NGN3+細胞を経て分化したものと考えられた。

以上の結果をまとめると、GFR $\alpha$ 1+細胞は RA が合成されても直接 KIT+細胞に分化せず、緩やかな速度で NGN3+細胞に転換していることが明らかとなった。

#### 1-5. GFR $\alpha$ 1+精原細胞から NGN3+精原細胞を生み出すためにレチノイン酸は必要か

図 12 で示されるように GFR $\alpha$ 1+細胞から NGN3+細胞が作られる。しかし、この過程に RA が関与しているかは、この実験からは不明である。RA は NGN3+細胞や組織内の他の様々な細胞に作用してしまうために、VA の投与によって GFR $\alpha$ 1+細胞から NGN3+細胞への転換に直接及ぼす影響のみを明らかにすることは困難である。そこで VAD マウスを用いて、十分な RA シグナルが存在しない状況下で GFR $\alpha$ 1+細胞から NGN3+細胞への転換が起こるか検討し、RA がこの過程に必須であるかを検証することにした。VAD 状態においた *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-EGFP* マウスにおいて、TM 投与により GFR $\alpha$ 1+細胞を GFP でラベルした後、VAD 状態のまま飼育し続け、2、14、30 日後の GFP+細胞を追跡した (図 15)。GFR $\alpha$ 1-細胞は NGN3+細胞とみなして計数した。ラベル 14、30 日後には、全 GFP+細胞数は増加し、GFR $\alpha$ 1-A<sub>undiff</sub>, GFP+(NGN3+, GFP+) 細胞数は著しく増加していた。この結果は、VAD 状態でも GFR $\alpha$ 1+細胞が増殖し、NGN3+細胞を供給していることを示している。また、これまでの結果と同様、GFR $\alpha$ 1+, GFP+細胞数は 30 日後でも一定数維持されていた (図 16、17)。一方で、VAD 状態において NGN3+細胞を追跡した実験 (図 18) では、ほぼ全てのラベル細胞が NGN3+状態に留まるとともに、総ラベル細胞数の

減少が認められた(図 19、20)。このことから NGN3+細胞は VAD 状態において細胞死を起こしていることが示唆される。従って図 17 で見られる NGN3+, GFP+細胞の増加は、NGN3+細胞自身の増殖の影響よりも、GFR $\alpha$ 1+, GFP+細胞が分裂、増殖して NGN3+細胞を供給したことによる影響が大きいと考えられる。以上の結果から、十分な RA シグナルが存在しない状況下でも GFR $\alpha$ 1+細胞から NGN3+細胞への転換が起こっていることが示された。

## 2. GFR $\alpha$ 1+精原細胞と NGN3+精原細胞の RA に対する応答性の違いをもたらすメカニズムの解明

これまでの結果から、A<sub>undiff</sub>を構成している GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞という 2 種の細胞集団は RA に対して異なった応答をすることが示された。すなわち、RA 濃度の上昇に対して NGN3+細胞は速やかに分化して KIT+細胞となるが、GFR $\alpha$ 1+細胞は KIT+細胞へは分化しない性質を持つことが明らかとなった。そこで次に、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の RA に対する応答性に違いをもたらすメカニズムを検討した。まず、RA が精細管内部で偏った分布をし、NGN3+細胞にのみシグナルが届き、GFR $\alpha$ 1+細胞には RA が届かないという可能性を考えた。しかし、RA の合成酵素である *Aldh1a2* や RA 分解酵素である *Cyp26b1* の発現に空間的に大きな偏りは観察されず、精細管の内部ほぼ全周にわたって発現が認められた (図 21) (Sugimoto et al., 2012)。また、RA の標的遺伝子である *Stra8* は精細管全周の精原細胞で強い発現が観察され、RA シグナルが精細管の全周で作用していると考えられた。さらに、基底コンパートメントにおいて GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞は混在しており (図 2)、これらの細胞は基底コ

ンパートメント内を動き回っている(Hara et al., 2014; Yoshida et al., 2007)。

これらの知見は、基底膜上に位置している  $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞を含めた全ての細胞が同様に RA に暴露されることを示唆する。これらのことから、 $NGN3+$ 細胞だけが RA に暴露されている、という可能性は考えにくい。

次に、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の細胞内の RA シグナリングの機構が異なっている可能性を考えた。つまり  $NGN3+$ 細胞のみが RA に対して応答する能力がある、あるいはどちらも RA に応答するが、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞では別のターゲット遺伝子を活性化する、という可能性である。これらの可能性について以下で検証した。

## 2-1. $GFR\alpha 1+$ 精原細胞と $NGN3+$ 精原細胞の間の RA シグナリング関連遺伝子の発現の比較

$GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の間で、RA シグナリングに関連する遺伝子の発現の違いを比較した。具体的には、*Gfra1-EGFP* マウスと *Ngn3-EGFP* マウス (Uesaka et al., 2007; Yoshida et al., 2004) からそれぞれ  $GFR\alpha 1-EGFP+$ 細胞と  $Ngn3-EGFP+$ 細胞を GFP の蛍光を指標に FACS (fluorescence activated cell sorting : 蛍光標示式細胞分取器) により単離し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

項目 1-2 と 1-3 に記したように、 $NGN3+$ 細胞は RA に応答しているように見えるが、 $GFR\alpha 1+$ 細胞は RA に応答しているように見えない。さらに、RA はセルトリ細胞や、精原細胞や精子細胞などの分化細胞により産生される。以上のことから RA が標識細胞の遺伝子発現を誘導 (あるいは抑制) するまでに関与



する遺伝子群に着目し、GeneSpirng 中の Gene Ontology (GO) アノテーションに従ってこれらを抽出した。抽出した遺伝子のうち、ほとんどのものは GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞間で同程度の発現が認められたが、少数の遺伝子については発現に偏りが見られた (表 3、図 22)。

## 2-2. GFR $\alpha$ 1+精原細胞と NGN3+精原細胞間の RAR $\gamma$ の発現の違い

私は、その中でレチノイン酸の受容体の一つである *Rarg* (retinoic acid receptor gamma) に特に注目した。RAR $\gamma$  は RA を受容するとともに核内で DNA に直接結合して転写因子としても働く、RA シグナルで中心的な役割を果たす極めて重要な因子である (Blomhoff and Blomhoff, 2006)。*Rarg* の発現は、GFR $\alpha$ 1+細胞と比較して NGN3+細胞で顕著に高く、定量 RT-PCR でも同様の結果が得られた (表 3、図 22、23)。さらに、*Ngn3-EGFP* マウスにおいて whole-mount 免疫染色を行い、RAR $\gamma$  のタンパク質発現を GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の間で比較した。その結果、ほとんど全ての NGN3+細胞の核で RAR $\gamma$  が明瞭に検出された (98.1%、図 24a、b)。GFR $\alpha$ 1 は RAR $\gamma$  と相補的に発現しており (図 24a、c)、GFR $\alpha$ 1 と RAR $\gamma$  が共に発現している細胞では両方のシグナルが弱く認められた (図 25a)。さらに、*A<sub>undiff</sub>* のマーカーである PLZF を発現する細胞のほとんど全てが (2085 細胞のうち 2057 細胞)、GFR $\alpha$ 1 と RAR $\gamma$  のどちらか、または両方を発現していた (図 25b)。また、KIT+細胞では細胞全体に弱い発現が認められた (図 26)。以上の結果から、RAR $\gamma$  は NGN3+細胞に特異的に高発現していることが明らかとなった。この結果は、*A<sub>undiff</sub>* と *A<sub>1</sub>* の一部の細胞で RAR $\gamma$  が発現しており、RAR $\gamma$ +細胞は GFR $\alpha$ 1 を発現してい

ないことを報告した結果(Gely-Pernot et al., 2012)と一致している。これに加えて本研究では、 $A_{undiff}$ を構成する細胞の全てが  $GFR\alpha 1$  と  $RAR\gamma$  のいずれかを発現していることを明らかにした。

また、他の RA 受容体である  $RAR\alpha$  も  $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞で発現していることを認めた。しかし、 $NGN3+$ 細胞における発現は  $RAR\gamma$  より低く、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞で有意な発現の差はなかった (図 23)。

$DMRT1$  は分化型精原細胞において RA による減数分裂への導入を抑制する因子であり、減数分裂に入る時に発現が低下する。同様に、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の RA の反応性の違いが  $DMRT1$  によって生み出されている可能性を考え、 $DMRT1$  の発現をマイクロアレイにより比較した。すると、 $GFR\alpha 1+$ 細胞、 $NGN3+$ 細胞、 $KIT+$ 細胞で差がなく、ともに発現が高かった (図 27)。このことから、 $DMRT1$  が  $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の RA に対する反応性の違いに関与していないことが示唆された。

以上の結果から、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の RA に対する反応性の違いをもたらす因子として、両者で発現が異なる  $RAR\gamma$  が大きな役割を果たす可能性が考えられた。次いで、この可能性を検証した。

### 2-3. $GFR\alpha 1+$ 精原細胞における $RAR\gamma$ の強制発現

$RAR\gamma$  の発現の違いが、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の RA に対する応答性に影響を与えているかを検証するため、本来  $RAR\gamma$  を発現しない  $GFR\alpha 1+$ 細胞に  $RAR\gamma$  を強制発現させて  $GFR\alpha 1+$ 細胞の RA に対する応答性が変化するかどうかを検討した。

### 2-3-1. RAR $\gamma$ 強制発現マウスの作成

はじめに、Cre タンパク質により FLAG タグ付き RAR $\gamma$  (FLAG-RAR $\gamma$ )を発現する *pCAG-CAT-3xFLAG-Rarg* プラスミドを作成した。このプラスミドは、普遍的プロモーターである CAG の下流に、loxP 配列で挟まれた *CAT* 遺伝子と、FLAG タグ付き *Rarg* 遺伝子を持つ (図 28a)。 *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* 遺伝子を持つ細胞では、Cre タンパク質が共存するとき loxP 配列が相同組み換えを起こして FLAG-RAR $\gamma$  を発現する。はじめに、この *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* 遺伝子が GS 細胞において機能的な RAR $\gamma$  を生成するかを検討した。 *pCAG-CAT-3xFLAG-Rarg* プラスミドと、Cre を発現する pBS185 ベクター、さらに RAR の結合配列である RARE の下流にルシフェラーゼ配列を持ち、RAR が RA と結合するとルシフェラーゼを転写する (RARE)<sub>9</sub>-pGL3 を GS 細胞に共導入し、その後に RA を処置した。すると、組換えを起こしていない GS 細胞群 (pBS185 の代わりに pcDNA3 ベクターを導入した細胞群) と比較して、ルシフェラーゼ活性が顕著に上昇していた (図 28b)。以上のことから、 *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* 遺伝子を持つ細胞では Cre による組換えが起こると、RA に対して強い反応性を獲得することが示された。これは、 *pCAG-CAT-3xFLAG-Rarg* プラスミドにより機能的な RAR $\gamma$  が発現することを示している。

次に、この *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* 断片を受精卵に顕微注入してトランスジェニックマウスを作成した。これを *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>* マウスと交配させて *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスを得た。このマウスでは、TM を投与することで GFR $\alpha$ 1+細胞において CreER<sup>T2</sup> が活性化され、その結果

FLAG-RAR $\gamma$  が発現することが期待される。このマウスに TM を投与したところ、GFR $\alpha$ 1+細胞群のうち一部の細胞で FLAG の発現が認められた (図 29a)。さらに、FLAG+細胞は同時に RAR $\gamma$  を強く発現しており (図 29b)、このマウスに TM を投与することで GFR $\alpha$ 1+細胞の一部で FLAG-RAR $\gamma$  の発現が誘導されることが示された。

### 2-3-2. レチノイン酸に対する RAR $\gamma$ 強制発現 GFR $\alpha$ 1+精原細胞の応答

はじめに、VAD 状態にした *Gfra1-CreERT2; CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスを用い、FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞が、VA 投与によってどのような分化運命をたどるかを検討した。TM 投与によって GFR $\alpha$ 1+細胞に FLAG-RAR $\gamma$  を発現させたのち、FLAG を標識に FLAG-RAR $\gamma$ +細胞の運命を追跡した (図 30)。VA 投与前 (TM 投与 2 日後) では、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞において KIT の発現はほぼ認められず、RA が存在しない場合には RAR $\gamma$  は分化に関して大きな影響を与えないことが示唆された。VA 投与 2 日後、多くの FLAG+, KIT+細胞が出現し、RAR $\gamma$ +細胞を強制発現していない GFR $\alpha$ 1+細胞から生み出された KIT+細胞 (GFP+, KIT+細胞 : *Gfra1-CreER/EGFP*) と比較して KIT+細胞の発現率は顕著に高かった (図 31、32)。この結果は、GFR $\alpha$ 1+細胞は RAR $\gamma$  を発現するだけで、RA によって KIT+細胞へと分化する能力を獲得することを示している。また FLAG+, KIT+細胞は、NGN3+から生み出された KIT+細胞 (GFP+, KIT+細胞 : *Ngn3-CreER/EGFP*) より高い割合で出現しており、この結果から RAR $\gamma$  を強く発現させることでより迅速で確実に KIT+細胞へと分化することが示唆された (図 32)。次に、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞の VA 投

与 2 日後における GFR $\alpha$ 1 と KIT の発現について免疫染色により観察した。すると、正常なマウスではほとんど観察されない GFR $\alpha$ 1+, KIT+細胞が数多く観察され、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞のうち半数以上 (52%) を占めていた (図 33a, b)。これは、RAR $\gamma$  を強制発現させた GFR $\alpha$ 1+細胞が、RA によって NGN3+状態を介さずに直接 KIT+細胞に分化しているか、あるいは NGN3+状態を経由したとしてもわずかな期間で KIT+細胞へと分化したことが考えられる。

次に、通常環境下 (VA 存在下) で飼育した同マウスを用いて、定常状態において FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞が、その数を維持できるか検討した (図 34)。対照として、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-EGFP* マウスにおける GFP+細胞を追跡した。TM 投与直後 (2 日後) では、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞 (実験区) でも GFP+細胞 (対照区) においても、約 80% が GFR $\alpha$ 1+細胞であった (図 36, 37 day 2)。ラベル 10 日後までには、一周 8.6 日の精細管周期の 1 周期が、全ての精細管領域で完了したと考えられる。このとき、対照群である GFP+細胞は増加して、NGN3+細胞や KIT+細胞を生み出しながらも GFR $\alpha$ 1+細胞数は維持するという、典型的な幹細胞としての動態を見せた (図 36)。この結果は、GFR $\alpha$ 1+細胞が自己の細胞数を維持しながら分化細胞を生み出しているというこれまでの報告 (Hara et al., 2014) および、VAD マウスにおける GFR $\alpha$ 1+細胞の追跡実験の結果 (図 12, 17) と一致している。

一方で、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞は分化に偏る運命を見せた。すなわち、GFR $\alpha$ 1+細胞として残っている細胞が 10 日の間に約半数にまで減少した (図 35, 37)。さらに、NGN3+細胞数もほとんど増加が見られなかった。一方、多くの FLAG-RAR $\gamma$ +細胞が KIT+に転換しており、標識細胞全体に占める KIT+細胞の

割合は有意に増加した (図 37)。すなわち、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞は増殖したが、その多くが KIT+細胞に分化したと判断できる。また、組換え直後 (TM 投与 2 日後) に GFR $\alpha$ 1+細胞のうち 16%観察された FLAG-RAR $\gamma$ +細胞は、30 日後には 4%、50 日後には 0.6%にまで減少していた (表 4)。以上の結果は、GFR $\alpha$ 1+細胞において RAR $\gamma$  を強制発現した結果、GFR $\alpha$ 1+細胞の運命が分化方向に向かったことを意味する。すなわち、GFR $\alpha$ 1+細胞が RA に暴露されても分化せず未分化のまま留まるのは、同細胞で RAR $\gamma$  が発現していないことが主な要因であることが示唆された。

また、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-EGFP* の正常マウスに TM を投与して 4 日後では、ステージの IX-XI では FLAG-RAR $\gamma$ +細胞の 71%が KIT を発現していたが、ステージ IIX-IV では 20%、V-VIII では 12%と、ほとんどの FLAG-RAR $\gamma$ +細胞が KIT を発現していなかった (図 38)。TM 投与してから FLAG-RAR $\gamma$  が発現するまでの時間差を考慮すると (1-2 日間)、TM を投与して 4 日後にステージの IX-XI に存在する FLAG-RAR $\gamma$ +細胞は、ステージ VII-IX あたりで FLAG-RAR $\gamma$  の発現が誘導された細胞であると考えられる。つまり、ステージ VII-IX を経験した FLAG-RAR $\gamma$ +細胞で KIT の発現率が高いと言える。FLAG-RAR $\gamma$ +, GFR $\alpha$ 1+細胞は RA が作用して初めて KIT を発現するので、この結果はステージ VIII あたりで RA 濃度が上昇するというこれまでの知見と矛盾しない (Hasegawa and Saga, 2012; Hogarth and Griswold, 2010; Sugimoto et al., 2012)。

### 3. RAR $\gamma$ の発現を制御する因子の探索

以上の結果は、GFR $\alpha$ 1+細胞は RAR $\gamma$  を発現していないために RA シグナルを受容しないことで未分化状態を維持し、一方 NGN3+細胞は RAR $\gamma$  を発現しているために RA のシグナルを受けて分化することを示唆する。このことから、RAR $\gamma$  の発現制御こそが GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の性質を分ける鍵であると言える。そこで次に、RAR $\gamma$  の発現を制御するメカニズムの解明を試みた。

#### 3-1. RAR $\gamma$ 発現の転写レベルでの制御の検討

第一に、RAR $\gamma$  の発現制御が転写調節によるものか、転写後調節によるものかを検討するため、転写直後でスプライシング前の *Rarg* の mRNA 発現について GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞間で比較した。そのために、*Rarg* 遺伝子が転写された直後にのみ存在するイントロン領域の転写産物を、定量 RT-PCR によって比較した。すると、GFR $\alpha$ 1+細胞と比較して NGN3+細胞でこの発現が高かった (図 39)。以上のことから、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の間で見られる RAR $\gamma$  の発現の差は、転写調節が主要な制御要因であると考えられた。

#### 3-2. GDNF と FGF2、NGN3 による *Rarg* 発現の制御

in vivo において、GFR $\alpha$ 1 のリガンドである GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) は精子形成に必須の液性因子である。GDNF を過剰発現させると A<sub>undiff</sub> が異常に増加し、一方 GDNF の変異体 (ヘテロ接合体) では生後に一度成立した精子形成が進行性に障害を受け、幹細胞が正常に維持されない (Meng et al., 2000; Yomogida et al., 2003)。in vitro においては、GS 細胞

が増殖を繰り返して未分化状態を維持するために GDNF、FGF2 の液性因子が必須であることが報告されている(Ishii et al., 2012; Kubota et al., 2004a, b)。そこで、これら 2 種の液性因子の *Rarg* 発現に対する影響を、GS 細胞を用いて検証した。

通常、GS 細胞は GDNF と FGF2 を含む培養液中で培養し、GFR $\alpha$ 1 の発現が高く保たれている(Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Koubova et al., 2006)。これまでの報告で示されているように、この培地から GDNF を除去すると *Ngn3* の発現が有意に上昇した(Grasso et al., 2012; Oatley et al., 2006) (図 40a)。さらに、FGF2 も除去することで、*Ngn3* 発現は更に促進された。RAR $\gamma$  は NGN3 とほぼ一致して発現していることから (図 24)、RAR $\gamma$  の発現に対する GDNF、FGF2 の影響も検討した。すると、*Ngn3* と同様に GDNF を除去することで *Rarg* の発現が上昇し、この発現は FGF2 を除去することでより強く促進された (図 40b)。次に、一過性形質転換によるルシフェラーゼアッセイにより、これらの液性因子による *Ngn3* と *Rarg* の転写制御を検討した。*Ngn3* の上流 6.7kpb を含むルシフェラーゼ発現ベクター (*Ngn3-luc*) (図 41a)を GS 細胞に導入し、同様に 4 種の培地で 2 日間培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した。すると GDNF と FGF2 を除去することでルシフェラーゼ活性が上昇し、GDNF、FGF2 の両方が *Ngn3* 遺伝子の転写を抑制していることが示された(図 41b)。さらに、同様の方法で *Rarg* の上流 7 kbp と、第三エクソン中の開始コドンまでを含む配列を上流に持つルシフェラーゼ発現ベクター (RAR $\gamma$ -*luc*) (図 41c) を用いてルシフェラーゼ活性の測定を行ったところ、*Ngn3* と同様に *Rarg* も GDNF と FGF2 により転写が抑制されていることが示された (図 41d)。一方で、複合体



を形成することで GDNF の受容体として機能する *Gfra1* と *Ret* は、GDNF を除去した場合に発現が低下し、この発現低下は FGF2 を同時に除去したときに増強された (図 40c、d)。以上のことから、GDNF は *Ngn3* と *Rarg* の転写を抑制し、*Gfra1* と *Ret* の発現を促進することが示された。また FGF2 は単独では影響が小さいが、GDNF と同様の作用を示すことが明らかとなった。

次に、RAR $\gamma$  の上流で機能する制御因子について検討した。NGN3 は転写因子であるので、*Rarg* の発現を制御している可能性が考えられた。そこで、GDNF、FGF2 存在下で *Ngn3* 発現ベクターと RAR $\gamma$ -luc を共導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。すると、NGN3 によって *Rarg* の転写が促進されることが分かった (図 40b)。また、GDNF、FGF2 非存在下で上昇していた *Rarg* の発現は *Ngn3* に対する siRNA により抑制された (図 43b)。これらの結果から、NGN3 は *Rarg* の発現に促進的に関与していることが示された。さらに、NGN3 は自身の転写も促進しており (図 42a)、*Rarg* と同様に GDNF、FGF2 非存在下で上昇していた *Ngn3* の発現は siRNA によって抑制された (図 43a)。以上の結果から、*Rarg* の発現は GDNF や FGF2 によって抑制されており、一方 NGN3 によって促進的に制御されていることが示された。また、この GDNF や FGF2 は *Ngn3* の発現も抑制するため、これらの *Rarg* の発現抑制の少なくとも一部は *Ngn3* の発現を抑制することにより行われている可能性が示唆された。さらに、*Ngn3* の発現は自身によって促進されることも示された。

#### 4. GFR $\alpha$ 1+精原細胞数と NGN3+精原細胞数の周期的変動

最後に、定常状態における精細管周期と、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の細胞

数の関係を検討した。これまで、精細管周期に伴って  $A_{undiff}$  の数が変動することは知られていたが (Tegelenbosch and de Rooij, 1993)、 $A_{undiff}$  を構成する  $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の細胞数の変動については、先行論文(Grasso et al., 2012; Yoshida et al., 2004)はあるものの、両者を直接比較した詳細で定量的な報告はなされていない。そこで、精巣切片を用いた *in situ hybridization* により、各ステージの *Gfra1*、*Ngn3*、*Kit* を発現する精原細胞数を、セルトリ細胞あたりの細胞数として計数した。各精細管断面のステージとセルトリ細胞数は、隣接切片を PAS-H 染色することにより判定した (表 5、図 44)。

第一に、VAD マウスに VA 投与した際に  $GFR\alpha 1+$ 細胞数が一定であったように (図 6)、*Gfra1+*細胞は精細管周期を通してほぼ一定数が維持されていた。一方で、*Ngn3+*細胞の数は精細管周期に応じて増減し、ステージVIIまで徐々に増加し、ステージVIIIからは減少してステージXIIで最も少なくなった。同時に、分化型精原細胞である *Kit+*細胞は、ステージVII以降急速に数を増やした (図 44)。この細胞群は後に精母細胞となって減数分裂を経て精子細胞へと分化する (Russell et al., 1990)。これらの結果は、ステージを II-IV、VII-VIII、IX-XI の 3 つに分類したときに、この間で  $GFR\alpha 1+$ 発現細胞数がほぼ一定であること、 $GFR\alpha 1-$ の  $A_{undiff}$  の出現、あるいは *Ngn3+*細胞の出現がステージの II から VIII にかけて高いことを記した先行論文の結果と合致した (Grasso et al., 2012; Yoshida et al., 2004)。

この結果は、これまでの結果から得られた、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞の RA に対する反応性の違いを考慮すると、以下のように考えることができる。「ステージVII-VIIIで RA が合成され、 $NGN3+$ 細胞のみが RA に反応して分化して減少

し、KIT+細胞が増加する。しかし、GFR $\alpha$ 1+細胞は RA によって分化せず、周期を通して一定数を維持しながら徐々に増殖するとともに NGN3+細胞を供給する。」このように、A<sub>undiff</sub> は RA に対する反応性の異なる 2 種の細胞集団を準備しておき、これらが RA シグナルに暴露されることで、自己を維持する集団 (GFR $\alpha$ 1+細胞) を残したまま、分化準備が出来ている集団 (NGN3+細胞) が分化して分化細胞 (KIT+細胞) を生み出していると考えることが出来る。

## IV. 考察

### 結果の総括

ほ乳類精巣において精子を継続的に生み出すことは、確実に子孫を残して種を維持するために必須な営みである。精子形成は、ヒトの場合 50-60 年以上、マウスでも 2 年近く継続する。この継続する精子形成は、精子幹細胞が分化と自己維持のバランスを取り続けることによって保証される。しかし、その細胞レベルでのメカニズムは明らかにはなっていなかった。本研究では、精子幹細胞の集団（未分化型精原細胞； $A_{undiff}$ ）が、強力な分化誘導シグナルである RA に対して、分化に関して異なる反応性を示す不均一な細胞集団からなることを明らかにした。さらに、これらの精子幹細胞の性質の違いをもたらす分子メカニズムを同定した。それによって、精巣組織の中で精子幹細胞集団が、未分化な集団を維持しつつ分化細胞を産み出す新規の機構が浮かび上がってきた。今回の結果を踏まえ、新たに見えてきた幹細胞システムについて考察する。

#### 1. NGN3+精原細胞と GFR $\alpha$ 1+精原細胞の性質の違い

$A_{undiff}$  は GFR $\alpha$ 1 を発現している細胞集団と NGN3 を発現している細胞集団の 2 種で構成されている。これまでの報告から、定常状態において GFR $\alpha$ 1+細胞が「真の幹細胞」actual stem cell として働いており、NGN3+細胞は「潜在的幹細胞」potential stem cell として働いていることが明らかとなっている (Hara et al., 2014; Nakagawa et al., 2007; Nakagawa et al., 2010; Yoshida, 2012)。つまり、定常状態では GFR $\alpha$ 1+細胞が自己を維持しながら分化細胞を生

み出し、NGN3+細胞は transit amplifying cell として、ほとんど自己複製することなく、分化型精原細胞、さらに減数分裂を経て精子へと分化する。しかし、NGN3+細胞は GFR $\alpha$ 1+細胞に逆戻りすることができ、幹細胞として振る舞う能力は維持している。以上のように、これまでの研究から見えてきた GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞のふるまいは全く異なっている。しかし、どのような細胞内の分子基盤によって両者の振る舞いの違いが生み出されているかは知られていなかった。本研究では、パルスラベル法を用いて細胞の運命追跡を行い、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の性質の相違点を明確にした。更に、両者の性質の違いをもたらす分子基盤について、少なくともその重要な一端を解明した。

NGN3+細胞の運命追跡実験により、RA によって NGN3+細胞は KIT+細胞に分化することが示された。一方 GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡実験では、GFR $\alpha$ 1+細胞は RA に暴露されてもすみやかに分化することなく、未分化状態を保つことが示された。しかし、徐々に増殖して NGN3+細胞を供給している。RA がほとんど存在しない VAD 状態でも同様に、GFR $\alpha$ 1+細胞から NGN3+細胞の供給が起こっていることから、GFR $\alpha$ 1+細胞から NGN3+細胞への転換に RA シグナルは必須ではないことがわかった。このように本研究では、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞は、RA シグナルに対する反応性が大きく異なることが明らかとなった。この RA に対する反応性の違いが、両者の振る舞いの違いを生み出していたと考えられる。actual stem cell と potential stem cell の振る舞いを分ける性質の違いに着目して、これを明確にした報告は本研究が初めてである。

## 2. GFR $\alpha$ 1+精原細胞と NGN3+精原細胞の性質を決める因子

GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の RA に対する反応性の違いを産み出す分子基盤を明らかにするために、マイクロアレイ解析により RA シグナリング関連遺伝子の発現を GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞間で比較した。その結果、RA 受容体の一つである RAR $\gamma$  の発現が NGN3+細胞で高いことが分かった。さらに、GFR $\alpha$ 1+細胞に RAR $\gamma$  を強制発現させたところ、GFR $\alpha$ 1+細胞が RA により分化することが分かった。このことから、RAR $\gamma$  の有無が GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の性質の違いを生み出す主要な要因であることが示された。つまり、GFR $\alpha$ 1+細胞は RAR $\gamma$  を発現していないために RA シグナルを受け取らず、未分化状態を保っている。一方 NGN3+細胞は、RAR $\gamma$  を発現しているために RA シグナルを受容することができ、分化方向に進行する、と考えることができる。

## 3. NGN3+精原細胞はどのような細胞か

actual stem cell である GFR $\alpha$ 1+細胞が、ただ一つの遺伝子 RAR $\gamma$  だけを発現することで分化する細胞へと運命を転換したことは驚きであった。また、マイクロアレイの結果から、*Rarg* 以外のほとんどの RA 関連遺伝子の発現は GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞で大きな差を示さなかった。さらに、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の間で、ゲノムのエピジェネティックな状態に大きな差は認められないことも報告されている(Shirakawa et al., 2013)。以上のことから、「RA に反応した分化のしやすさ」に関して、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞ではほとんど同じ能力を持つが、唯一、鍵となる RAR $\gamma$  の発現が NGN3+細胞でのみ起こるために、RA に対する反応性に大きな違いが生じると考えることができる。以

上のことをふまえると NGN3+細胞は単純に分化途中である transit amplifying cell ではなく、「幹細胞としての性質を持ちながらも分化誘導因子 (RA) に対する反応性を獲得した細胞」であると言えるのではないだろうか。また、GFR $\alpha$ 1+細胞に戻ることができる予備細胞として NGN3+細胞を準備することは、傷害時でも GFR $\alpha$ 1+細胞を補充することができ actual stem cell を枯渇させないための保証システムになる。また、一定間隔で分化シグナル (RA) が作用したときに、必ず分化する細胞を一定数準備しておくことにもなり、絶えず成熟精子を生み出すことができる。このように NGN3+細胞は、強固な幹細胞の維持と安定した分化細胞の供給を両立するためにはなくてはならない細胞である。

#### 4. RAR $\gamma$ と RAR $\alpha$ の発現とその働き

DNA マイクロアレイ解析や強制発現の実験から、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の RA に対する性質の違いは、主に RAR $\gamma$  発現の違いに起因するものだと考えられた。RA 受容体には RAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つアイソタイプがある。RAR は RA と結合するのみならず、自ら DNA に結合して転写因子として働く核内受容体である。そのため RAR タンパク質が発現していなければ RA シグナルは作用せず、RA シグナルにおいて最も重要な因子の一つであるといえる。免疫染色により RAR $\gamma$  の発現を検討すると、RAR $\gamma$  は NGN3+細胞の核に局在して強く発現し、一部の KIT+細胞の細胞全体に弱く分布していた。この結果は、A $\alpha$ 1 や A $\alpha$ 1 において RAR $\gamma$  の発現が認められること、A $\alpha$ 1 の中でも GFR $\alpha$ 1-細胞で発現が見られるという先行研究の報告と一致している (Gely-Pernot et al., 2012)。それに加え、本研究では核に局在した RAR $\gamma$  発現が NGN3 発現とほぼ完全に一致して

いることを明らかにした(図 24)。

一方、他の RA 受容体では、RAR $\alpha$  が GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の両方で発現していた(図 23)。先行研究では、*Ngn3-Cre* 遺伝子により *Ngn3*+細胞特異的に RAR $\gamma$  を単独で欠損させると精子形成に異常を来すが、*Ngn3*+細胞特異的に RAR $\alpha$  を欠損させても異常は見られないことが示されている(Gely-Pernot et al., 2012)。このことから、NGN3+細胞においては、RAR $\gamma$  がより重要な働きをしていることがわかる。また、RAR $\gamma$  の 50%有効濃度は~0.5-2nM、RAR $\alpha$  は~20-200nM と報告されており、RAR $\gamma$  は RAR $\alpha$  と比較すると RA に対する反応性が強い。このことから、RAR $\gamma$  の発現の増減が細胞の RA への反応性により大きな影響を与えていることが予想される(Astrom et al., 1990; Brand et al., 1988; Giguere et al., 1990)。しかし、*Ngn3*+細胞特異的に RAR $\gamma$  と RAR $\alpha$  を二重欠損させると RAR $\gamma$  単独で欠損させたものより重篤な精子形成異常が現れる事から、NGN3+細胞で発現する RAR $\alpha$  も正常な精子形成の維持に関与し、補助的な役割を果たしていると考えられる。本研究において私は、RAR $\gamma$  が発現していない GFR $\alpha$ 1+細胞に強制的に RAR $\gamma$  を発現させると RA に反応して分化することを見いだした。今回の gain-of-function の実験と、先行研究の loss-of-function の実験結果を合わせて考えると、RAR $\gamma$  の発現が A<sub>undiff</sub>を分化方向に向かわせるための中心的な要因あることが示唆される。RAR $\gamma$  欠損マウスで精子形成に異常が現れたのは、RA 刺激を受けても受容体が存在しないために NGN3+細胞が正常に分化しなかったためと推察できる。NGN3+細胞が分化せずに未分化のまま留まっていれば、分化細胞の供給は進まず精細管内は A<sub>undiff</sub>のみが残るはずである。事実 12 ヶ月齢の RAR $\gamma$  欠損マウスの精細管では A<sub>undiff</sub>



はみとめられるものの、ほとんど分化細胞が存在しなかった(Gely-Pernot et al., 2012)。このとき少数ながら *Kit*+細胞が観察されるのは *RAR $\alpha$*  が補助的に働いているためではないだろうか。このように *NGN3*+細胞における *RAR $\gamma$*  の発現は、正常な精子形成を持続させるために非常に重要であると考えられる。

## 5. 精子形成におけるレチノイン酸シグナルの制御

*RA* は多くの組織の発生や組織の恒常性を維持する上で非常に重要な役割を果たす。これは、生殖に関連する過程でも同様であり、様々な方法で *RA* の働きが精密に制御されていることが分かっている。例えば、哺乳類の雌雄決定で観察されるような、*Cyp26b1* により *RA* を分解する機構 (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006)、体細胞分裂と減数分裂の切り替えにおいて *DMRT1* が示すような *RA* の標的遺伝子の発現を抑制する機構(Matson et al., 2010)などが報告されてきた。私は今回新しく、*RA* 受容体の発現の有無によって *RA* 受容能を調節することで精子幹細胞システムが維持される機構を示した。

*RA* は精子形成において非常に重要な役割を担っている。とりわけ、本研究で解析した未分化型精原細胞から分化型精原細胞を生み出す過程とともに、体細胞分裂をする精原細胞が減数分裂に入る過程の2つの分化過程の制御が重要である。本研究の成果により、これらの2つの過程において *RA* の作用を巧妙に制御する機構が明らかとなってきた。すなわち、未分化型精原細胞は、*RAR $\gamma$*  発現によって *RA* 受容能を獲得すると分化方向に傾く“potential stem cells”となり、実際に *RA* を受けると *KIT*+細胞 (分化型精原細胞) へと分化する。*KIT*+細胞は *DMRT1* を高発現することで減数分裂に入ることなく、体細胞分裂を持

続する。さらに、続いて DMRT1 の発現が低下して RA シグナルを受けると、減数分裂に必要な RA 標的遺伝子の発現抑制が解除され減数分裂が始まる。KIT+細胞でも RAR $\gamma$  の弱い発現が確認されること、分化段階が Ngn3+細胞以降の細胞すべてで Rara が欠損しているマウス (Ngn3+特異的 Rara 欠損マウス) において精子形成に異常が観察されないことから、減数分裂の際にも RAR $\gamma$  が関与しているのかもしれない。このように、異なる分化段階の細胞が、同じ RA シグナルを受けるともかかわらず複数の異なった反応を示すのは、各段階で RA シグナルの制御方法を変えることで RA の標的遺伝子の発現に変化を与えているためではないだろうか (図 45)。一方で、他の転写因子の関与、エピジェネティックな状態や、RAR ファミリー間での標的遺伝子の違い、など他にも多くの要因も関与している可能性は十分に考えられる。これら要素が組み合わさることで RA による制御が更に多彩で精密になることだろう。今回の研究は、精子形成に留まらず多くの RA による制御機構に対して理解を深めるために重要な知見であると言える。

## 6. RAR $\gamma$ の発現制御機構

本研究の結果、GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の性質を大きく分ける要因は RAR $\gamma$  の発現の有無であると考えられた。したがって、RAR $\gamma$  の発現がどのような機構によって制御されているかが、次に解決すべき課題として浮上した。RAR $\gamma$  の発現制御に関しては転写制御と転写後の制御の2つの可能性が考えられる。

転写調節を受けているか検証するため、転写直後でスプライシングなど転写

後修飾を受けていない *Rarg* の mRNA 発現に着目した。*Rarg* が転写された直後にのみ認められるイントロンの転写産物を定量的 RT-PCR で定量した結果から、*Rarg* の転写活性が NGN3+細胞で高いことが分かった。*Rarg* が NGN3+細胞でより多く転写されているか、あるいは GFR $\alpha$ 1+細胞で転写の抑制がかかっている可能性が考えられた。

細胞内における *Rarg* の発現制御は、細胞外のシグナルを受けて引き起こされている可能性がある。GDNF と FGF2 は幹細胞を維持する際に重要な因子であることが知られている。今回の結果から、GS 細胞において GDNF と FGF2 が *Rarg* の転写を抑制し、さらにこの制御の一部が *Ngn3* の発現抑制を介して行われることを明らかにした。GFR $\alpha$ 1+細胞では受容体を持つために GDNF のシグナルを受けて RAR $\gamma$  発現が抑制され、一方で NGN3+細胞では転写因子である NGN3 が *Rarg* の転写を促進させ、RAR $\gamma$  を発現させていると考えることが出来る。

さらに、GDNF と FGF2 は *Ngn3* の発現を抑制し、*Gfra1* と *Ret* の発現を促進させることが示された。これらの結果から、*in vivo* において以下の制御機構が働いている可能性が考えられる。つまり、細胞が GFR $\alpha$ 1/*Ret* を介して GDNF シグナルを受けると、ポジティブフィードバックが働いて GFR $\alpha$ 1/*Ret* をより強く発現して GFR $\alpha$ 1+細胞として安定化する。それと同時に、*Ngn3* の発現を抑制して NGN3+状態への移行を抑制する。一方、GDNF シグナル系が阻害されるとその抑制が外れて *Ngn3* が転写され、ポジティブフィードバックにより自身の発現を促進させて NGN3+細胞として安定する。そして転写因子である NGN3 は RAR $\gamma$  の発現を促進し、NGN3+細胞は分化能を獲得する。この制御機構によ

り GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞は安定して存在し、NGN3+細胞のみ RAR $\gamma$  を発現して RA により分化できる (図 46)。しかしながら、*Ngn3* 欠損マウスの精巣ではっきりとした異常が観察されておらず、RAR $\gamma$  の発現制御には NGN3 以外の因子も関与している可能性が考えられる (未発表データ)。また、近年 GFR $\alpha$ 1+細胞の一部で NGN3 などの basic-helix-loop-helix 構造を持つ転写因子の機能を阻害する機能を持つ inhibitor of DNA binding 4 (Id4) が高発現していることが明らかにされ、GFR $\alpha$ 1+細胞において RAR $\gamma$  の発現を抑制する機構が存在することも予想される (Chan et al., 2014)。

しかしながら、FGF2 の *in vivo* における発現や働きが十分に分かっていないために *in vivo* においてこれら因子が実際に RAR $\gamma$  発現にどのような影響を与えているかは不明である。実際、*in vivo* において GDNF の発現には周期性があり (Johnston et al., 2011; Sato et al., 2011)、ステージ XII-II.III で発現がピークになる (Grasso et al., 2012)。しかし、この時期に *Ngn3*+細胞数が増加しており、GDNF が *Ngn3* の発現を抑制する、という今回の結果とは矛盾するよう見える。これは、FGF2 や他の FGF ファミリー、その他の様々な因子が NGN3+細胞の発現に関与しているため、より複雑な制御機構が存在する可能性を示唆している。さらに、ライブイメージングによる GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞の挙動解析から、どちらの細胞も基底膜上のセルトリ細胞の間をダイナミックに移動していることが明らかになっており (Hara et al., 2014; Yoshida et al., 2007)、*A<sub>undiff</sub>* は精細管内を移動しながら様々な細胞外シグナルを受けて、細胞内の状態を変化させ続けていることが予想される。様々なシグナルがどのような機構で制御し合い RAR $\gamma$  の巧妙な発現制御が実現されているのかは、今後の興味深い

課題である。

## 7. 精子幹細胞の精細管周期におけるダイナミクス

これらの結果をまとめると、精細管周期を通して精子幹細胞集団は、以下のようなダイナミクスを示すと考えられる (図 47)。すなわち RA が存在しないステージでは、 $A_{undiff}$  は  $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞で構成されている (図 47a)。  
RA 合成が上昇するステージ (ステージVII-VIII) になると、精細管内の広範囲で RA が合成され、 $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞を含めた細胞全体が RA に暴露されると考えられる (図 47b)。そのうち、 $RAR\gamma$  を発現している  $NGN3+$ 細胞のみが RA シグナルを受け取り、それに反応して  $KIT+$ 細胞に分化する。一方で、 $RAR\gamma$  を発現していない  $GFR\alpha 1+$ 細胞は RA に暴露されてもシグナルを受け取ることなく、 $A_{undiff}$  のまま未分化状態を維持する (ステージVII-XII、図 47c)。  
 $GFR\alpha 1+$ 細胞は RA が存在しないステージでも  $NGN3+$ 細胞を供給して  $NGN3+$ 細胞の細胞数を増やす (図 47d)。その結果、 $A_{undiff}$  は再び、 $GFR\alpha 1+$ と十分な数の  $NGN3+$ 細胞で再構成されることになる (ステージIV-VII、図 47a)。その後、RA に暴露されると  $NGN3+$ 細胞のみが分化し、 $A_{undiff}$  として残された  $GFR\alpha 1+$ 細胞が  $NGN3+$ 細胞を供給する。このサイクルを繰り返すことで、 $A_{undiff}$  全体として枯渇することなく、持続して分化細胞をうみだすことができる。このような、一見独立した現象に見える、分化シグナルに対して反応の異なる 2 種の未分化細胞と、分化シグナルが周期的に合成される現象が組み合わさることで円滑で安定した幹細胞システムを形成する。マウス精子幹細胞ではこのようなシステムが働いているために、自己を維持しながら安定して分化細胞をつくり

続けていると考える。

## 8. Open niche における新たな幹細胞維持のパラダイム

一般に幹細胞は、幹細胞ニッチと呼ばれる微小環境により維持されていると考えられる。従来議論されてきた幹細胞ニッチは、多くが、“definitive niche”あるいは“closed niche”とよばれる限定された狭い領域である (Fuller and Spradling, 2007; Stine and Matunis, 2013)。この場合は、ニッチに位置する細胞は未分化状態に保たれており、ニッチから外れた細胞は分化する運命をたどる。しかし、マウス精子幹細胞システムでは幹細胞が血管近傍に偏るものの、精細管全体にわたって散在している。また、幹細胞と分化細胞は同じ環境に存在すると考えられる。このような“facultative”あるいは“open” niche では、どのようなメカニズムで幹細胞を維持しつつ、分化細胞を生み出すバランスを取っているのか、これまでほとんど議論されてこなかった。

本研究の結果から、マウスの精子幹細胞システムでは、限定されたニッチがなくても幹細胞を維持する方法として、従来の考え方とは異なる方法をとっていることがわかった。つまり、分化シグナルに暴露される前から、幹細胞の集団自身が分化シグナルに対して反応性の異なる不均一な細胞に分かれているのである。さらに分化シグナルが合成されない期間では、分化シグナルに応答性のない細胞から応答性のある細胞を生み出すことができ、分化予定細胞は枯渇することがない。マウス精子形成以外でも、Open niche をもつ幹細胞系では同様のメカニズムで幹細胞の維持と分化細胞の産生を行っているのではないだろうか。

しかし、このシステムを成立させるには RA が作用する前に予め細胞の性質が 2 種に分かれている必要がある。図 12、17 でも見られるように、マウス精子幹細胞システムには GFR $\alpha$ 1+細胞を一定に保つ何らかの仕組みが備わっていると考えられている (Hara et.al. 2014)。これはすなわち、一定数の細胞で RAR $\gamma$  の発現を抑制するための制御であるとも言い換えられる。今後 RAR $\gamma$  の発現制御機構をより詳細に明らかにすることで、精子幹細胞システムへの理解がより深まると考える。

## 結語

本研究によって、マウス精子幹細胞が、細胞外からの分化シグナルに応答する細胞集団と、応答しない集団の 2 種の細胞群から構成されていることが明らかとなった。この細胞群に分化シグナルが一定間隔おきに作用することで、幹細胞は未分化な集団を維持しながら一定数の分化細胞を生み出し続けることができる。今回、精子幹細胞の性質の解明を通して明らかとなった幹細胞システムは、限定されたニッチがない、あるいははっきりとしたニッチが明らかになっていない他の組織幹細胞システムにも共通する現象である可能性が考えられる。従って、本研究成果は精子幹細胞システムのみならず、多くの組織の幹細胞維持システムを理解する上で重要な基盤となると考える。

## V. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々に御世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

研究活動全般にわたり懇篤なご指導を賜り、論文校閲に多大なる尽力を惜しまれなかった吉田松生博士に心から御礼申し上げます。また、貴重な御教示を賜りました基礎生物学研究所 高田慎治博士、同研究所 田中実博士、九州大学 林克彦博士、筑波大学 小林悟博士、国立遺伝学研究所 相賀裕美子博士に心より感謝申し上げます。さらに、*CAG-CAT-EGFP* マウスを譲与してくださった大阪大学 宮崎純一博士、*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>* マウス、*Gfra1-EGFP* マウスを譲与してくださったワシントン大学 J. Milbrandt 博士、神戸大学および理研 CDB 榎本秀樹博士、GS 細胞を譲与してくださった横浜市立大学 小川毅彦博士ならびに佐藤卓也博士、(RARE)<sub>9</sub>-pGL3 プラスミドを譲与してくださった濱田博司博士に深く御礼申し上げます。*CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウス作成にあたり、高橋智博士を始め筑波大学動物資源センターの方々に多大なるご支援を賜りました。また、*in vivo* における細胞採取にあたっては、野田千代氏のご協力のもと行いました。マウスの飼育管理にあたっては、モデル動物研究支援室の方々にご助力を賜りました。心より御礼申し上げます。*in situ hybridization* を用いた組織観察においては杉本亮氏、マイクロアレイの遂行に当たっては徳江萌氏に大変ご尽力いただきました。京都大学 中川俊徳博士には細胞実験をはじめ数々のご助言を賜りました。原健士朗博士には本論文を御校閲頂きました。深く感謝致します。また、日頃有益な討論をしてくださり、私の研究生活を支えてく



ださいました吉田研究室のみなさまに心より感謝致します。

最後に、博士課程に進学する機会を与えてくださり、私を温かく見守り続けてくれた両親に深く感謝致します。ありがとうございました。

## VI. 参考.文献

Astrom, A., Pettersson, U., Krust, A., Chambon, P., and Voorhees, J.J. (1990). Retinoic acid and synthetic analogs differentially activate retinoic acid receptor dependent transcription. *Biochemical and biophysical research communications* *173*, 339-345.

Blomhoff, R., and Blomhoff, H.K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of neurobiology* *66*, 606-630.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., *et al.* (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* *312*, 596-600.

Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* *332*, 850-853.

Chan, F., Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Yang, Q.E., Bieberich, C.J., Shashikant, C.S., and Oatley, J.M. (2014). Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes. *Genes & development* *28*, 1351-1362.

Chiarini-Garcia, H., Hornick, J.R., Griswold, M.D., and Russell, L.D. (2001). Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod* *65*, 1179-1185.

Chiarini-Garcia, H., Raymer, A.M., and Russell, L.D. (2003). Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* *126*, 669-680.

de Rooij, D.G., and Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology* *21*, 776-798.

Fuller, M.T., and Spradling, A.C. (2007). Male and female *Drosophila* germline stem cells: two versions of immortality. *Science* *316*, 402-404.

Gely-Pernot, A., Raverdeau, M., Celebi, C., Dennefeld, C., Feret, B., Klopfenstein, M., Yoshida, S., Ghyselinck, N.B., and Mark, M. (2012). Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor gamma. *Endocrinology* *153*, 438-449.

Giguere, V., Shago, M., Zirngibl, R., Tate, P., Rossant, J., and Varmuza, S. (1990). Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor gamma expressed in the mouse embryo. *Molecular and cellular biology* *10*,

2335-2340.

Grasso, M., Fusco, A., Dovere, L., de Rooij, D.G., Stefanini, M., Boitani, C., and Vicini, E. (2012). Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis. *Reproduction* *143*, 325-332.

Hara, K., Nakagawa, T., Enomoto, H., Suzuki, M., Yamamoto, M., Simons, B.D., and Yoshida, S. (2014). Mouse Spermatogenic Stem Cells Continually Interconvert between Equipotent Singly Isolated and Syncytial States. *Cell Stem Cell* *14*, 658-672.

Hasegawa, K., and Saga, Y. (2012). Retinoic acid signaling in Sertoli cells regulates organization of the blood-testis barrier through cyclical changes in gene expression. *Development* *139*, 4347-4355.

Hofmann, M.C., Braydich-Stolle, L., and Dym, M. (2005). Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol* *279*, 114-124.

Hogarth, C.A., Arnold, S., Kent, T., Mitchell, D., Isoherranen, N., and Griswold, M.D. (2014). Processive Pulses of Retinoic Acid Propel Asynchronous and Continuous Murine Sperm Production. *Biol Reprod.*

Hogarth, C.A., and Griswold, M.D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. *The Journal of clinical investigation* *120*, 956-962.

Huckins, C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cell cycle properties. *Cell and tissue kinetics* *4*, 313-334.

Huckins, C., and Oakberg, E.F. (1978). Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes. *The Anatomical record* *192*, 519-528.

Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2012). FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of *Etv5* and *Bcl6b* through MAP2K1 activation. *Development* *139*, 1734-1743.

Johnston, D.S., Olivas, E., DiCandeloro, P., and Wright, W.W. (2011). Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol Reprod* *85*, 763-769.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* *69*, 612-616.

Kawamoto, S., Niwa, H., Tashiro, F., Sano, S., Kondoh, G., Takeda, J., Tabayashi, K., and Miyazaki, J. (2000). A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett* *470*, 263-268.

Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2474-2479.

Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004a). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* *71*, 722-731.

Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004b). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16489-16494.

Matson, C.K., Murphy, M.W., Griswold, M.D., Yoshida, S., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2010). The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Developmental cell* 19, 612-624.

Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., *et al.* (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287, 1489-1493.

Morales, C., and Griswold, M.D. (1987). Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology* 121, 432-434.

Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598-611.

Nakagawa, T., Nabeshima, Y., and Yoshida, S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Developmental cell* 12, 195-206.

Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., and Yoshida, S. (2010). Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* 328, 62-67.

Oakberg, E.F. (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 99, 391-413.

Oakberg, E.F. (1971). Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *The Anatomical record* 169, 515-531.

Oatley, J.M., Avarbock, M.R., Telaranta, A.I., Fearon, D.T., and Brinster, R.L. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9524-9529.

Perissi, V., and Rosenfeld, M.G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 542-554.

Russell, L., Ettlin, R., Sinha Hikim, A., and Clegg, E. (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, Fl.



Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., and Saga, Y. (2009). The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* *325*, 1394-1398.

Sato, T., Aiyama, Y., Ishii-Inagaki, M., Hara, K., Tsunekawa, N., Harikae, K., Uemura-Kamata, M., Shinomura, M., Zhu, X.B., Maeda, S., *et al.* (2011). Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of Sertoli cells in mouse and hamster testes. *PloS one* *6*, e28367.

Shirakawa, T., Yaman-Deveci, R., Tomizawa, S., Kamizato, Y., Nakajima, K., Sone, H., Sato, Y., Sharif, J., Yamashita, A., Takada-Horisawa, Y., *et al.* (2013). An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity. *Development* *140*, 3565-3576.

Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es, J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., *et al.* (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* *143*, 134-144.

Stine, R.R., and Matunis, E.L. (2013). Stem cell competition: finding balance in the niche. *Trends in cell biology* *23*, 357-364.

Sugimoto, R., Nabeshima, Y., and Yoshida, S. (2012). Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mech Dev* 128, 610-624.

Suzuki, H., Ahn, H.W., Chu, T., Bowden, W., Gassei, K., Orwig, K., and Rajkovic, A. (2012). SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Dev Biol* 361, 301-312.

Suzuki, H., Sada, A., Yoshida, S., and Saga, Y. (2009). The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Dev Biol* 336, 222-231.

Tegelenbosch, R.A., and de Rooij, D.G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation research* 290, 193-200.

Uehara, M., Yashiro, K., Takaoka, K., Yamamoto, M., and Hamada, H. (2009). Removal of maternal retinoic acid by embryonic CYP26 is required for correct Nodal expression during early embryonic patterning. *Genes & development* 23, 1689-1698.

Uesaka, T., Jain, S., Yonemura, S., Uchiyama, Y., Milbrandt, J., and Enomoto, H. (2007). Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype. *Development* *134*, 2171-2181.

van Pelt, A.M., and de Rooij, D.G. (1990). Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice. *Biol Reprod* *43*, 363-367.

van Pelt, A.M., van Dissel-Emiliani, F.M., Gaemers, I.C., van der Burg, M.J., Tanke, H.J., and de Rooij, D.G. (1995). Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis. *Biol Reprod* *53*, 570-578.

Vernet, N., Dennefeld, C., Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., and Mark, M. (2006). Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* *147*, 96-110.

Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y., and Nishimune, Y. (2003). Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol Reprod* *69*,

1303-1307.

Yoshida, S. (2012). Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction* *144*, 293-302.

Yoshida, S., Sukeno, M., and Nabeshima, Y. (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* *317*, 1722-1726.

Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., and Nabeshima, Y. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* *133*, 1495-1505.

Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., and Nabeshima, Y. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol* *269*, 447-458.

Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K.H., and Wang, P.J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC developmental biology* *9*, 38.

Zhou, Q., Nie, R., Li, Y., Friel, P., Mitchell, D., Hess, R.A., Small, C., and Griswold, M.D. (2008). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: an in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biol Reprod* 79, 35-42.

## VII. 図表

表 1. VAD 条件下で飼育したマウスに VA を投与した後に出現する *Gfra1+*, *Ngn3+*, *Kit+*細胞の数

VA投与後日数	<i>Gfra1+</i> 細胞	セルトリ細胞	<i>Ngn3+</i> 細胞	セルトリ細胞	<i>Kit+</i> 細胞	セルトリ細胞
0	378	12349	2401	15757	0	7566
2	181	6641	308	7455	1651	7286
4	367	8247	114	9593	3226	8947

マウスを VAD 条件下で飼育して VA 投与により精子形成を再開させ *in situ* hybridization を行い、各遺伝子を発現する細胞を計数した。それぞれ 2-3 個の精巣断面から観察された細胞数の合計を示す。図 6 でセルトリ細胞あたりの各遺伝子発現細胞数を示す。

表 2. VAD 条件下で飼育した *Ngn3-EGFP* マウスで、VA 投与後に出現する KIT+ 細胞における GFP 発現

VA投与後日数	KIT+ 細胞数の平均	GFP+, KIT+細胞数の平均	KIT+ 細胞中の GFP+細胞の割合の平均
0	5.5±4.2	0.5±0.4	-
2	1438.7±108.9	1424±110.7	99.0±0.2
4	3036.3±421.1	3006.7±406.4	99.2±0.3

*Ngn3-EGFP* マウスを VAD 条件下で飼育し、VA 投与により精子形成を再開させた。KIT+細胞数、KIT+, GFP+細胞数、KIT+, GFP+細胞数/KIT+細胞数 (%) を示す。数値は、VA 投与 0、2、4 日後について、それぞれ 4、3、3 精巣における精細管長さ (cm) あたりの細胞数の平均値と標準誤差を示す。0 日後においては KIT+, GFP+細胞が認められない精巣を含むため、KIT+, GFP+細胞数/KIT+細胞数 (%) の平均値は表記していない。



表 3. マイクロアレイによる GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞間の RA 関連因子、核内受容体が作用する際に働く因子の発現比較

Ratio は  $\log_2([\text{NGN3+}]/[\text{GFR}\alpha 1+])$ を示す。GFR $\alpha$ 1+細胞は 1 個体分から採取した細胞を 1 サンプル、NGN3+細胞は 2 個体分から採取した細胞を 1 サンプルとし、[GFR $\alpha$ 1+] と [NGN3+]はそれぞれ 3 サンプルずつの GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞のシグナル強度の平均を表す。図 22 に散布図を示す。

表 3. マイクロアレイによるGFRα1+細胞とNGN3+細胞間のRA関連遺伝子の発現比較

ID	GeneSymbol	EntrezGeneID	ratio
A_51_P474658	Esr1	13982	2.28
A_55_P2051716	Tbx1	21380	1.87
A_52_P237077	Esr1	13982	1.64
A_55_P2151056	Rarg	19411	1.64
A_51_P501844	Cyp26b1	232174	1.62
A_51_P226711	Ptfla	19213	1.61
A_55_P2164040	Tada2b	231151	1.34
A_55_P2065074	Hdac9	79221	1.32
A_55_P2019009	Ncoa7	211329	1.24
A_55_P2036620	Lrfl1	321000	1.17
A_66_P114585	Mta3	116871	1.11
A_55_P2030883	Esr1	13982	0.94
A_55_P2027822	Cecdc101	75565	0.91
A_51_P140797	Dcaf6	74106	0.89
A_55_P1977850	Sall1	58198	0.87
A_51_P152747	Nrip1	268903	0.82
A_52_P536927	Satb2	212712	0.81
A_51_P399845	Fgf2	14173	0.78
A_55_P2018559	Morf4l1	21761	0.78
A_55_P1981794	Cecdc101	75565	0.74
A_55_P2369474	Nrlh4	20186	0.71
A_55_P2128597	Nrlh3	22259	0.68
A_55_P1993168	Ppargc1b	170826	0.65
A_66_P120249	Nrlh3	22259	0.64
A_66_P126138	Ncoa1	17977	0.6
A_55_P2061386	Chd3	216848	0.56
A_52_P413584	Nrip1	268903	0.55
A_52_P656545	Ogt	108155	0.52
A_55_P2163438	Actn2	11472	0.5
A_55_P2134616	Med12l	329650	0.5
A_55_P2025463	Brp3	268936	0.48
A_55_P2130975	Ncoa1	17977	0.44
A_55_P2031367	Brd1	223770	0.39
A_52_P334562	Vdr	22337	0.39
A_51_P106799	Pparg	19016	0.37
A_51_P108266	Actn2	11472	0.36
A_55_P1983006	Hdac5	15184	0.35
A_51_P441387	Kansl1l	68691	0.33
A_51_P307370	Rxra	20181	0.32
A_55_P1958532	Hr	15460	0.32
A_52_P494686	Kansl1l	68691	0.32
A_55_P2244722	Taf9b	407786	0.31
A_52_P58145	Aldh1a2	19378	0.28
A_55_P2095342	Rara	19401	0.23
A_55_P2153461	Cecr2	330409	0.21
A_55_P2082070	Taf9	108143	0.21
A_55_P1986993	Brd8	78656	0.2
A_55_P2135383	Taf6l	225895	0.19
A_55_P1978481	Nrlh2	22260	0.18
A_55_P2415372	Mta1	116870	0.17
A_55_P2080542	Rbbp7	245688	0.16
A_55_P2036615	Lrfl1	321000	0.13
A_66_P130582	Ncoa1	17977	0.12
A_55_P1967618	Med16	216154	0.12
A_51_P279038	Ppargc1a	19017	0.12
A_51_P481191	Hdac8	70315	0.11
A_51_P508853	Ep400	75560	0.11
A_51_P213334	Hdac11	232232	0.11
A_66_P129029	Taf10	24075	0.09
A_66_P120260	Taf10	24075	0.09
A_51_P432199	Sap30	60406	0.09
A_55_P2024654	Trrap	100683	0.08
A_65_P17492	Med29	67224	0.08
A_52_P175952	Map3k7	26409	0.06
A_51_P417839	Hdac4	208727	0.05
A_55_P2185548	Cdk8	264064	0.04
A_55_P2022094	Mta3	116871	0.03
A_55_P2162537	Ing4	28019	0.03
A_55_P1960873	Mbd3	17192	0.03
A_66_P127024	Mbd3	17192	0.02
A_55_P2008609	Rxrb	20182	0.02
A_55_P1993820	Kdm1a	99982	0.02
A_51_P141521	Sap130	269003	0.01
A_52_P589550	Nr2c1	22025	0.01
A_52_P319541	Med12l	329650	0
A_55_P2077608	Hdac1	433759	0
A_51_P350503	Csrp2bp	228714	-0.01
A_66_P138072	Esr1	13982	-0.01
A_52_P464062	Hdac8	70315	-0.01
A_55_P2170076	Taf9	108143	-0.02

表 3. (続き)

ID	GeneSymbol	EntrezGeneID	ratio
A_55_P2036894	Med29	67224	-0.03
A_55_P2084807	Rarb	218772	-0.04
A_55_P1960626	Satb2	212712	-0.05
A_55_P2049086	Map3k7	26409	-0.05
A_52_P325477	Trim16	94092	-0.05
A_65_P01783	Med28	66999	-0.07
A_55_P1992655	Hdac6	15185	-0.07
A_66_P128384	Hdac1	433759	-0.08
A_55_P1957028	Kat7	217127	-0.08
A_51_P103757	Kat8	67773	-0.08
A_66_P124715	Ppard	19015	-0.08
A_52_P238044	Psmc3ip	19183	-0.08
A_55_P2171993	Mrgbp	73247	-0.08
A_55_P2072551	Ncoa6	56406	-0.09
A_55_P2025974	Ruvbl2	20174	-0.09
A_52_P579876	Suds3	71954	-0.1
A_55_P2154690	Smarca4	20586	-0.11
A_55_P1971347	Mta3	116871	-0.11
A_55_P2081560	Phf20	228829	-0.11
A_55_P2087825	Ncoa2	17978	-0.11
A_52_P561927	Ncor1	20185	-0.12
A_52_P376106	Slc30a9	109108	-0.13
A_52_P402319	Med20	56771	-0.13
A_51_P492087	Pole3	59001	-0.13
A_55_P1962154	Rarb	218772	-0.14
A_55_P2080794	Taf9	108143	-0.14
A_51_P465772	Ruvbl1	56505	-0.15
A_66_P102232	Hmga1	15361	-0.15
A_55_P2095345	Rara	19401	-0.15
A_52_P370473	Msl1	74026	-0.16
A_66_P100789	Kansl2	69612	-0.16
A_55_P1956712	Med28	66999	-0.16
A_51_P416419	Calr	12317	-0.17
A_51_P199567	Med26	70625	-0.18
A_55_P2036459	Med24	23989	-0.18
A_52_P413623	Usp22	216825	-0.18
A_55_P2003789	Taf4a	228980	-0.18
A_55_P2025293	Ss18	268996	-0.18
A_55_P1987302	Eny2	223527	-0.18
A_51_P349662	Taf5l	102162	-0.19
A_51_P483118	Hmga1	15361	-0.2
A_55_P1987449	Ep400	75560	-0.2
A_55_P1955722	Med15	94112	-0.2
A_55_P2128263	Phf21a	192285	-0.2
A_55_P2154684	Smarca4	20586	-0.21
A_55_P2147591	Med27	68975	-0.21
A_51_P161874	Med30	69790	-0.21
A_55_P1964033	Carm1	59035	-0.21
A_66_P107585	Taf2	319944	-0.22
A_55_P2009792	Hdac6	15185	-0.23
A_55_P1970775	Hdac1	433759	-0.23
A_55_P1962419	Cear1	67500	-0.23
A_55_P2036526	Mbd2	17191	-0.23
A_55_P2016877	Nsd1	18193	-0.23
A_51_P159415	Smn3a	20466	-0.24
A_66_P111773	Gatad2a	234366	-0.26
A_55_P2099585	Rarb	218772	-0.26
A_51_P164207	Mta2	23942	-0.26
A_51_P116027	Med27	68975	-0.27
A_55_P2092501	Med1	19014	-0.27
A_55_P2003517	Zfp536	243937	-0.27
A_55_P2123137	Ncor2	20602	-0.27
A_51_P226053	Sra1	24068	-0.27
A_55_P2049602	Kat2a	14534	-0.28
A_55_P2107120	Kansl2	69612	-0.28
A_55_P2165969	Ncor1	20185	-0.28
A_51_P496400	Med9	192191	-0.29
A_55_P2051727	Rnf8	58230	-0.29
A_55_P1972653	Tada3	101206	-0.29
A_55_P1996742	Rbm14	56275	-0.29
A_55_P1987504	Ccnc	51813	-0.29
A_55_P2123822	Rbbp7	245688	-0.29
A_55_P2018407	Sypc3	20962	-0.3
A_51_P116007	Hdac2	15182	-0.3
A_55_P2054540	Crebbp	12914	-0.3
A_55_P2076057	Hmga1	15361	-0.31
A_55_P2108334	Med10	28077	-0.31
A_51_P218953	Zfp536	243937	-0.31
A_51_P141554	Med22	20933	-0.31
A_55_P1975640	Zfp217	228913	-0.31

表3. (続き)

ID	GeneSymbol	EntrezGeneID	ratio
A_55_P2057291	Kansl3	226976	-0.32
A_52_P219943	Epc1	13831	-0.32
A_55_P1972852	Mcrs1	51812	-0.32
A_51_P396708	Med21	108098	-0.32
A_55_P2125241	Brd1	223770	-0.33
A_51_P286814	Ncor2	20602	-0.33
A_55_P2165974	Ncor1	20185	-0.33
A_65_P19089	Esrrg	26381	-0.33
A_51_P202014	Taf12	66464	-0.33
A_55_P2072233	Zechc12	72693	-0.33
A_51_P349803	Med11	66172	-0.34
A_51_P373369	Med4	67381	-0.34
A_51_P307325	Rbbp4	19646	-0.34
A_51_P261107	Ogt	108155	-0.34
A_51_P432069	Trrap	100683	-0.34
A_52_P504068	Cdk8	264064	-0.34
A_52_P78875	Phf12	268448	-0.35
A_51_P380986	Epc1	13831	-0.35
A_51_P172842	Med19	381379	-0.35
A_52_P231737	Actl6a	56456	-0.35
A_55_P2083654	Prmt2	15468	-0.35
A_55_P2048202	Ss18	268996	-0.36
A_55_P1993109	Taf6	21343	-0.36
A_52_P497056	Supt20	56790	-0.36
A_55_P2111419	Eny2	223527	-0.36
A_51_P370286	Med24	23989	-0.37
A_52_P197666	Med12	59024	-0.37
A_55_P2044359	Rxrg	20183	-0.38
A_55_P2071868	Ncoa3	17979	-0.38
A_55_P2034400	Cdk8	264064	-0.38
A_52_P529486	Wdr77	70465	-0.38
A_66_P132855	Baz1b	22385	-0.38
A_51_P212630	Chd8	67772	-0.38
A_55_P1965629	Hfcf1	15161	-0.39
A_55_P1959953	Helz2	229003	-0.39
A_55_P2128270	Phf21a	192285	-0.39
A_51_P116616	Rbm14	56275	-0.39
A_51_P510663	Supt3	109115	-0.4
A_55_P2077879	Kat6b	54169	-0.4
A_55_P1955676	Csrp2bp	228714	-0.4
A_55_P2132502	Pkn1	320795	-0.4
A_55_P1974412	Kat2a	14534	-0.4
A_52_P391018	Phf16	382207	-0.41
A_66_P119017	Smarca1	93761	-0.41
A_66_P133043	Mbd2	17191	-0.41
A_55_P2019004	Ncoa7	211329	-0.41
A_52_P117197	Phf12	268448	-0.42
A_55_P1996329	Epc1	13831	-0.42
A_55_P1996329	Kat5	81601	-0.43
A_55_P2033521	Med6	69792	-0.43
A_55_P2002314	Zmiz2	52915	-0.43
A_55_P2074331	Rxra	20181	-0.43
A_55_P1991802	Csrp2bp	228714	-0.43
A_55_P2139753	Phf15	76901	-0.43
A_52_P101333	Sap18	20220	-0.44
A_55_P2153459	Cecr2	330409	-0.44
A_51_P423880	Smared3	66993	-0.44
A_55_P2017714	Kat5	81601	-0.44
A_55_P1979356	Morf4l1	21761	-0.44
A_55_P2138120	Atxn7l3	217218	-0.44
A_51_P263220	Taf5	226182	-0.45
A_55_P2016712	Msl1	74026	-0.45
A_51_P513311	Rxrg	20183	-0.45
A_52_P538709	Tada3	101206	-0.46
A_55_P1973402	Tada2a	217031	-0.46
A_55_P2077884	Kat6b	54169	-0.46
A_55_P1964009	Zfp217	228913	-0.46
A_55_P2098688	Mcrs1	51812	-0.46
A_51_P100787	Snw1	66354	-0.47
A_51_P141104	Med18	67219	-0.47
A_52_P266459	Ing2	69260	-0.47
A_51_P111455	Wdr77	70465	-0.47
A_55_P2054240	Med8	80509	-0.48
A_51_P397768	Csnk2a1	12995	-0.48
A_52_P176300	Med1	19014	-0.48
A_51_P233788	Dmap1	66233	-0.48
A_55_P2108324	Med12	59024	-0.49
A_51_P465809	Slc30a9	109108	-0.49
A_55_P1967617	Med16	216154	-0.49
A_55_P1968464	Kat6a	244349	-0.49

表3. (続き)

ID	GeneSymbol	EntrezGeneID	ratio
A_55_P2078776	Mll5	69188	-0.49
A_55_P1992640	Hdac3	15183	-0.5
A_51_P129149	Gatad2a	234366	-0.51
A_55_P2004385	Csrp2bp	228714	-0.51
A_51_P463828	Baz1b	22385	-0.51
A_55_P1958306	Thrap3	230753	-0.51
A_52_P653902	Eny2	223527	-0.52
A_55_P2146404	Kansl1	76719	-0.52
A_52_P3412	Med17	234959	-0.52
A_55_P2095365	Meaf6	70088	-0.53
A_55_P2111875	Taf12	66464	-0.53
A_55_P1994917	Wdr5	140858	-0.53
A_55_P2134356	Msl3	17692	-0.53
A_55_P1963606	Hfcf1	15161	-0.55
A_52_P282987	Yeats2	208146	-0.55
A_55_P1971828	Csnk2a1	12995	-0.56
A_51_P203474	Tsg101	22088	-0.56
A_52_P647291	Cecr2	330409	-0.57
A_55_P2116853	Brpf1	78783	-0.57
A_55_P2083814	Zzz3	108946	-0.57
A_51_P274465	Sypc3	20962	-0.57
A_51_P265338	Nr0b2	23957	-0.58
A_55_P2056100	Pus1	56361	-0.58
A_55_P2121466	Ncor1	20185	-0.58
A_55_P2016708	Msl1	74026	-0.59
A_51_P255387	Med31	67279	-0.59
A_55_P2026889	Med10	28077	-0.59
A_55_P2070179	Ing4	28019	-0.59
A_66_P112546	Yeats4	64050	-0.6
A_55_P2092526	Tgif1	21815	-0.6
A_55_P2085664	Meaf6	70088	-0.6
A_55_P2112667	Fshr	14309	-0.6
A_66_P135192	Msl2	77853	-0.6
A_55_P2033520	Med6	69792	-0.6
A_51_P173384	Tada1	27878	-0.6
A_55_P2022845	Csnk2a1	12995	-0.6
A_55_P1975341	Nasp	50927	-0.6
A_52_P502267	Epc2	227867	-0.61
A_55_P1989858	Thrap3	230753	-0.61
A_55_P2236607	Ccnc	51813	-0.61
A_66_P129111	Nasp	50927	-0.62
A_55_P1968698	Rere	68703	-0.63
A_51_P481644	Mbip	217588	-0.63
A_52_P424767	Rbbp4	19646	-0.64
A_51_P324082	Med1	19014	-0.65
A_55_P2095727	Pml	18854	-0.65
A_52_P411601	Ep300	328572	-0.65
A_55_P2041397	Ezh2	14056	-0.66
A_52_P327467	Med7	66213	-0.67
A_55_P2112737	Actb	11461	-0.67
A_55_P2179834	Gatad2a	234366	-0.68
A_55_P1960281	Med7	66213	-0.7
A_55_P2024095	Med1	19014	-0.7
A_55_P2237432	Smarca1	93761	-0.71
A_52_P462350	Dr1	13486	-0.72
A_51_P255565	Smarcaad1	13990	-0.73
A_55_P1965836	Crebbp	12914	-0.73
A_55_P1977593	Epc2	227867	-0.74
A_55_P2127804	Map3k7	26409	-0.75
A_52_P565940	Nsd1	18193	-0.75
A_52_P264229	Ing5	66262	-0.75
A_55_P2090179	Cbx5	12419	-0.76
A_52_P80593	Pole3	59001	-0.77
A_55_P1970755	Hdac9	79221	-0.79
A_55_P2033413	Med4	67381	-0.79
A_55_P2180551	Fam60a	56306	-0.8
A_52_P515826	Med13	327987	-0.8
A_55_P2033932	Zzz3	108946	-0.81
A_55_P2035407	Cyp26c1	546726	-0.81
A_55_P2090535	Thrap3	230753	-0.81
A_55_P1968200	Hjurp	381280	-0.81
A_55_P2018457	Hdac7	56233	-0.81
A_51_P224517	Phf17	269424	-0.82
A_55_P1971804	Hdac10	170787	-0.84
A_55_P2078770	Mll5	69188	-0.84
A_66_P127255	Ing3	71777	-0.88
A_55_P1986902	Med23	70208	-0.88
A_51_P136792	Calcoco1	67488	-0.9
A_51_P502764	Hdac10	170787	-0.9
A_51_P457358	Med13l	76199	-0.9

表3. (続き)

ID	GeneSymbol	EntrezGeneID	ratio
A_55_P2006499	Esrrg	26381	-0.91
A_65_P01247	Hjurp	381280	-0.91
A_55_P2011702	Ppargc1a	19017	-0.91
A_52_P382149	Cyp26a1	13082	-0.92
A_55_P2161267	Uimc1	20184	-0.95
A_55_P2048705	Fgf2	14173	-0.95
A_55_P2022840	Csnk2a1	12995	-0.96
A_55_P1998947	Trim16	94092	-0.97
A_55_P2072556	Ncoa6	56406	-0.99
A_65_P20174	Phf17	269424	-1
A_65_P07450	Brd8	78656	-1.01
A_65_P20249	Prkcb	18751	-1.01
A_55_P2045096	Hjurp	381280	-1.01
A_51_P257762	Kat2b	18519	-1.03
A_55_P2020373	Chd4	107932	-1.04
A_51_P450924	Pole4	66979	-1.06
A_66_P107680	Med8	80509	-1.06
A_55_P1989865	Thrap3	230753	-1.07
A_55_P2360661	Cbx5	12419	-1.11
A_55_P2183750	Ncoa3	17979	-1.12
A_55_P2075636	Epc2	227867	-1.18
A_52_P83959	Taf7	24074	-1.25
A_55_P2059134	Smarca5	93762	-1.25
A_55_P2062727	Nasp	50927	-1.25
A_52_P520940	Taf7	24074	-1.25
A_55_P2072443	Kansl1	76719	-1.25
A_55_P2078765	Mll5	69188	-1.27
A_52_P241544	Supt7l	72195	-1.28
A_66_P128997	Pml	18854	-1.29
A_55_P1981724	Nr2c1	22025	-1.31
A_55_P1994052	Asxl1	228790	-1.4
A_55_P2066329	Med28	66999	-1.41
A_52_P154880	Ing3	71777	-1.46
A_66_P119170	Phf21a	192285	-1.47
A_55_P1976278	Prkcb	18751	-1.58
A_55_P2163837	Med14	26896	-1.73
A_52_P406371	Med14	26896	-1.84
A_51_P137094	Sall2	50524	-1.95
A_66_P136955	Med14	26896	-2.06
A_52_P87843	Aldh1a3	56847	-4.73

表 4. *Gfra1-CreERT2; CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスで、TM 投与 2 日後と 30 日後の GFR $\alpha$ +細胞における FLAG-RAR $\gamma$ +細胞の割合

TM投与日数	2日後	30日後	50日後
全 GFR $\alpha$ 1+細胞数	2451	873	2021
FLAG+, GFR $\alpha$ 1+ 細胞数	400	35	12
FLAG+細胞数/全GFR $\alpha$ 1+細胞数(%)	16	4	0.6
観察した精細間の長さ(cm)	7.68	2.77	6.13
全GFR $\alpha$ 1+細胞数/精細間の長さ(cm)	319	315	329

*Gfra1-CreERT2; CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスを TM 投与により GFR $\alpha$ +細胞で FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現させた後、2 日後と 30 日後の精細管において GFR $\alpha$  と FLAG の免疫染色を行った。各細胞を計数し GFR $\alpha$ +細胞のうち FLAG+細胞の割合を計測した。2、30、50 日後と、GFR $\alpha$ +細胞のうち FLAG+細胞の割合は徐々に減少していた。

表 5. *Gfra1+*, *Ngn3+*, *Kit+*細胞数の精細管周期に伴う変化

ステージ	<i>Gfra1+</i> 細胞 (n=7精巢)	セルトリ細胞	<i>Gfra1+</i> 細胞 / セルトリ細胞	<i>Ngn3+</i> 細胞 (n=5 精巢)	セルトリ細胞	<i>Ngn3+</i> 細胞 / セルトリ細胞	<i>Kit+</i> 細胞 (n=3 精巢)	セルトリ細胞	<i>Kit+</i> 精巢 / セルトリ細胞
I	105	2675	0.0393	47	3019	0.0156	1252	1443	0.8676
II-III	60	1486	0.0404	54	1608	0.0336	713	665	1.0722
IV	42	1597	0.0263	125	1737	0.0720	1169	846	1.3818
V	73	1905	0.0383	121	2238	0.0541	2416	1261	1.9159
VI	34	1246	0.0273	116	1507	0.0770	1330	540	2.4630
VII	120	2612	0.0459	208	2749	0.0757	64	1341	0.0477
VIII	39	1153	0.0338	48	1086	0.0442	64	540	0.1185
IX	63	1282	0.0491	58	1399	0.0415	219	822	0.2664
X	36	891	0.0404	38	1006	0.0378	289	605	0.4777
XI	59	1025	0.0576	33	1158	0.0285	164	339	0.4838
XII	82	1592	0.0515	11	1736	0.0063	566	1034	0.5474

精細管周期の各ステージにおける *Gfra1+*, *Ngn3+*, *Kit+*細胞数。 *In situ* hybridization により各遺伝子発現細胞を判定し、その合計細胞数を示す。ステージとセルトリ細胞は近隣切片を PAS-H 染色により判定、計数した。図 44 にセルトリ細胞あたりの各遺伝子発現細胞数を示している。

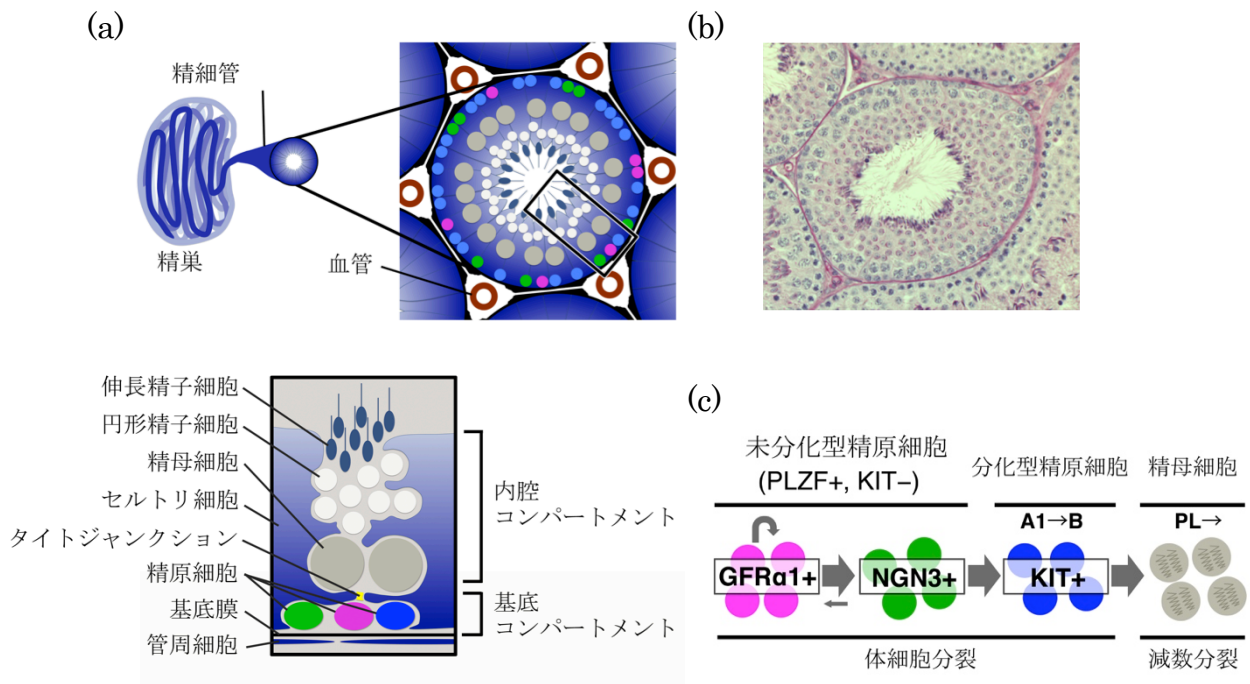


図 1. 精細管の構造と精子形成

(a) 精子形成は、精細管内の基底膜側から内腔に向けて、体細胞のセルトリに支えられながら進む。未分化型精原細胞と分化型精原細胞は共に、セルトリ細胞のタイトジャンクションと基底膜の間の基底コンパートメントに存在する。(b) 精細管断面のPAS-H染色。(c) GFRα1+、NGN3+、KIT+細胞の階層構造の模式図。GFRα1+細胞はより未分化な細胞であり、NGN3+細胞、KIT+細胞、更に減数分裂へと分化が進む。NGN3+細胞は幹細胞能を維持しており、GFRα1+に逆戻りすることができる。

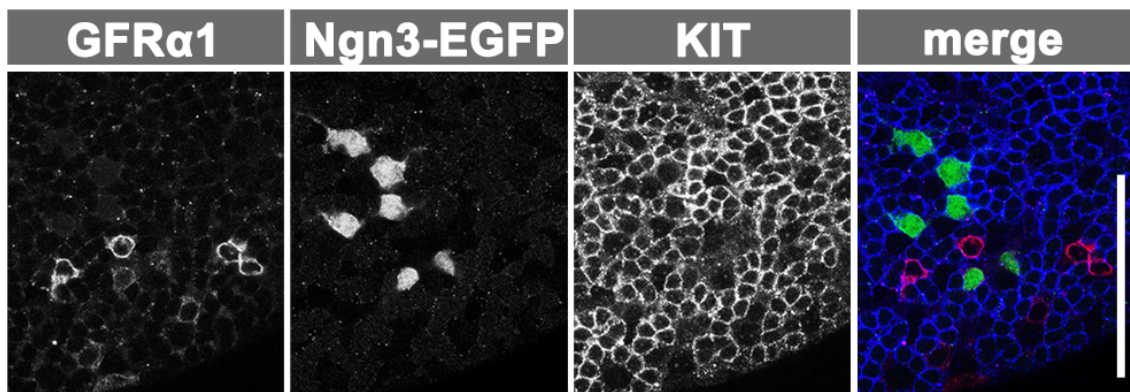


図 2. Whole-mount 免疫染色による GFR $\alpha$ +細胞、NGN3+細胞、KIT+細胞の精細管基底コンパートメントにおける分布

*Ngn3-EGFP* マウスにおいて、GFR $\alpha$ 1（赤）、GFP（緑）、KIT（青）の whole-mount 免疫染色を行った。未分化型精原細胞である GFR $\alpha$ 1+と NGN3+細胞、分化型精原細胞である KIT+細胞はお互いに入り交じって存在する。スケールバーは 100 $\mu$ m を示す。



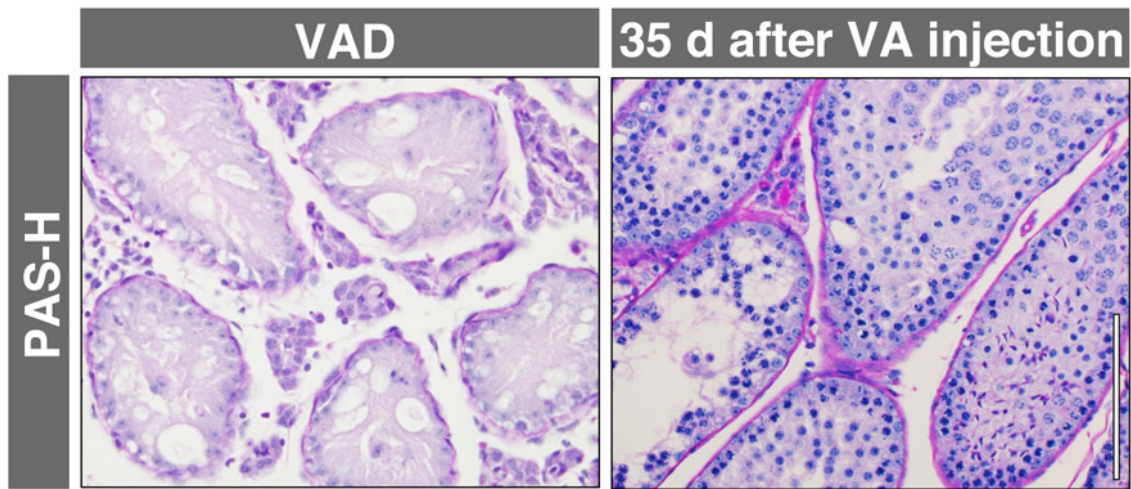


図 3. VAD マウス精巣の組織染色

VAD マウス（左）と VAD マウスに VA を投与して 35 日後（右）の精巣の組織切片の PAS-H 染色を行った。VAD マウスでは未分化型精原細胞から分化型精原細胞への分化が停止しており、精細管にはセルトリ細胞と未分化型精原細胞のみが観察される。VA 投与 35 日後では精子形成が再開され、分化細胞が観察される。スケールバーは 100 $\mu$ m を示す。

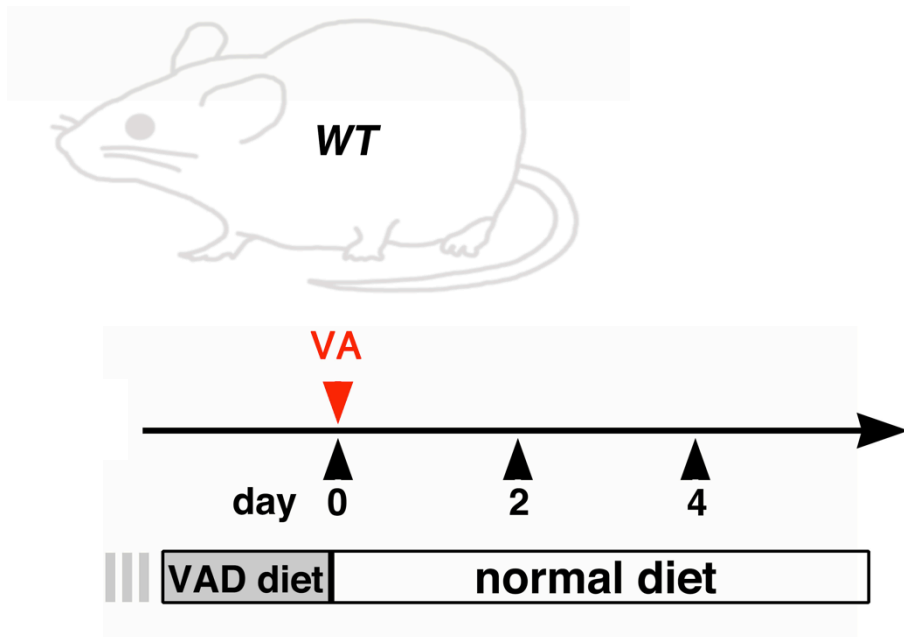


図 4. VAD マウスへの VA 投与による細胞数の変動：実験スケジュール

野生型マウス (*WT*) へ VAD 餌を与えることにより VAD マウスを作成した。VA 投与 (腹腔内) 後は VA を含んだ通常餌を与えて飼育した。VA 投与 0、2、4 日後の精巣を採取した (図 5)。

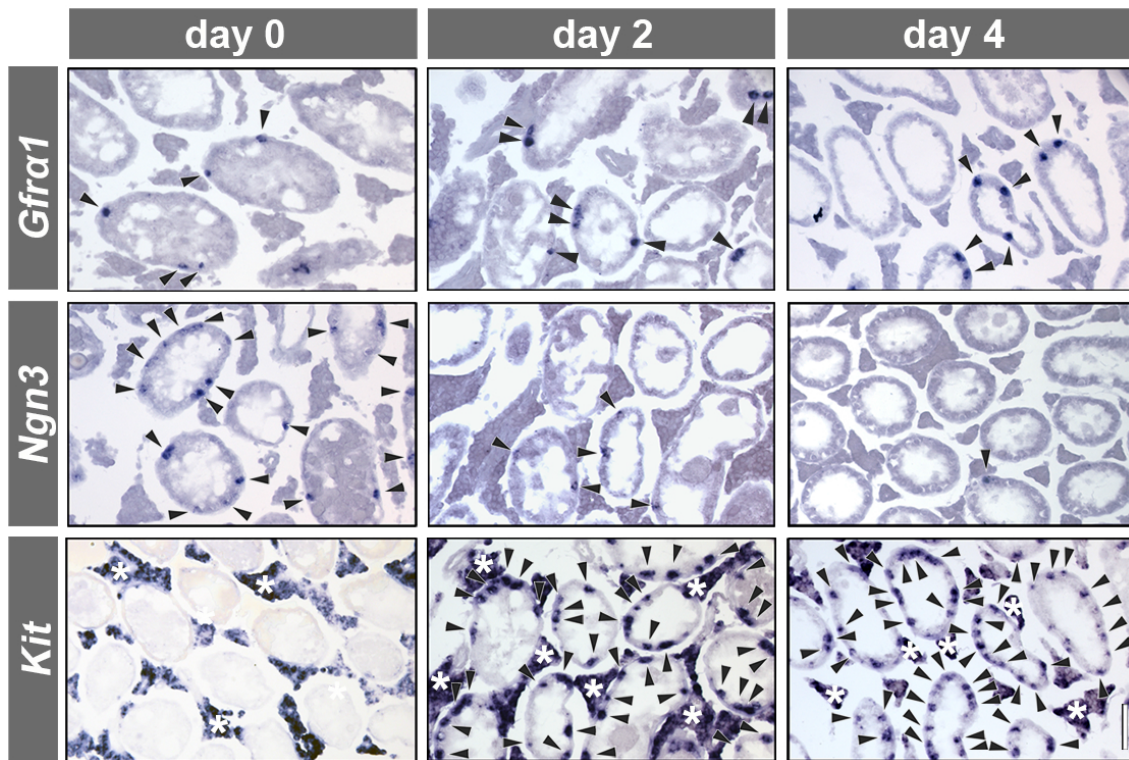


図 5. VAD マウスへの VA 投与による細胞数の変動：各マーカー遺伝子を発現する細胞の検出

VAD マウスに VA を投与した 0、2、4 日後の精巣の切片。*Gfra1*、*Ngn3*、*Kit* を認識するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。矢頭が各細胞を示す。*Gfra1*+細胞は 0、2、4 日後いずれにおいても一定数観察されたが、*Ngn3*+細胞は徐々に減少した。また、*Kit*+細胞は 0 日後で観察されないが 2、4 日後徐々に観察されるようになった。*Kit* は間質でも発現が認められるため、これをアスタリスクで示す。スケールバーは 100 $\mu$ m。

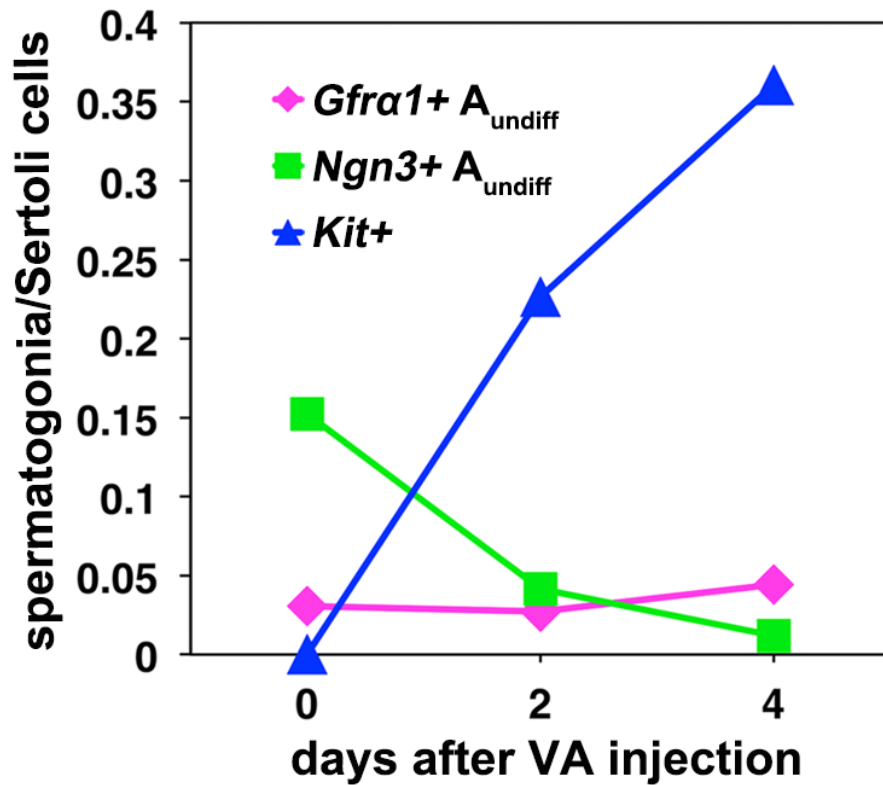


図 6. VAD マウスへの VA 投与による細胞数の変動:各マーカー遺伝子を発現する細胞の変化

図 5 より得られた結果から、各細胞数を計測し、セルトリ細胞あたりの数を示した。それぞれ、125-323 精細管断面から計測した。VA 投与直後から *Kit*+細胞数は急速に増加した。同時に *Ngn3*+細胞は急激に減少した。*Gfra1*+細胞は VA 投与後も一定数認められた。実数値は表 1 に示す。

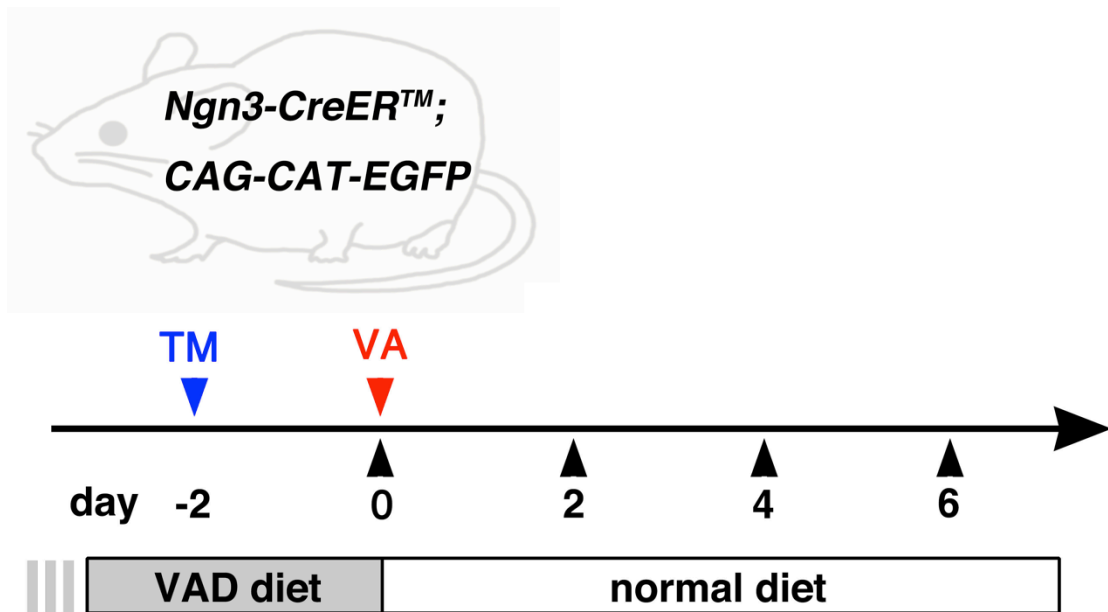


図 7. VAD マウスへの VA 投与後の NGN3+細胞の運命追跡：実験スケジュール

*Ngn3-CreER<sup>TM</sup>*; *CAG-CAT-EGFP* マウスを VAD 条件下で飼育し、VAD マウスにした後、TM 投与（腹腔内）により NGN3+細胞をラベルした（day -2）。2 日後、VA を投与し（day 0）、VA 投与 0、2、4、6 日後の精巢を採取した。

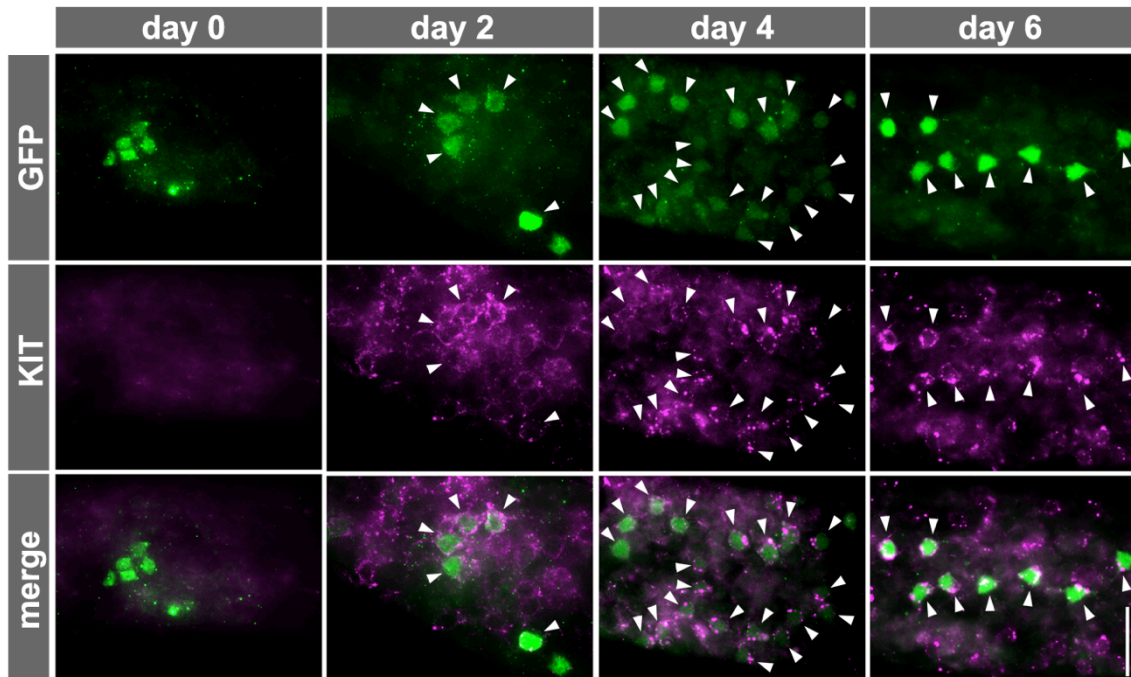


図 8. VAD マウスへの VA 投与後の NGN3+細胞の運命追跡：免疫染色

VAD 時に NGN3+細胞であった細胞にパルスラベルをし、VA を投与した 0、2、4、6 日後の精細管を whole-mount 免疫染色した。ラベル細胞は GFP を発現する。GFP を緑、KIT をマゼンタで示す。VA 投与後、GFP+細胞のうち KIT+細胞(白矢頭) が徐々に増加した。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。



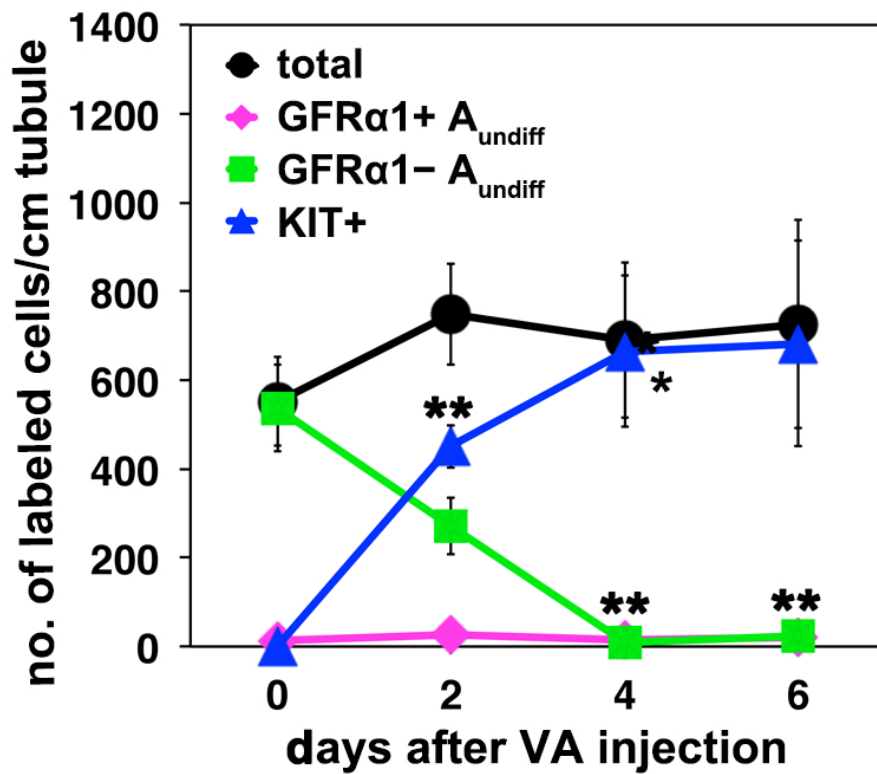


図 9. VAD マウスへの VA 投与後の NGN3+細胞の運命追跡：ラベル細胞数の変化

図 8 より得られた結果から、GFP+細胞のうち GFRα1+ A<sub>undiff</sub>、GFRα1- A<sub>undiff</sub> (NGN3+ A<sub>undiff</sub> にほぼ対応する)、KIT+細胞の数を計測し、精細管 cm あたりの細胞数として表示した。GFRα1- A<sub>undiff</sub> (GFRα1-, KIT-, GFP+) 細胞は VA 投与後急激に減少し、KIT+ (KIT+, GFP+) 細胞は増加した。GFRα1+ A<sub>undiff</sub> (GFRα1+, GFP+) 細胞はほとんど現れなかった。精巣数は 0、2、4、6 日後それぞれ、3、3、5、5 サンプルを使用した。グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。GFRα1- A<sub>undiff</sub> 細胞において VA 投与 4、6 日後、KIT+細胞において 2、4、6 日後でそれぞれ 0 日後と比較して有意な差が認められた (\* $P = 0.041$ 、\*\* $P < 0.002$  ( $t$ -test))。

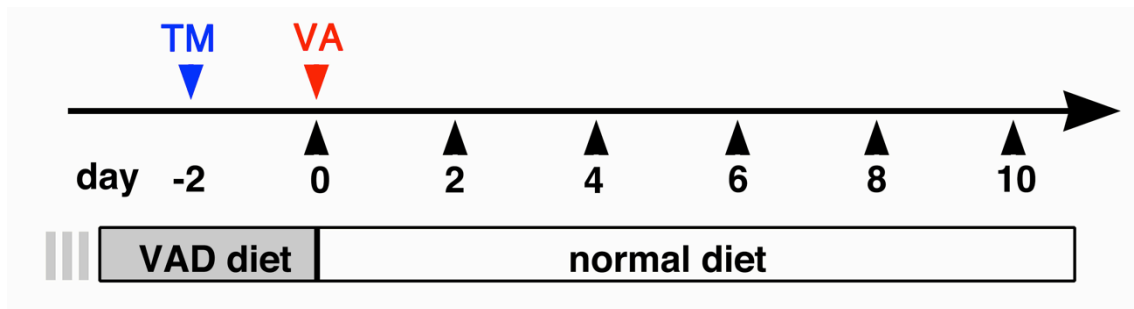
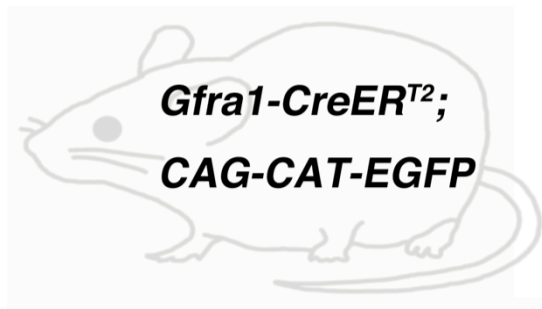


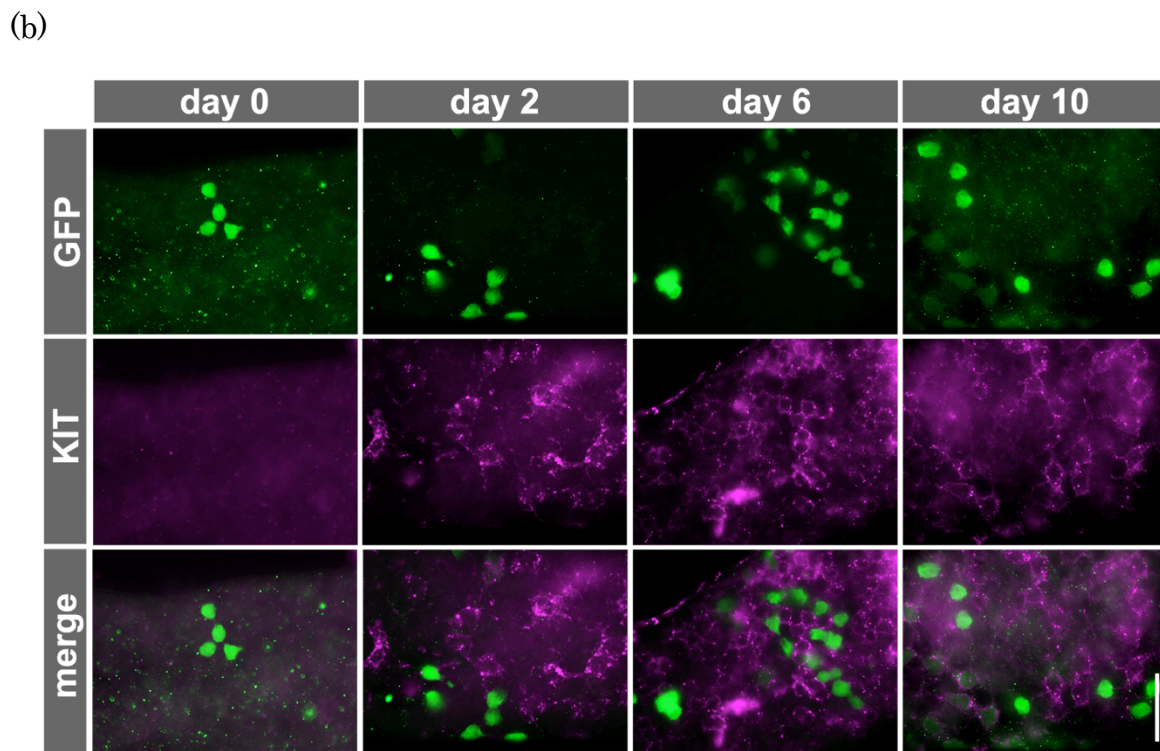
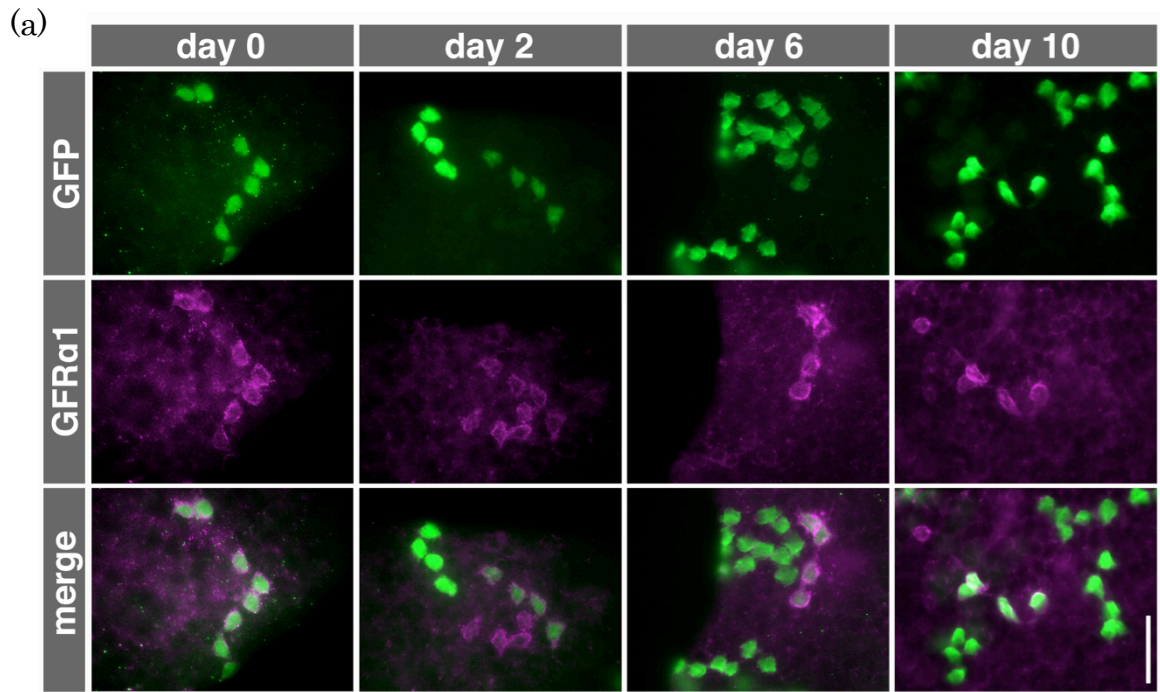
図 10. VAD マウスへの VA 投与後の GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡：実験スケジュール

*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-EGFP* マウスを VAD 条件下で飼育し、VAD マウスにした後、TM 投与により GFR $\alpha$ +細胞をラベルした (day -2)。2 日後、VA を投与し (day 0)、VA 投与 0、2、4、6、8、10 日後の精巣を採取した。



図 11. VAD マウスへの VA 投与後の GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡：免疫染色

VAD 時に GFR $\alpha$ 1+細胞であった細胞をパルスラベルし、VA を投与した 0、2、4、6、8、10 日後の精細管を whole-mount 免疫染色した。(a) GFP を緑、GFR $\alpha$ 1 をマゼンタで示す。GFP+細胞のうち、GFR $\alpha$ 1 を発現する細胞は 10 日後まで観察された。(b) GFP を緑、KIT をマゼンタで示す。VA 投与後、GFP+細胞のうち KIT を発現しない細胞が一定数認められた。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。



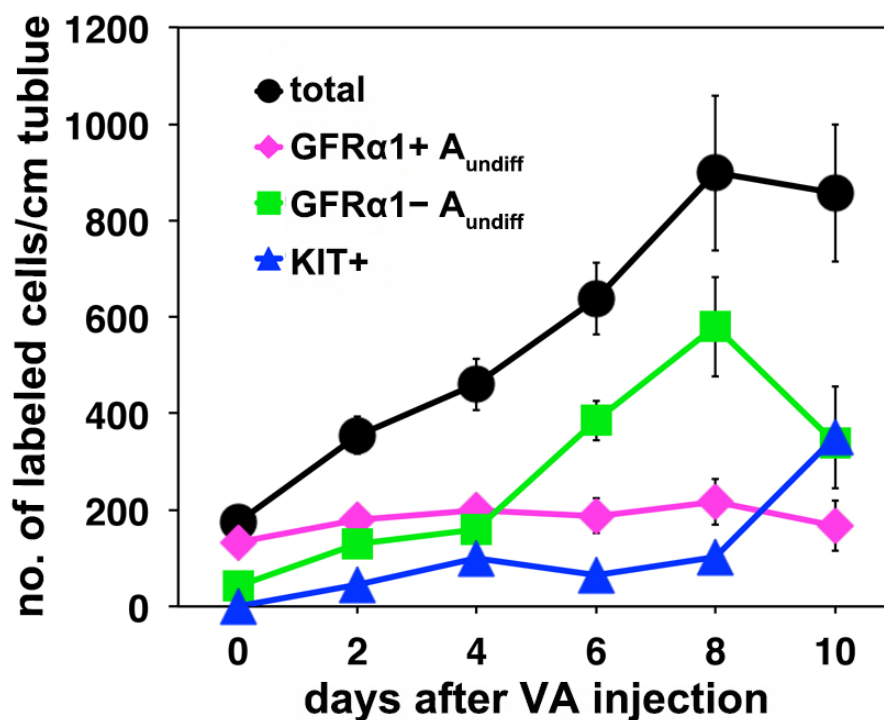


図 12. VAD マウスへの VA 投与後の GFRα1+細胞の運命追跡：ラベル細胞数の変化

図 11 より得られた結果から、GFP+細胞のうち GFRα1+ A<sub>undiff</sub>、GFRα1- A<sub>undiff</sub> (NGN3+ A<sub>undiff</sub> にほぼ対応する)、KIT+細胞の数を計測し、精細管 cm あたりの細胞数として表示した。VA 投与後も GFRα1+ A<sub>undiff</sub> (GFRα1+, GFP+) 細胞は一定数存在していた。GFRα1- A<sub>undiff</sub> (GFRα-, KIT-, GFP+) 細胞は徐々に増加し、10 日後急激に減少した。KIT+ (KIT+, GFP+) 細胞は 10 日後に増加した。精巣数は 0、2、4、6、8、10 日後それぞれ、5、5、7、6、4、3 サンプルを使用した。グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。GFRα1+ A<sub>undiff</sub> 細胞の 2、6、8、10 日後を除いたすべての点で、0 日後と比較して有意な差が認められた ( $P < 0.003$  [ $t$ -test])。

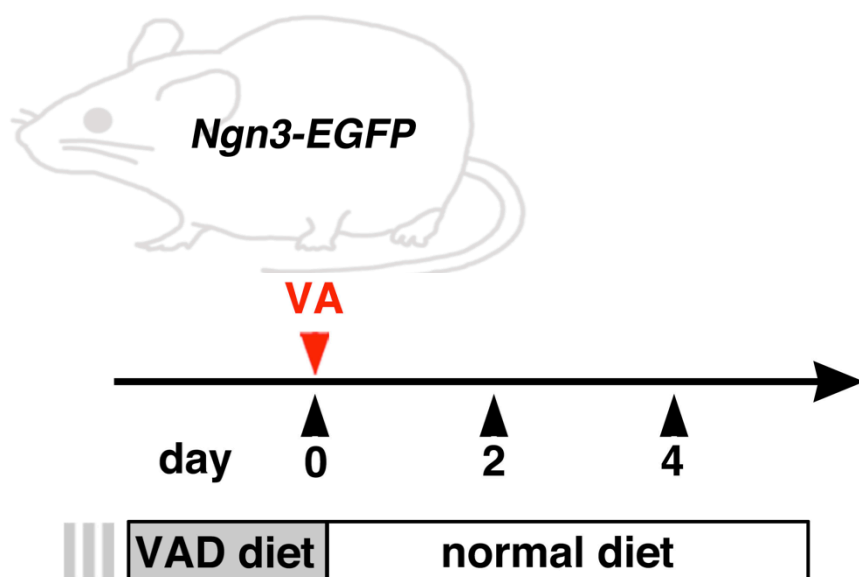


図 13. VAD マウスへの VA 投与後に現れる KIT+細胞の由来をたどる：実験スケジュール

*Ngn3-EGFP* マウスを VAD 条件下で飼育し、VAD 状態とした。VA を投与後 0、2、4 日後の精巢を採取した。

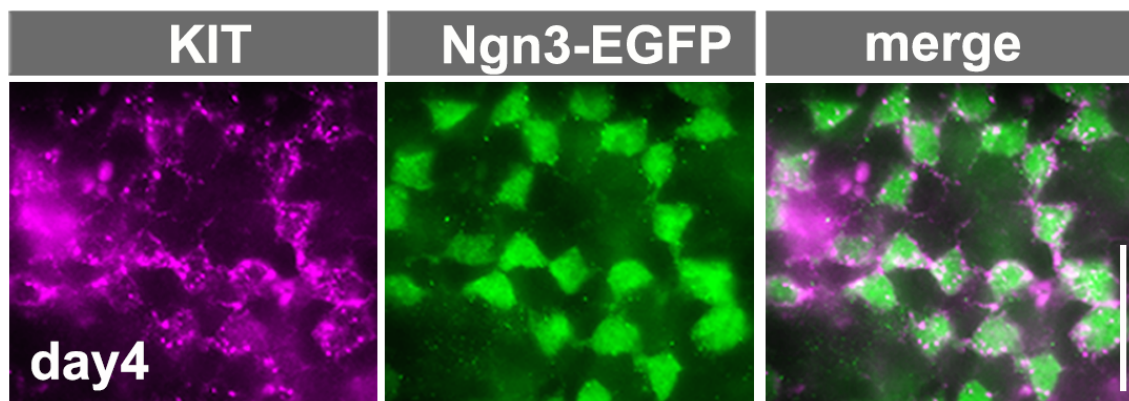


図 14.VAD マウスへの VA 投与後に現れる KIT+細胞の由来をたどる :免疫染色

VA 投与 4 日後の精細管の whole-mount 免疫染色による KIT (マゼンタ) と GFP (緑) の染色。GFP の半減期が長いために、NGN3 を一度発現した細胞は数日間 GFP の発現を残している。KIT+細胞の 99%以上が GFP を発現していた。定量した結果は表 2 に示す。スケールバーは 50 $\mu$ m。

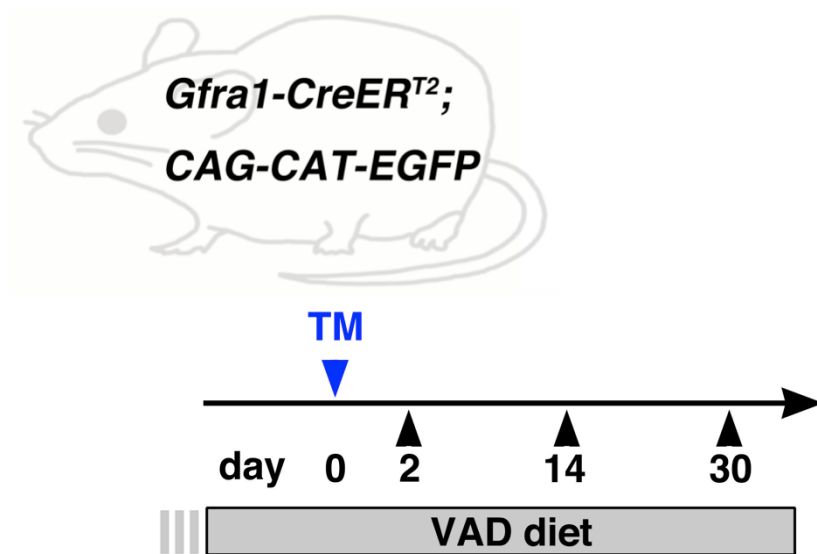


図 15. VAD 状態における GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡：実験スケジュール

*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-EGFP* マウスを VAD 状態で飼育し、VAD マウスにした。その後、TM 投与により GFR $\alpha$ 1+細胞をラベルし、2、14、30 日後の精巢を採取した。

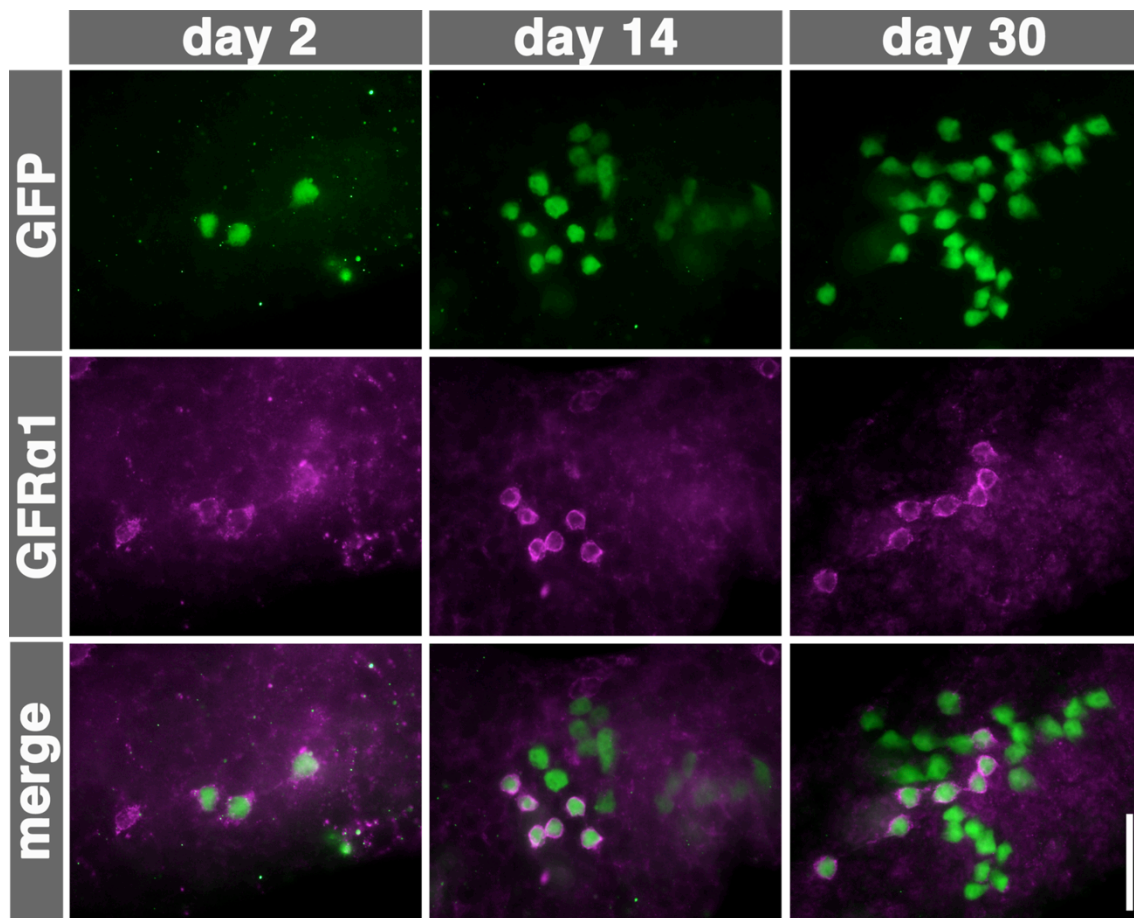


図 16. VAD 状態における GFRα1+細胞の運命追跡：免疫染色

図 15 で示したように採取した精細管を whole-mount 免疫染色した。GFP を緑、GFRα1 をマゼンタで示す。GFP+細胞は一定数 GFRα1+細胞として維持され、GFRα1- (NGN3+) 細胞は増加した。スケールバーは 50μm を示す。

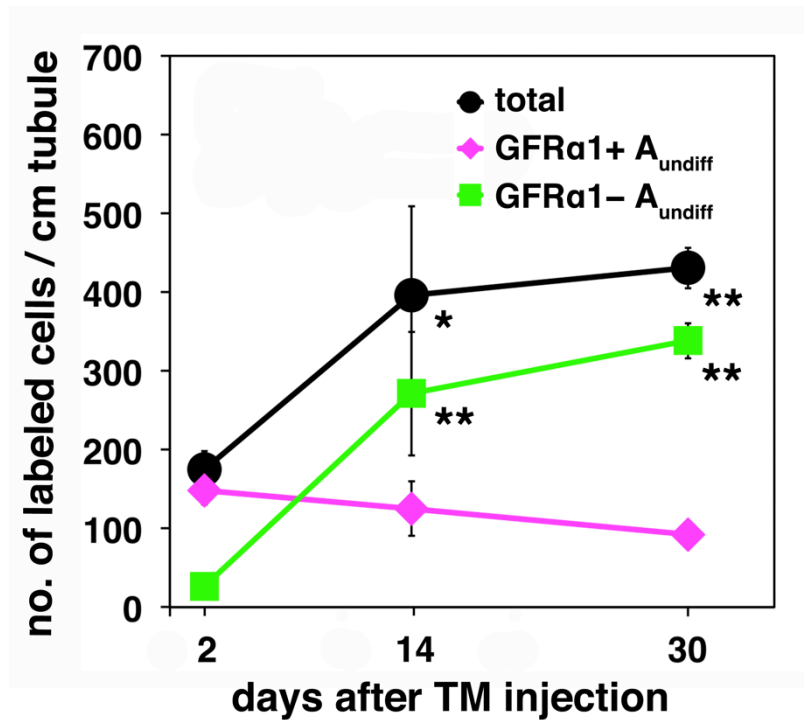


図 17. VAD 状態における GFRα1+細胞の運命追跡：ラベル細胞数の変化

図 16 より得られた結果から、GFP+細胞のうち GFRα1+ A<sub>undiff</sub>、GFRα1- A<sub>undiff</sub> 細胞数(NGN3+ A<sub>undiff</sub> にほぼ対応する)を計測し、精細管 cm あたりの細胞数として表示した。VA 投与後も GFRα1+ (GFRα1+, GFP+) 細胞は一定数存在していた。GFRα1- (GFRα1-, GFP+) 細胞は徐々に増加した。精巣数は 0、14、30 日後それぞれ 8、3、5 サンプルを使用した。グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。全細胞数、GFRα1- A<sub>undiff</sub> 細胞数において TM 投与 14、30 日後は 2 日後と比較して有意な差が認められた (\* $P = 0.0032$ 、\*\* $P < 0.002$  [t-test])。



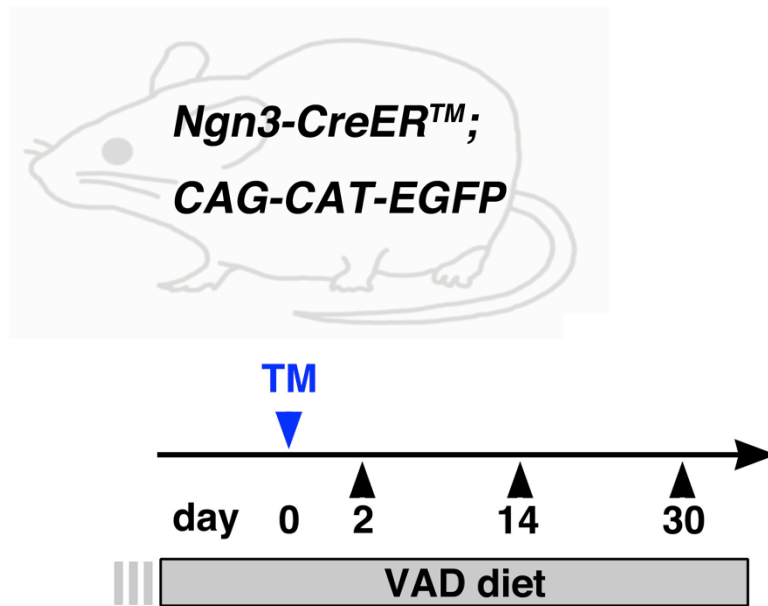


図 18. VAD 状態における NGN3+細胞の運命追跡：実験スケジュール

*Ngn3-CreER<sup>TM</sup>;* *CAG-CAT-EGFP* マウスを VAD 状態で飼育し、VAD マウスにした後、TM 投与により NGN3+細胞をラベルした 2、14、30 日後の精巢を採取した。

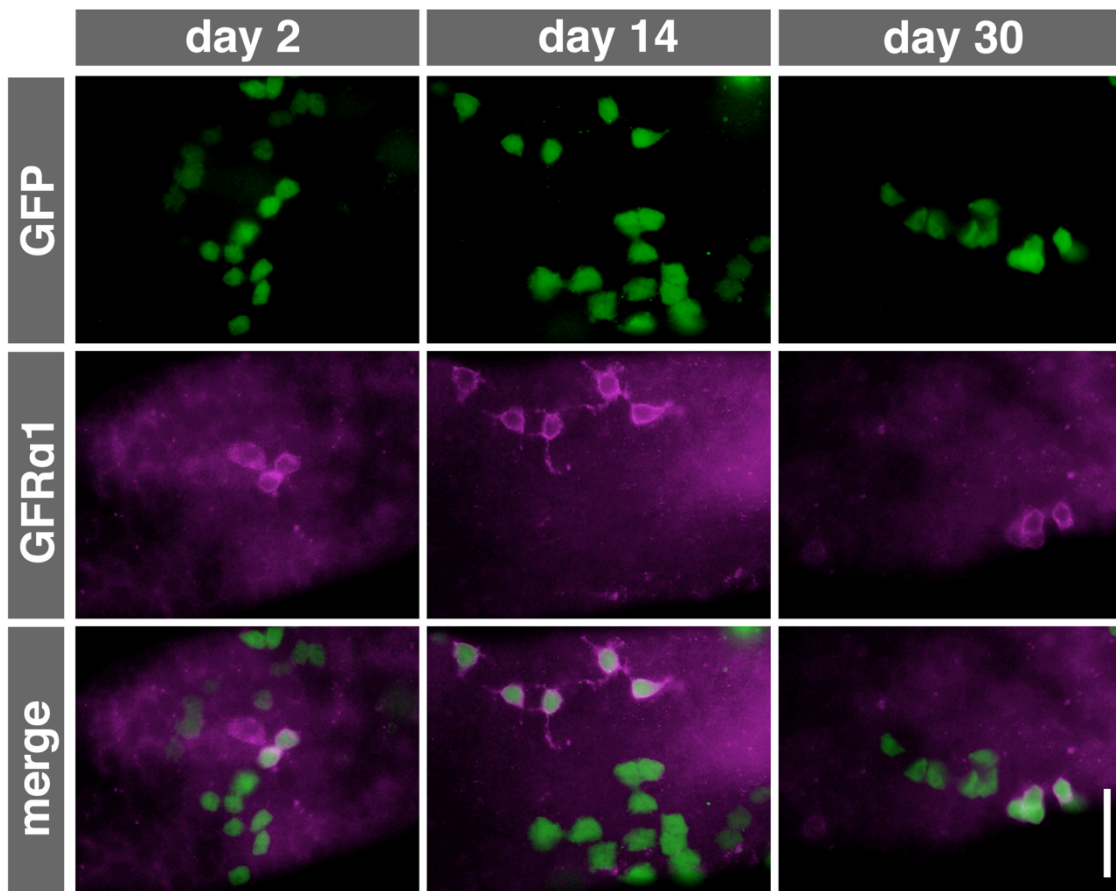


図 19. VAD 状態における NGN3+細胞の運命追跡：免疫染色

図 18 で示したように採取した精細管を whole-mount 免疫染色した。GFP を緑、GFRα1 をマゼンタで示す。GFP+ 細胞は徐々に減少した。一部は GFRα1+ 細胞として観察された。スケールバーは 50μm を示す。

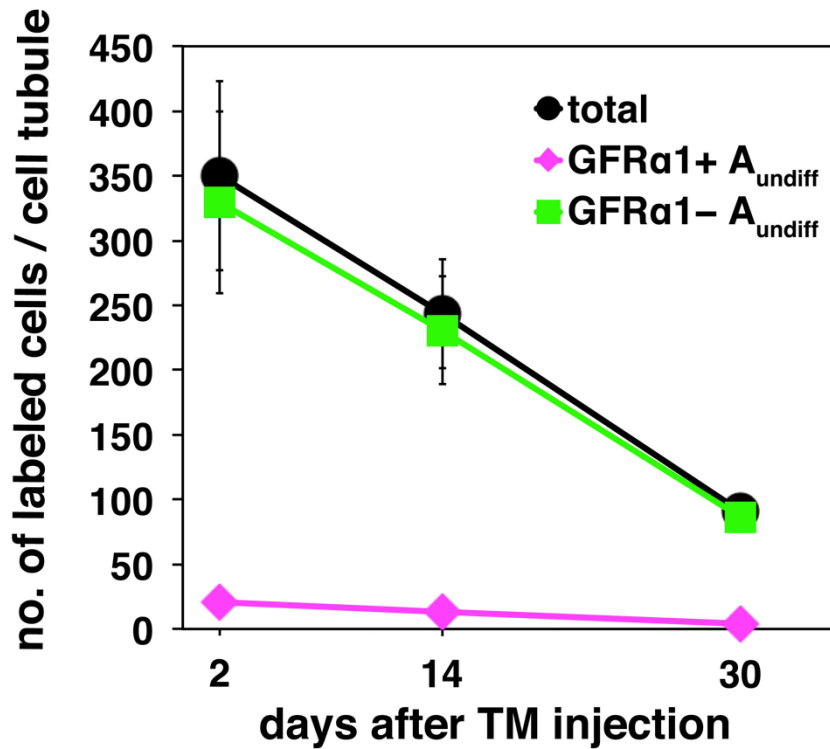


図 20. VAD 状態における NGN3+細胞の運命追跡：ラベル細胞数の変化

図 19 より得られた結果から、GFP+細胞のうち GFRα1+ A<sub>undiff</sub>、GFRα1- A<sub>undiff</sub> (NGN3+ A<sub>undiff</sub> にほぼ対応する)細胞数を計測し、精細管 cm あたりの細胞数として表示した。VA 投与後、GFRα1- (GFRα1-, GFP+) 細胞は徐々に減少した。精巣数は 2、14、30 日後それぞれ 5、3、2 サンプルを使用した。グラフは平均値を示す。2、14 日後は標準誤差をエラーバーにて示す。

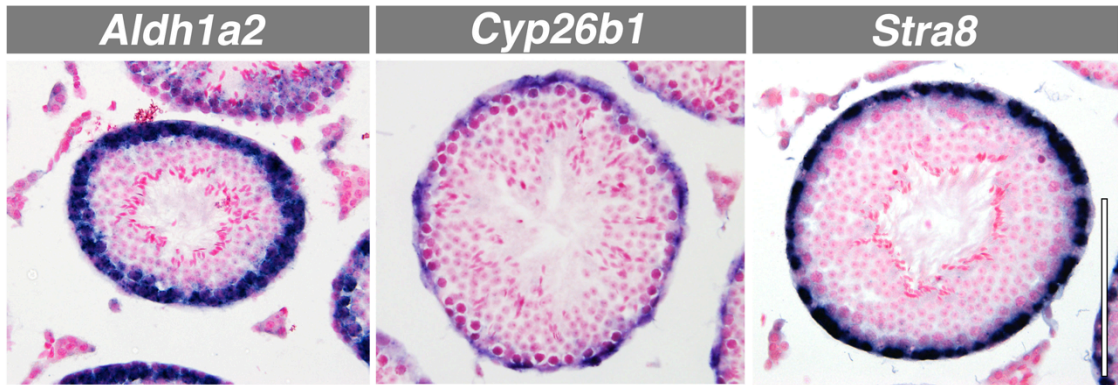


図 21. *Aldh1a2*、*Cyp26b1* と *Stra8* の *in situ* hybridization

*WT* の精巣切片において *in situ* hybridization を行った。RA 合成酵素である *Aldh1a2* はステージ VII-VIII を中心に精細管の全周にわたり精母細胞で強く発現しており、分解酵素である *Cyp26b1* はステージを問わずほぼ精細管全周にわたり管周細胞に発現していた。RA のターゲット遺伝子である *Stra8* はステージ VII-VIII を中心に精細管の全周の精原細胞で発現していた。スケールバーは 100 $\mu$ m を示す。

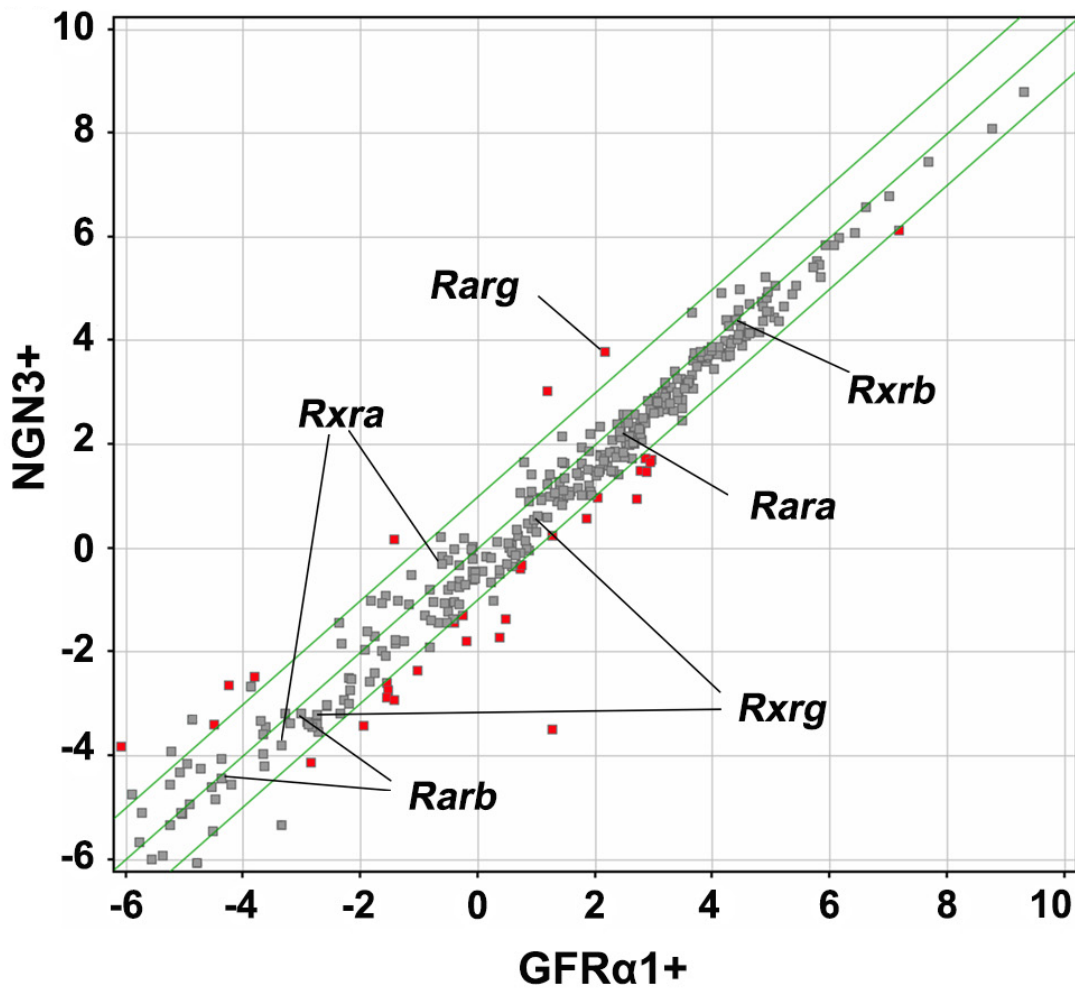


図 22. マイクロアレイによる GFRα1+細胞と NGN3+細胞間での RA 関連遺伝子発現の比較

成体マウスから FACS によって採取した GFRα1+細胞と NGN3+細胞に対してマイクロアレイを行い、ドットプロットにより RA 関連遺伝子について比較した。中央の緑線は  $\log_2([\text{NGN3+}]/[\text{GFR}\alpha 1])$  の値が 0、上方の緑線は 1.0、下方の緑線は -1.0 を示す。赤のドットは有意な差が認められる遺伝子を示す ( $P < 0.05$  [ $t$ -test])。Rar、Rrxr ファミリー遺伝子のドットは個々に示している。各遺伝子の発現量、GFRα1+細胞と NGN3+細胞の定量的な比較は表 3 に示す。

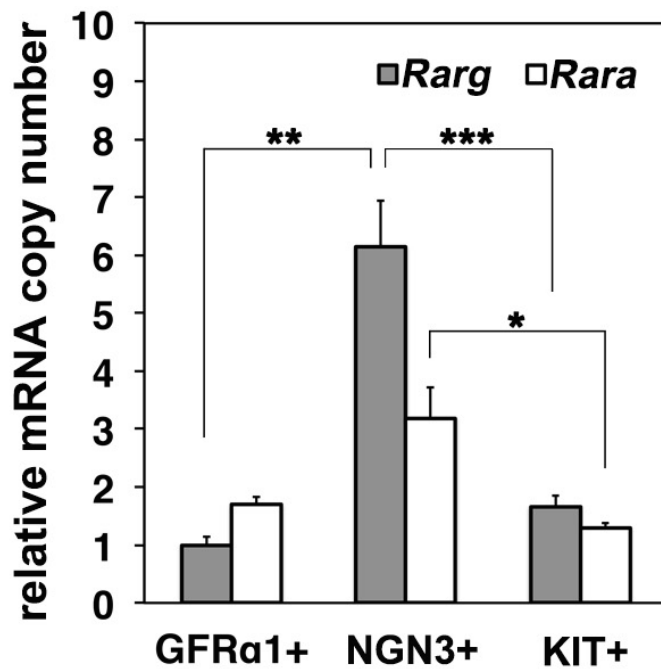


図 23. GFRα1+細胞、NGN3+細胞、KIT+細胞間の *Rara*、*Rarg* mRNA コピー数の比較

成体マウスから FACS によって採取した GFRα1+細胞と NGN3+細胞における、*Rara*、*Rarg* mRNA 発現の発現を定量 RT-PCR によって比較した。コピー数既知のサンプルで標準曲線を作成することで、コピー数を定量した。さらに *Actinb* mRNA でサンプル間の cDNA 量を補正することで、各サンプルにおける全 RNA に含まれる各 mRNA のコピー数の相対値を求めた。グラフは 3 個体の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。*Rarg* の発現は、NGN3+細胞で、GFRα1+細胞および KIT+ 細胞と比べて有意に高かった (\* $P=0.00065$ 、\*\* $P=0.011$  [*t*-test])。

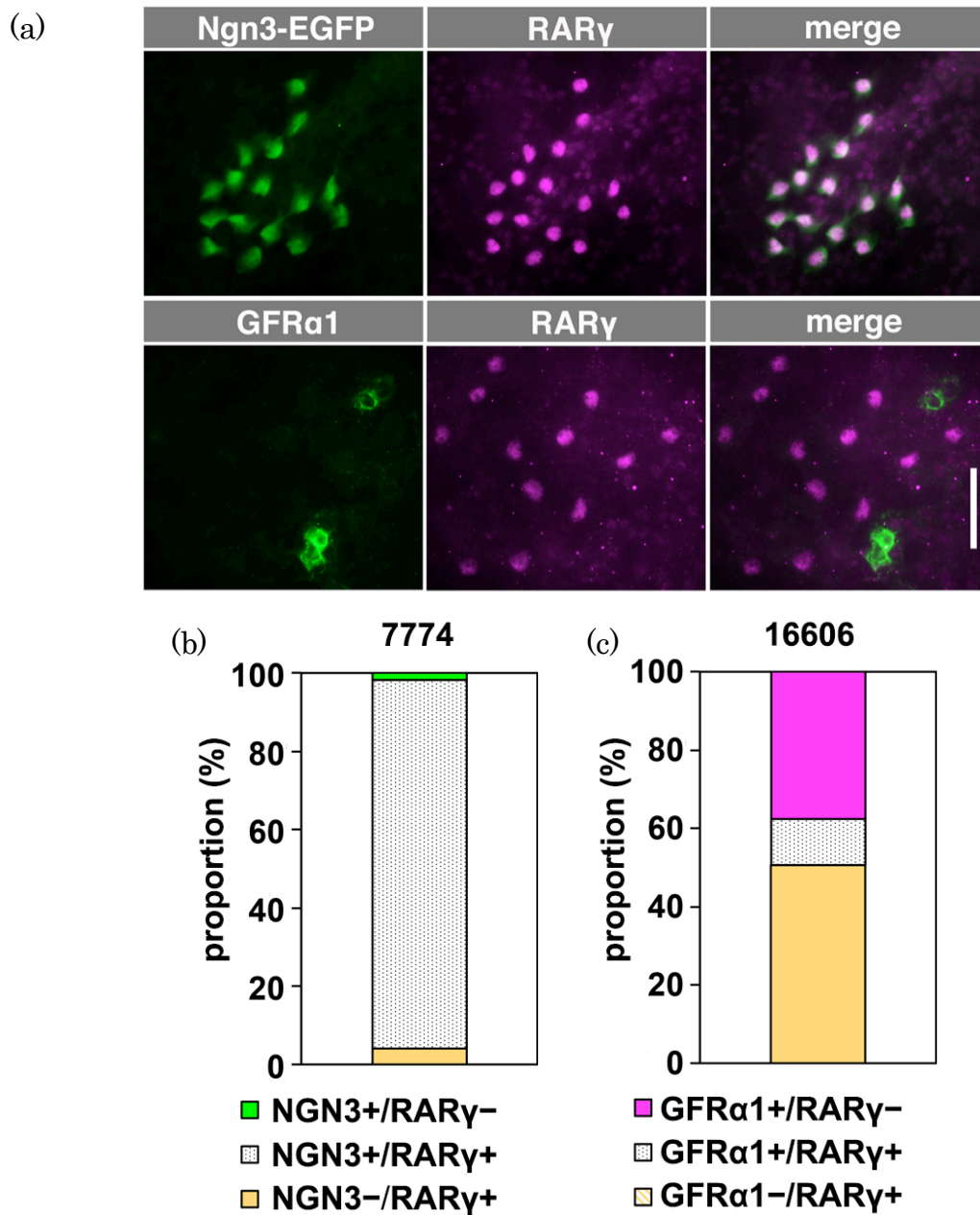


図 24. GFR $\alpha$ 1+細胞と NGN3+細胞における RAR $\gamma$  タンパク質の発現

(a) *Ngn3-EGFP* マウスにおいて、GFP (緑) (上段)、GFR $\alpha$ 1 (緑) (下段) と RAR $\gamma$  (マゼンタ) の whole-mount 免疫染色を行った。NGN3+細胞では RAR $\gamma$  を発現していたが、GFR $\alpha$ 1+細胞ではほとんど発現が見られなかった。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。(b, c) RAR $\gamma$ +細胞と NGN3+細胞 (b)、GFR $\alpha$ 1+細胞 (c) の構成比を示す。NGN3+の 98%以上が RAR $\gamma$ +と一致しており、GFR $\alpha$ 1 は RAR $\gamma$  とほぼ相補的に発現していた。グラフ上部に合計細胞数を示す。



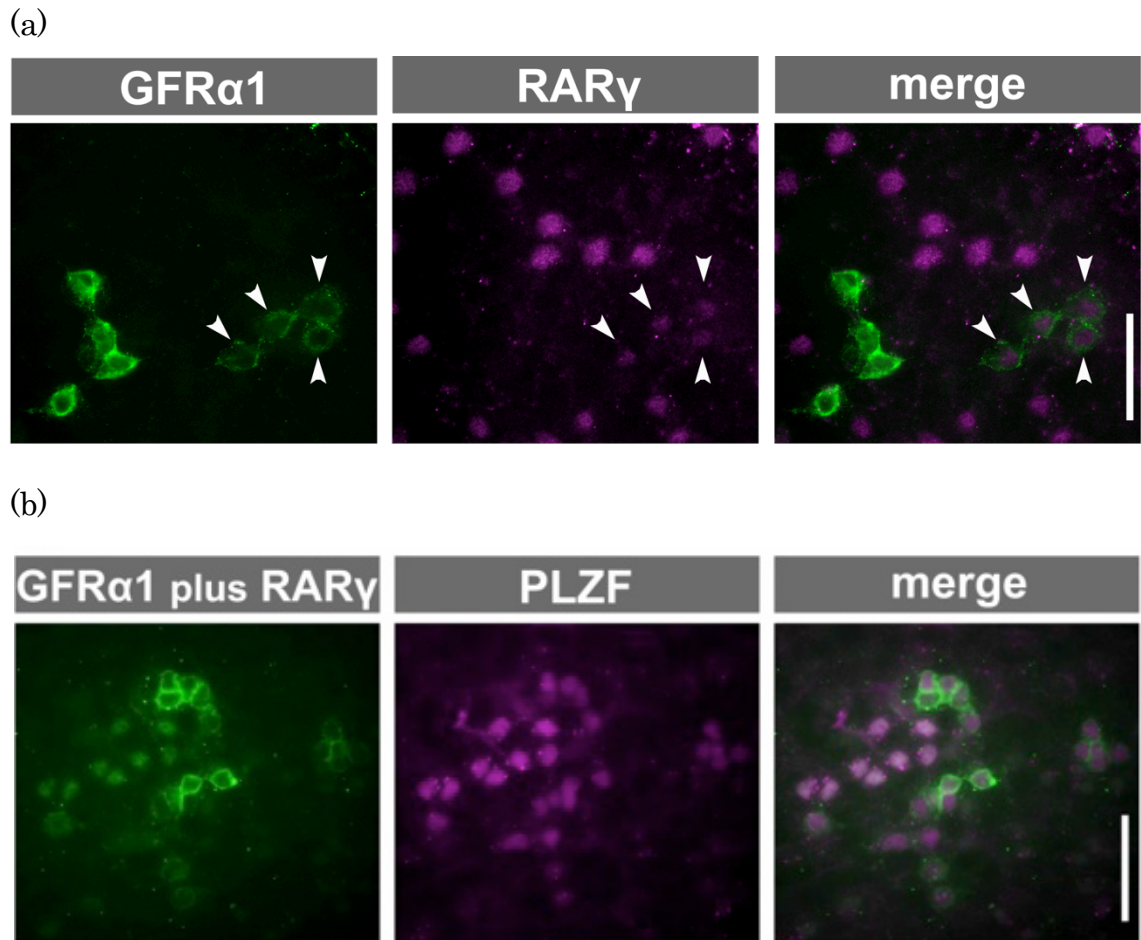


図 25. RAR $\gamma$  と未分化型精原細胞マーカーとの発現比較

WT マウスの精細管の whole-mount 免疫染色。

(a) GFR $\alpha$ 1 と RAR $\gamma$  は相補的に発現しており、GFR $\alpha$ 1 (緑)と RAR $\gamma$  (マゼンタ) が共発現している細胞は、どちらのシグナルも弱く発現していた (矢頭)。(b) GFR $\alpha$ 1 と RAR $\gamma$  を緑に、PLZF をマゼンタで示す。ほぼ全ての PLZF+細胞が (98.7%)、GFR $\alpha$ 1 と RAR $\gamma$ 、またはその両方を発現していた。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。



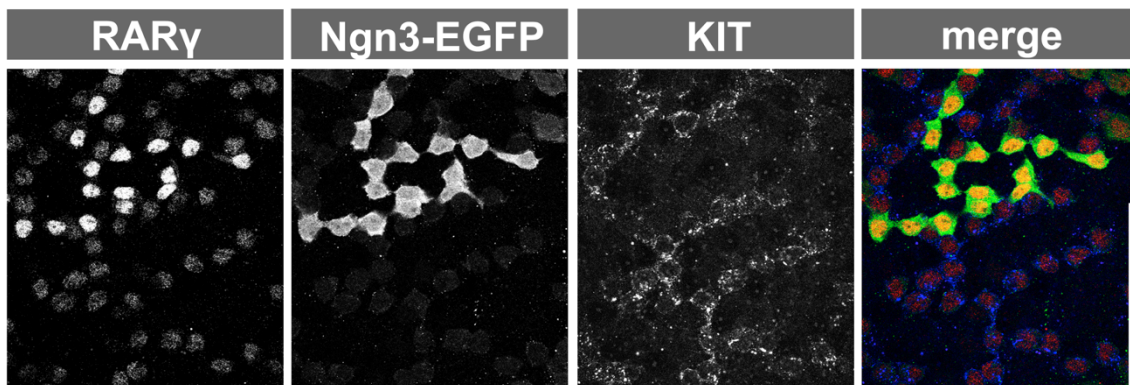


図 26. KIT+細胞における RAR $\gamma$  のタンパク質の発現

*Ngn3-EGFP* マウスにおいて、RAR $\gamma$  (赤)、GFP (緑)、および KIT (青) の whole-mount 免疫染色を行った。NGN3+細胞では RAR $\gamma$  が核に強く局在していたが、KIT+細胞では細胞全体で弱い発現が観察された。スケールバーは 100 $\mu$ m を示す。

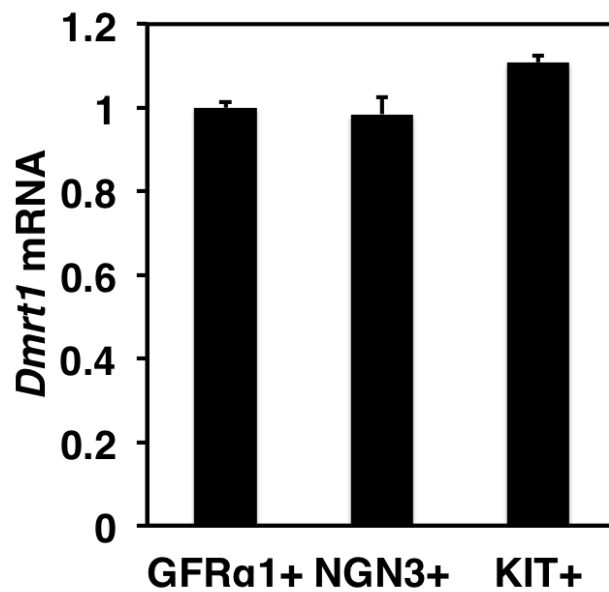


図 27. GFRα1+細胞、NGN3+細胞、および KIT+細胞における *Dmrt1* の mRNA 発現

*Dmrt1* の mRNA 発現量を DNA マイクロアレイにより定量した。GFRα1+細胞を 1 としたときの比を示す。3 者で発現の差は認められなかった。グラフは GFRα1+細胞、NGN3+細胞、KIT+細胞それぞれ 3、6、3 個体から 3 サンプルずつ作成し、これらの平均値を示している。エラーバーは標準誤差を示す。

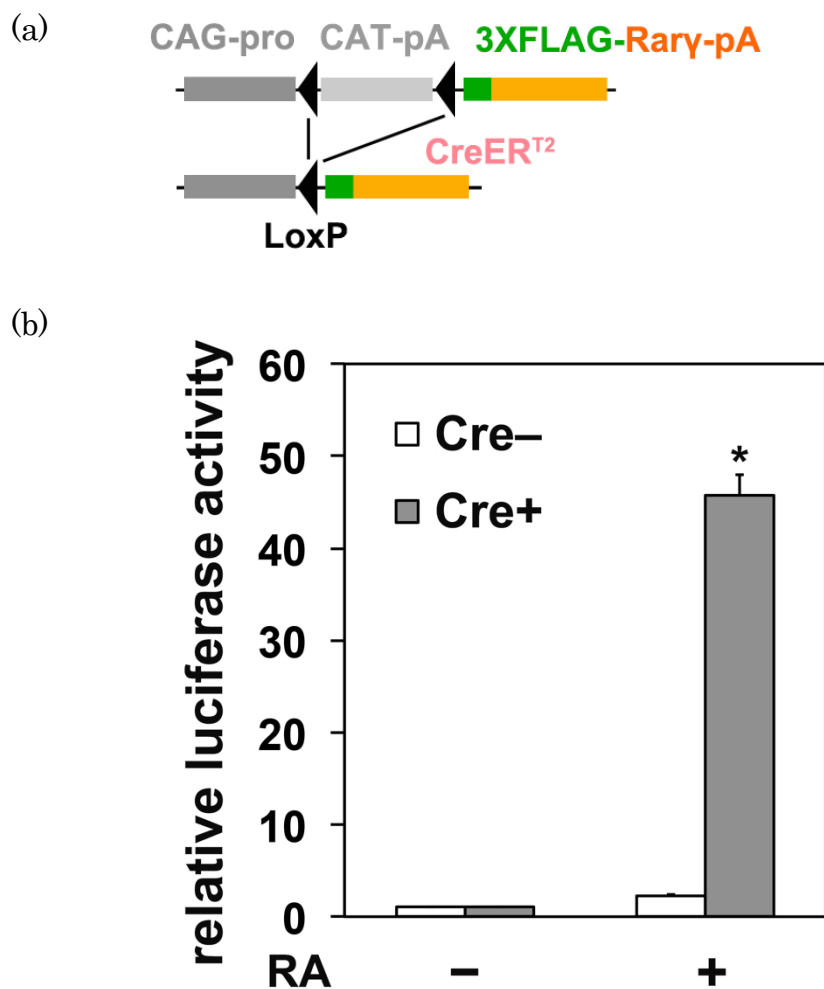
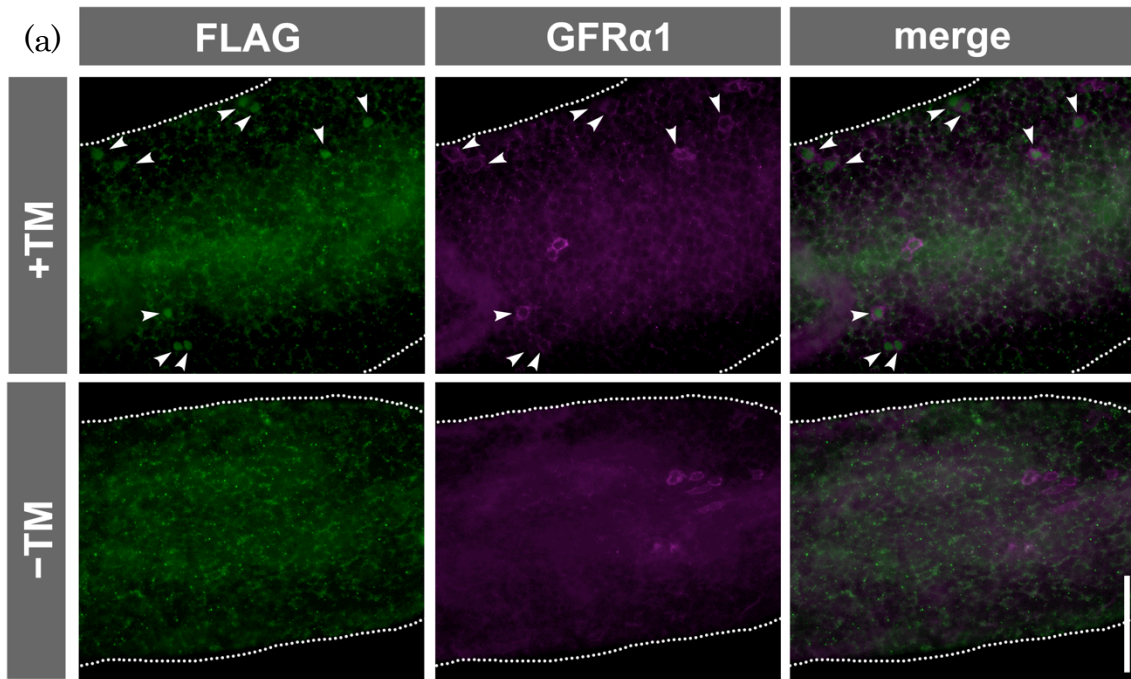


図 28. FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現した GS 細胞における RA に対する反応性

(a) *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* 遺伝子の模式図。Cre タンパクが活性化すると *loxP* で挟まれた *CAT* 遺伝子が除去され、*CAG* プロモーター下流で FLAG タグ付き RAR $\gamma$  が発現する。(b) *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* ベクターと、RA の結合配列 (RARE) の下流にルシフェラーゼ配列を持つ (RARE)<sub>9</sub>-pGL3 ベクター、さらに Cre 発現ベクターである pBS185 を導入した GS 細胞 (Cre+)、または空ベクターを共導入した GS 細胞 (Cre-) に RA を処置した際のルシフェラーゼ活性を測定した。Cre+ では Cre- と比較して RA 処置後のルシフェラーゼ活性が大きく上昇していた (\* $P < 0.0001$  [vs RA-; *t*-test])。



(b)

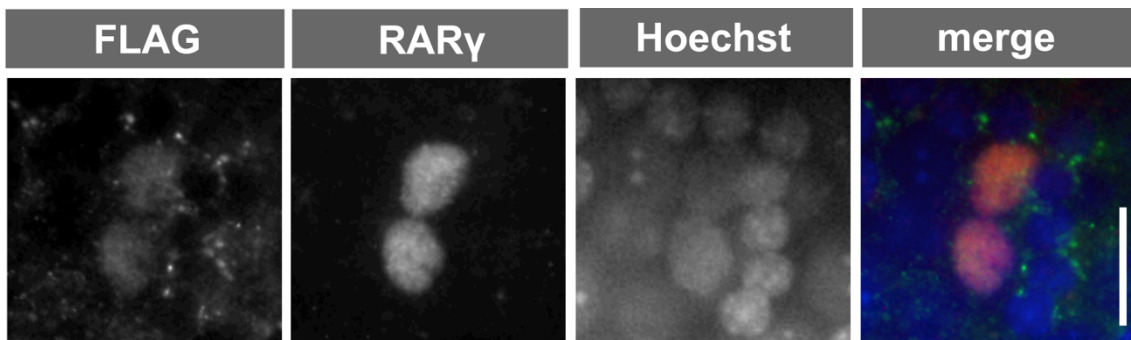


図 29. *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>;CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスにおける FLAG-RAR $\gamma$  の発現誘導

(a) *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>;CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスに TM を投与して 2 日後のマウスの精細管と TM を投与していない精細管の whole-mount 免疫染色を行った。FLAG を緑、GFR $\alpha$ 1 をマゼンタで示す。TM を投与することで GFR $\alpha$ 1+ 細胞のうち一部の細胞が FLAG を発現した。スケールバーは 100 $\mu$ m を示す。(b) 同マウスに TM を投与して 2 日後に精細管の whole-mount 免疫染色を行った。FLAG を緑、RAR $\gamma$  を赤、ヘキストを青で示す。FLAG+細胞は同時に RAR $\gamma$  を強く発現していた。スケールバーは 20 $\mu$ m を示す。

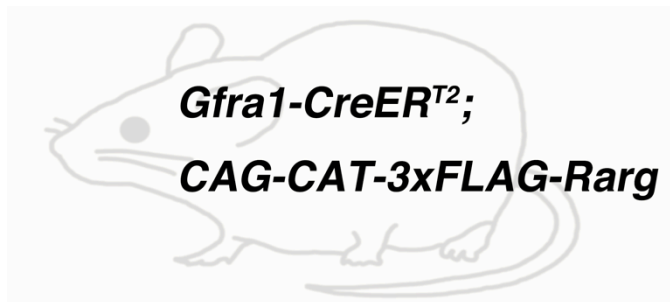


図 30. RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡：実験スケジュール

*Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* を VAD 条件下で飼育し、VAD マウスにした後、TM 投与により GFR $\alpha$ +細胞をラベルした (day -2)。2 日後、VA を投与し (day 0)、VA 投与 0、2 日後の精巢を採取した。

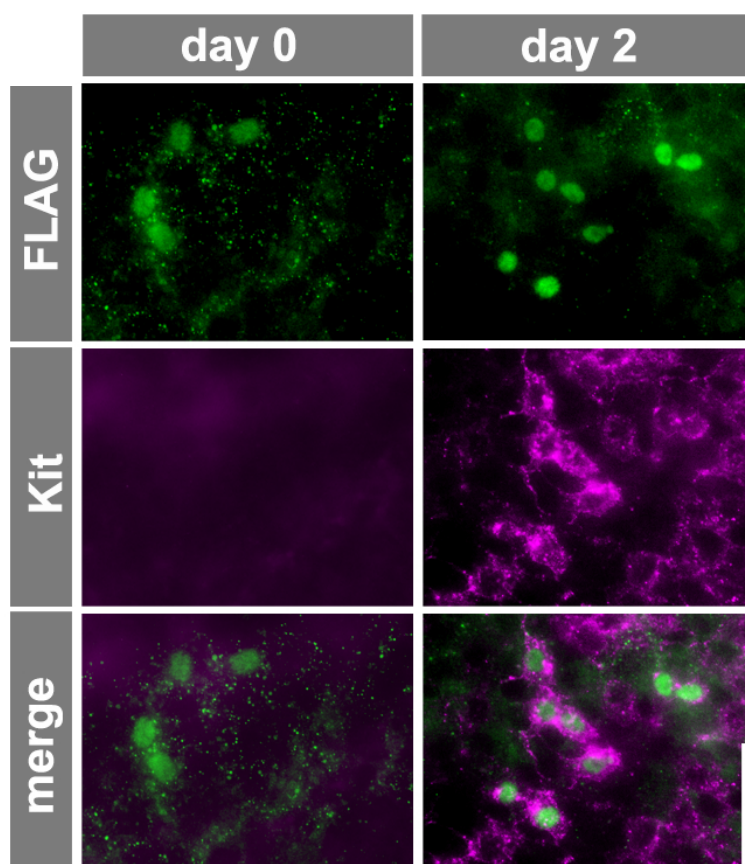


図 31 VAD 状態における RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡：免疫染色

図 29 で示したように採取した精細管を whole-mount 免疫染色した。Flag を緑、KIT をマゼンタで示す。VA 投与 2 日後、FLAG+細胞の多くが KIT を発現した。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。

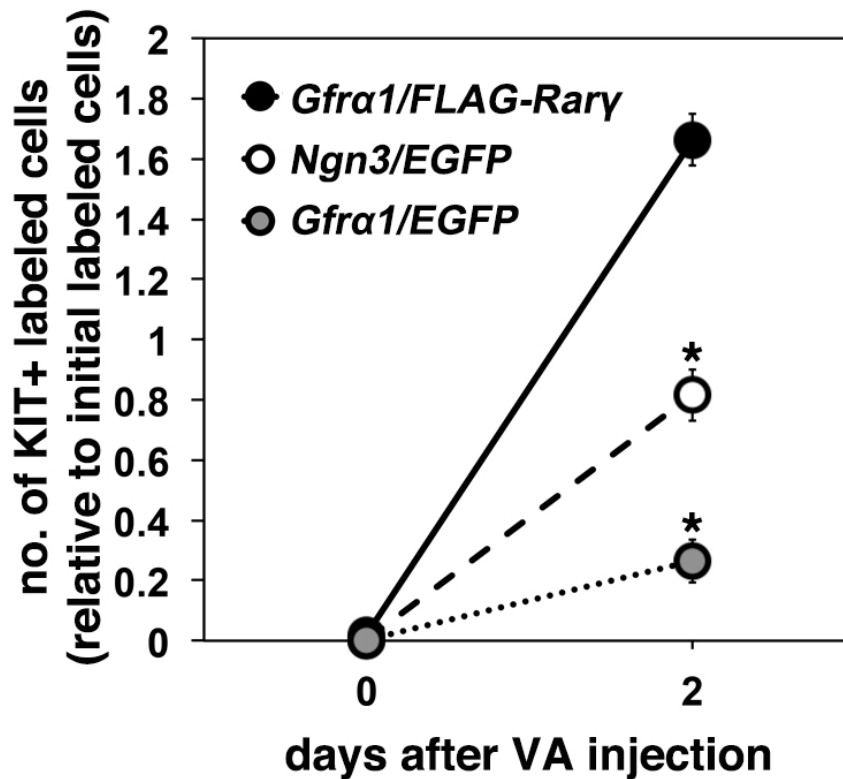


図 32. VAD マウスへ VA 投与 2 日後での、FLAG-RAR $\gamma$  強制発現 GFR $\alpha$ 1+細胞と正常な GFR $\alpha$ 1+細胞、NGN3+細胞から供給される KIT+細胞数の比較

図 30 より得られた結果から FLAG-RAR $\gamma$ +, KIT+細胞を計数し、VA 投与 0 日後(TMによりラベルした2日後)の全ラベル細胞数を1としたときの、FLAG+, KIT+細胞数の割合を示した (*Gfra1-CreER/FLAG-Rarg*)。また、図 9 (NGN3+細胞の追跡実験)と図 12 (GFR $\alpha$ 1+細胞の追跡実験)より得られた結果から、同様の方法で GFP+, KIT+細胞数の割合 (それぞれ *Ngn3-CreER/EGFP* と *Gfra1-CreER/EGFP*) を示した。VA 投与 2 日後、*Gfra1-CreER/EGFP* が 0.23 であるのに対し、*Gfra1-CreER/FLAG-Rarg* は 1.84 と、RAR $\gamma$  を強制発現させることで KIT+細胞が 8 倍多く発現していた。また、*Gfra1-CreER/FLAG-Rarg* は、*Ngn3-CreER/EGFP* と比較してより速やかに増加していた。グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。(\* $P < 0.003$  [vs *Gfra1-CreER/FLAG-Rarg*; *t*-test])。



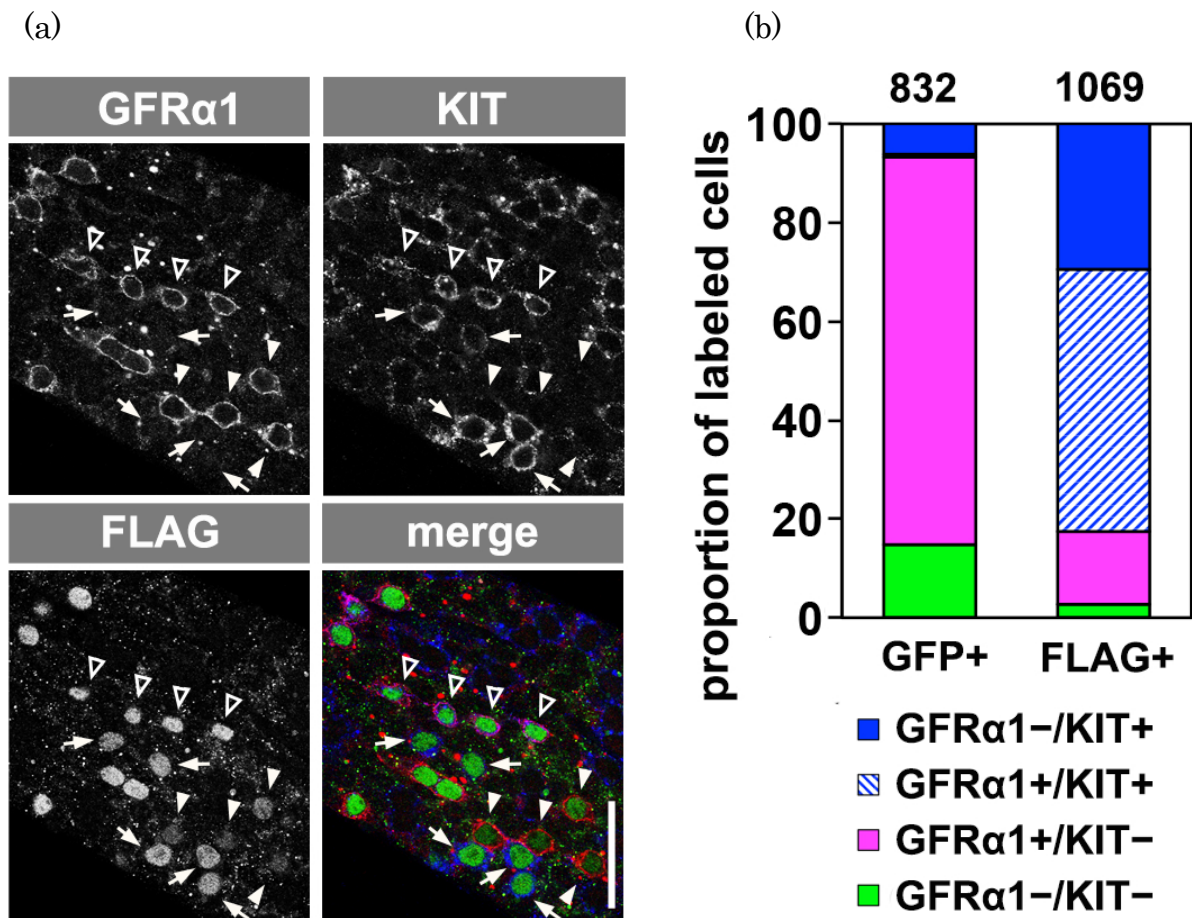


図 33. VAD マウスへの VA 投与 2 日後の FLAG-RAR $\gamma$ +細胞における GFR $\alpha$ 1 と KIT の発現

(a) VAD 時に GFR $\alpha$ 1+細胞であった細胞で FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現させ、VA を投与して 2 日後の精細管を whole-mount 免疫染色した。GFR $\alpha$ 1 を赤、KIT を青、FLAG を緑で示す。正常では観察されない GFR $\alpha$ 1+, KIT+細胞が多数観察された。GFR $\alpha$ 1+, KIT+細胞を白抜き矢頭、GFR $\alpha$ 1+, KIT-細胞を矢頭、GFR $\alpha$ 1-, KIT+細胞を矢印で示す。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。(b) FLAG-RAR $\gamma$ +細胞のうち、GFR $\alpha$ 1+細胞と KIT+細胞の構成比を示す(FLAG+)。対照群として *Gfra1-CreER<sup>T2</sup>; CAG-CAT-EGFP* の VAD マウスにおいて GFR $\alpha$ 1+細胞を GFP 標識したのち、VA を投与して 2 日後の GFP+細胞の構成比を示す (GFP+)。GFP+細胞ではほとんど観察されない GFR $\alpha$ 1+, KIT+細胞が、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞では約 52%発現していた。グラフ上部に合計細胞数を示す。



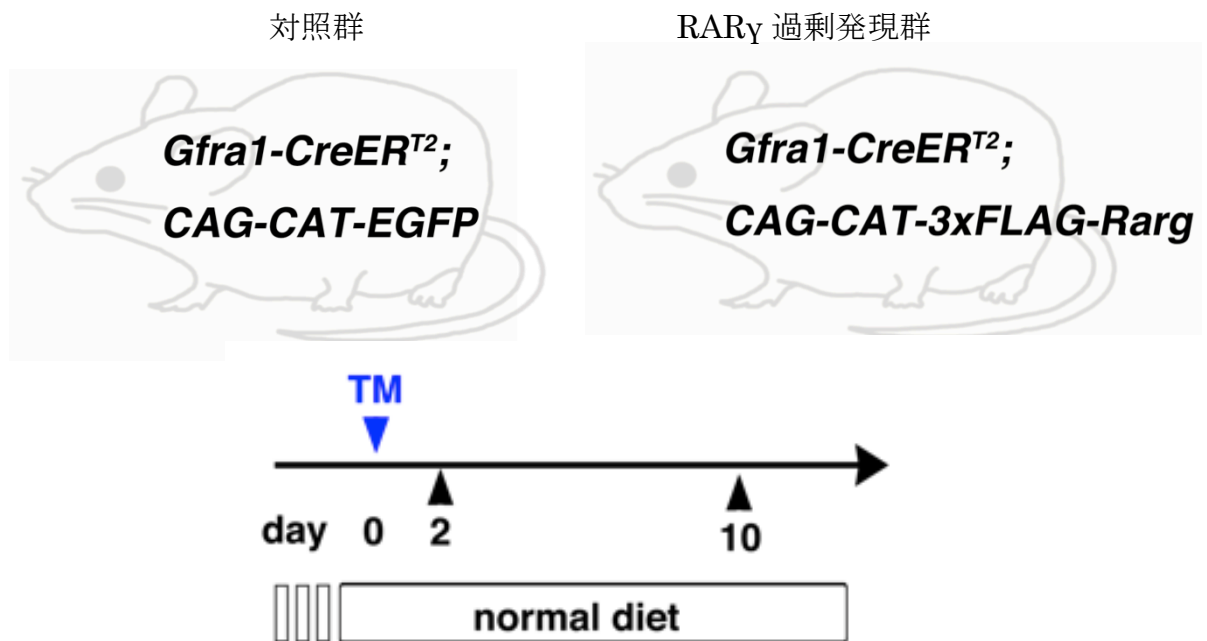


図 34 定常状態において FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡：実験スケジュール

*Gfra1-CreERT2*; *CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* マウスにおいて TM 投与により GFR $\alpha$ 1+細胞において FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現させた。TM 投与後 2、10 日後の精巢を採取した。対照群として FLAG-RAR $\gamma$  のかわりに GFP を発現する *Gfra1-CreERT2*; *CAG-CAT-EGFP* マウスを使用した。

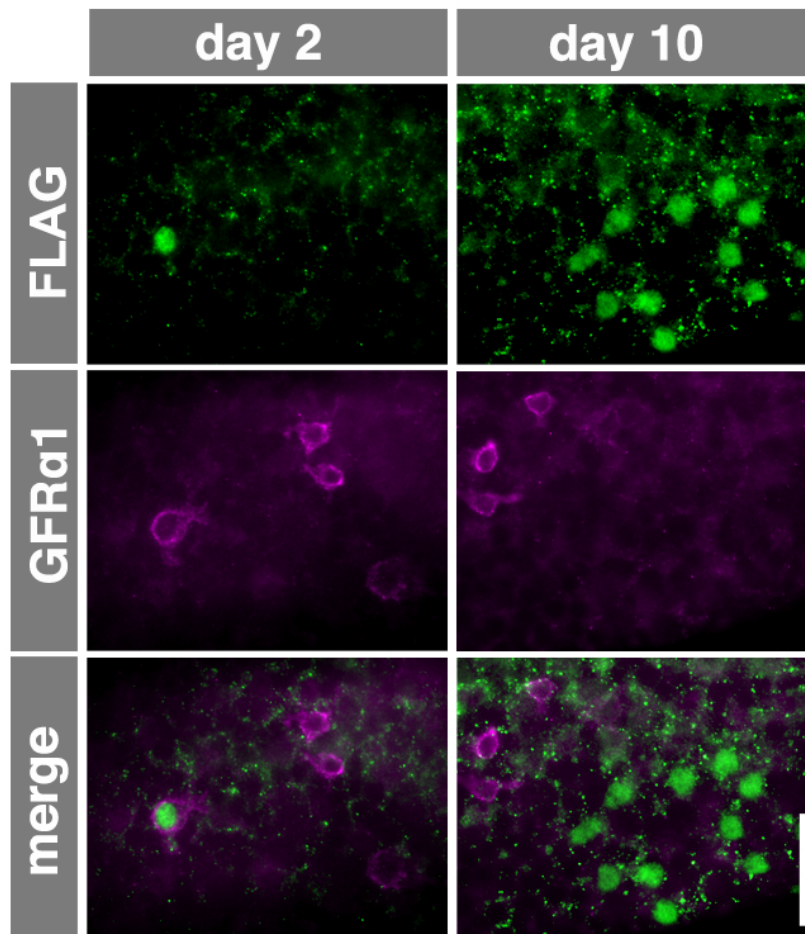


図 35. 定常状態において FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡 (RAR $\gamma$  強制発現群) : 免疫染色

GFR $\alpha$ 1+細胞に TM 投与により FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現させたのち、2、10 日後に採取した精細管を whole-mount 免疫染色した。FLAG-RAR $\gamma$  を緑、GFR $\alpha$ 1 をマゼンタで示す。スケールバーは 50 $\mu$ m。

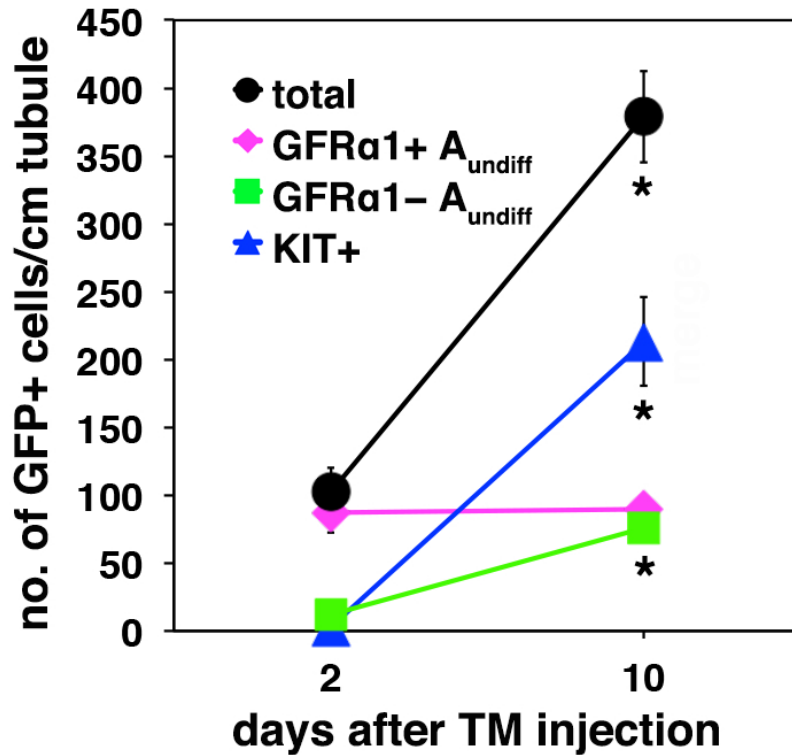


図 36. 定常状態において FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡 (GFP 発現による対照群) : ラベル細胞数の変化

*Gfra1-CreERT<sup>2</sup>; CAG-CAT-EGFP* マウスにおいて図 33 のスケジュールで実験を行った。whole-mount 免疫染色により GFP+細胞のうち GFR $\alpha$ 1+ A<sub>undiff</sub>、GFR $\alpha$ 1- A<sub>undiff</sub> (NGN3+ A<sub>undiff</sub> にほぼ対応する)、KIT+細胞数を計測し、精細管 cm あたりの細胞数として表示した。10 日後も GFR $\alpha$ 1+ (GFR $\alpha$ 1+, GFP+) 細胞は一定数存在していた。GFR $\alpha$ 1- (GFR $\alpha$ 1-, KIT-, GFP+) 細胞と KIT+ (KIT+, GFP+) 細胞は徐々に増加した。精巣数は 0、10 日後それぞれ 4 サンプルずつ使用した。グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。全ラベル細胞数、GFR $\alpha$ 1- A<sub>undiff</sub> 細胞数、KIT+細胞数において、TM 投与 10 日後は 2 日後と比較して有意に増加していた (\* $P < 0.002$  [*t*-test])。

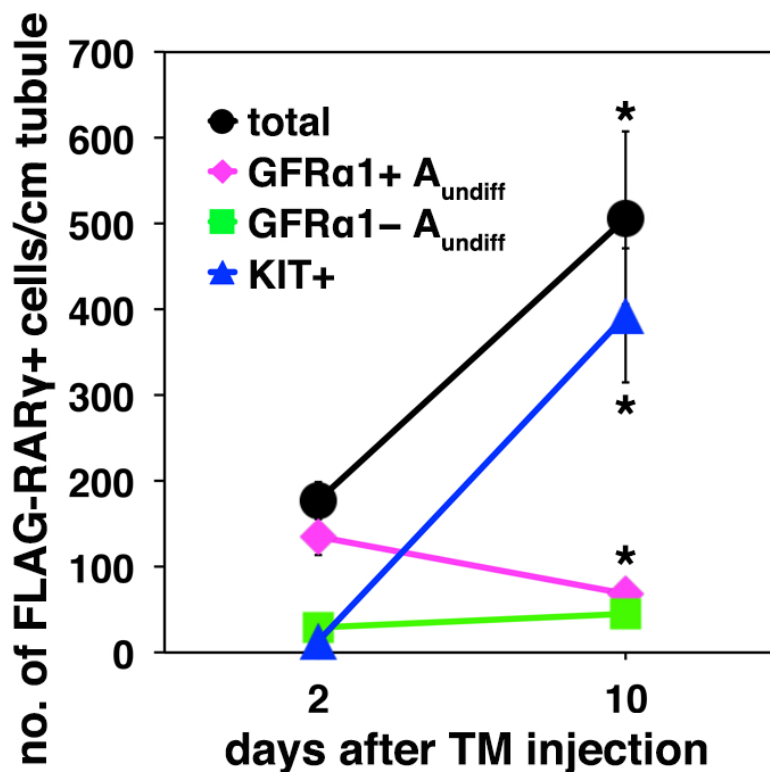


図 37. 定常状態において RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞の運命追跡 (RAR $\gamma$  強制発現群) : ラベル細胞数の変化

図 34 より得られた結果から、FLAG-RAR $\gamma$ +細胞のうち GFR $\alpha$ 1+ A<sub>undiff</sub>、GFR $\alpha$ 1- A<sub>undiff</sub> (NGN3+ A<sub>undiff</sub> にほぼ対応する)、KIT+細胞数を計測し、精細管 cm あたりの細胞数として表示した。10 日後、GFR $\alpha$ 1+ (GFR $\alpha$ 1+, FLAG+) 細胞は減少していた。GFR $\alpha$ 1- (GFR $\alpha$ 1-, KIT-, FLAG+) 細胞数はほとんど変化せず、KIT+ (KIT+, FLAG+) 細胞は増加した。精巣数は 2、10 日後それぞれ 4 サンプルずつ使用した。グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。GFR $\alpha$ 1+細胞数は、TM 投与 2 日後と比較して有意に減少していた (\* $P < 0.05$  [t-test])。

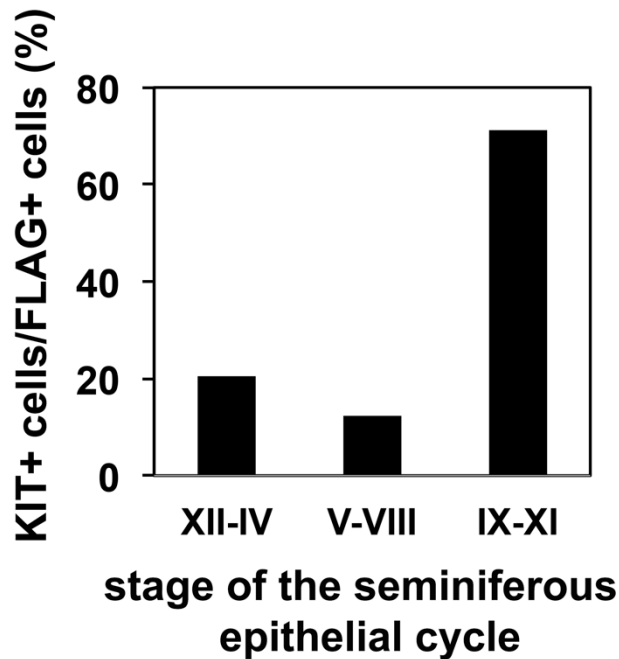


図 38. FLAG-RAR $\gamma$  を強制発現した GFR $\alpha$ 1+細胞のステージごとの KIT 発現率

*Gfra1-CreERT<sup>2</sup>;CAG-CAT-3xFLAG-Rarg* の正常マウスに TM を投与して 4 日後のステージごとの FLAG-RAR $\gamma$ +細胞中の KIT+細胞の割合を示した。FLAG と KIT の whole-mount 免疫染色を行い、ステージ XII-IV、V-VIII、IX-XI それぞれ 161、57、76 個の FLAG+細胞を計数した。TM 投与から FLAG-RAR $\gamma$  が発現するまでの時間 (1-2 日間) を考慮すると、FLAG-RAR $\gamma$  が誘導されたステージは測定時の 3-4 ステージ早い段階であると予想される。そのため、KIT の発現する細胞の割合が最も高いステージ IX-XI は、FLAG-RAR $\gamma$  が誘導されたときにはステージ VII-IX であったと考えられる。

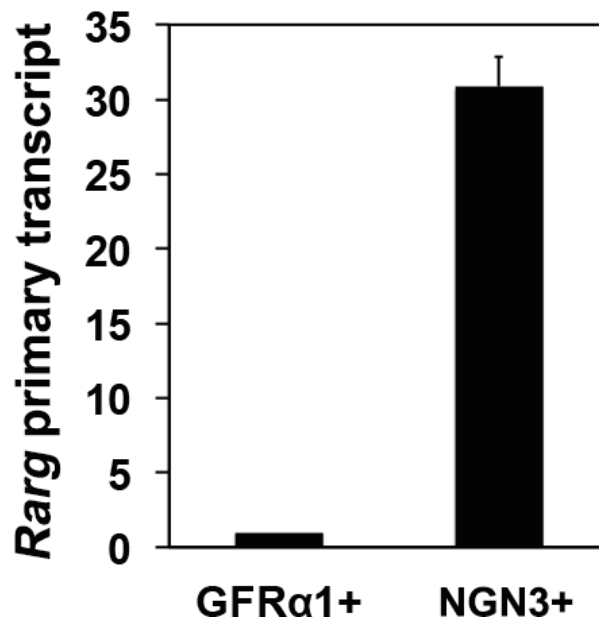


図 39. GFRα1+細胞および NGN3+細胞における、*Rarg* 遺伝子のイントロン配列に由来する転写産物の定量

定量 RT-PCR により、*Rarg* mRNA のイントロンを認識するプライマーを用い、*Rarg* 遺伝子に由来する、スプライシングを受ける前の一次転写産物の発現を定量した。テンプレートには、FACS によって採取した GFRα1+細胞と NGN3+細胞の total RNA の逆転写産物を用いた。GFRα1+細胞と比較して NGN3+細胞で有意に発現が高かった。*Actinb* の発現で補正し、GFRα1+細胞を 1 として比率で示している。GFRα1+細胞 3 サンプル中 2 サンプルで発現が検出できなかったため、1 サンプルの結果を示す。

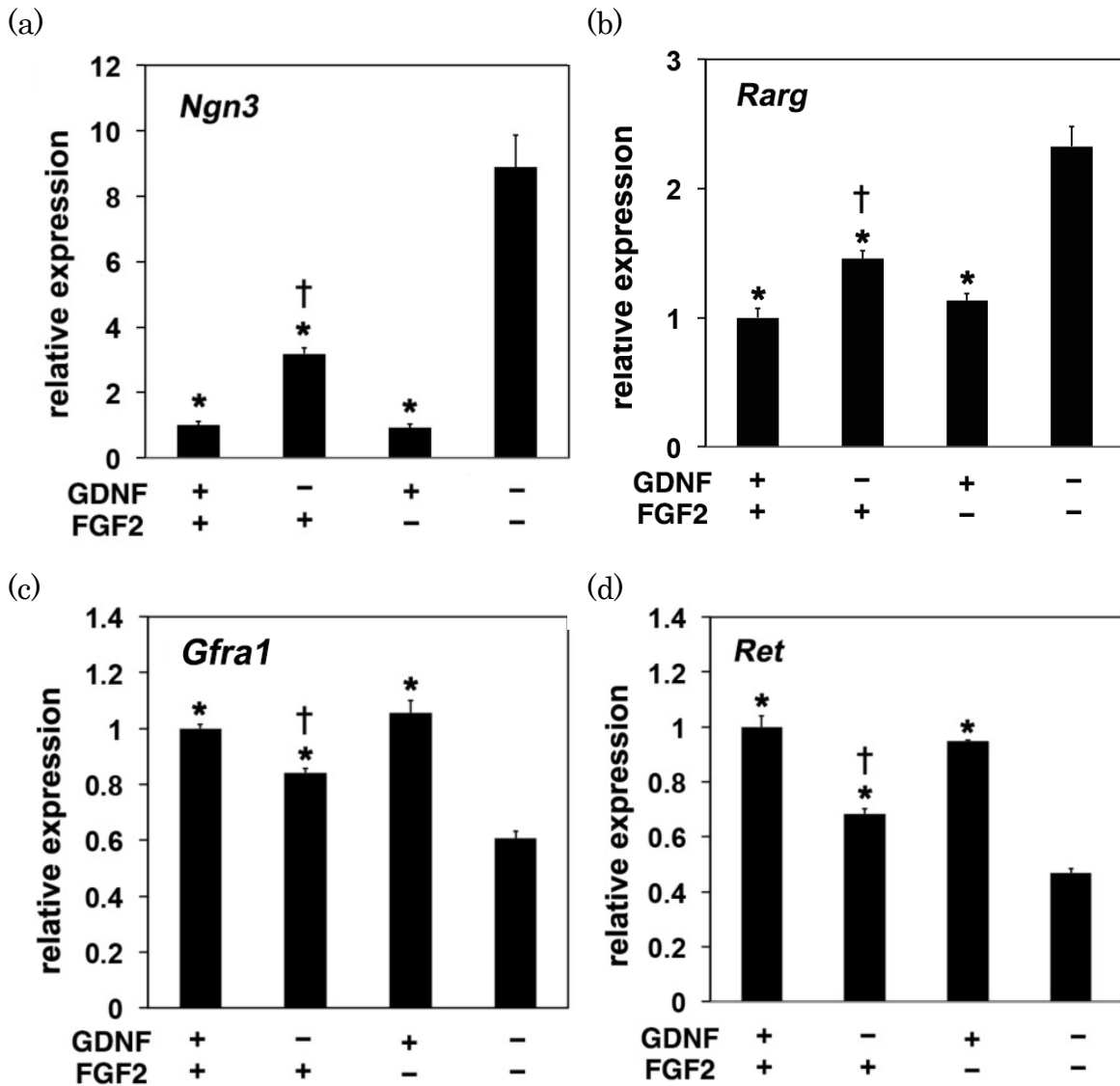
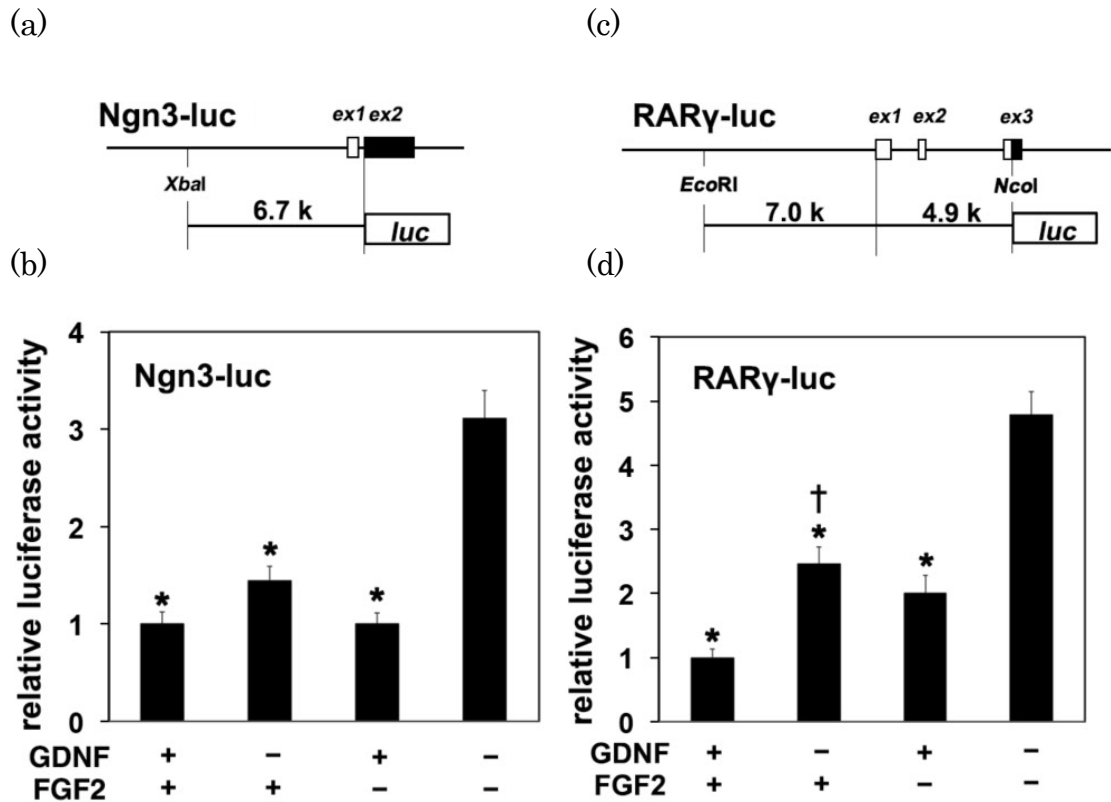


図 40. GS 細胞における各遺伝子発現に対する GDNF / FGF2 の影響 : mRNA 発現量

GS 細胞を GDNF、FGF2 存在、または非存在下で 48 時間培養した場合の (a) *Ngn3* (b) *Rarg* (c) *Gfra1* (d) *Ret* mRNA 発現量を定量 PCR 法にて測定した。独立で培養した細胞をそれぞれ 3 サンプルずつ使用した。グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。GDNF 非存在下または GDNF、FGF2 非存在下では *Ngn3*, *Rarg* mRNA 発現が促進され、*Gfra1*, *Ret* は抑制されていた (\* $P < 0.02$  [vs GDNF-/FGF2-;  $t$ -test], † $P < 0.02$  [vs GDNF+/FGF2+;  $t$ -test])。



#### 41. GS 細胞における *Ngn3*、*Rarg* の転写に対する GDNF / FGF2 の影響：ルシフェラーゼアッセイ

(a、c) マウス *Ngn3* 遺伝子と Ngn3-luc (一部分) (a) とマウス *Rarg* 遺伝子及び RARγ-luc プラスミドの構造 (一部分) (c)。(a) Ngn3-luc はルシフェラーゼ遺伝子上流に *Ngn3* 配列の上流 6.7kbp とエクソン 2 の開始コドンまでの配列を含む DNA 断片を挿入した。(c) RARγ-luc はルシフェラーゼ遺伝子上流にマウス *Rarg* 配列の上流 7kbp とエクソン 3 内の開始コドンまでの配列を結合した。白四角が 5'UTR、黒四角が ORF 部分を示す。(b、d) Ngn3-luc (b) または RARγ-luc (d) を導入した GS 細胞を GDNF、FGF2 存在下、または非存在下で 48 時間培養した際のルシフェラーゼ活性を測定した。独立で培養した細胞をそれぞれ 3 サンプルずつ使用し、グラフは平均値を示した。エラーバーは標準誤差を示す。GDNF、FGF2 いずれもルシフェラーゼ活性を有意に抑制した (\* $P < 0.02$  [vs GDNF-/FGF2-; *ttest*], † $P = 0.016$  [vs GDNF+/FGF2+; *ttest*])。



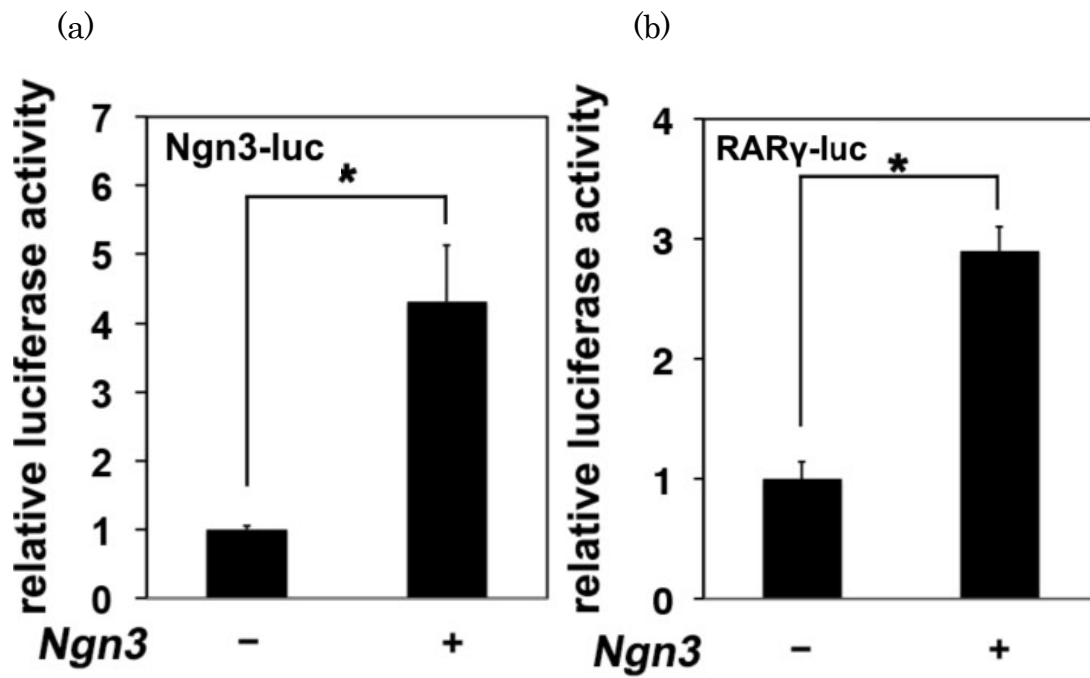


図 42. *Ngn3* と *Rarg* の転写における NGN3 の関与

*Ngn3-luc* (a) または *RARγ-luc* (b) を *Ngn3* 発現ベクターと共導入したときのルシフェラーゼ活性の比較。いずれも *Ngn3* 発現ベクター (pcDNA3-*Ngn3*) を共導入するとルシフェラーゼ活性が上昇した (\* $P < 0.005$  [*t*-test])。

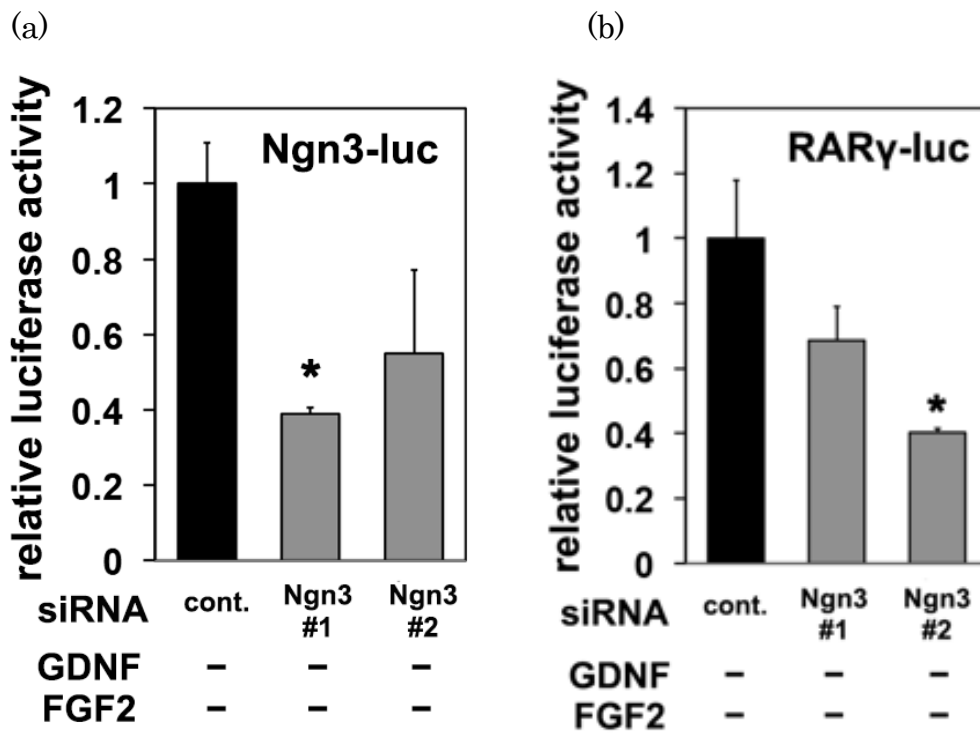


図 43. *Ngn3* と *Rarg* の転写における *Ngn3* に対する siRNA の影響

*Ngn3*-luc (a) または *RARγ*-luc (b) を *Ngn3* に対する siRNA と共導入したときのルシフェラーゼ活性の比較。siRNA を共導入するとルシフェラーゼ活性が抑制された (\* $P < 0.05$  [*t*-test])。

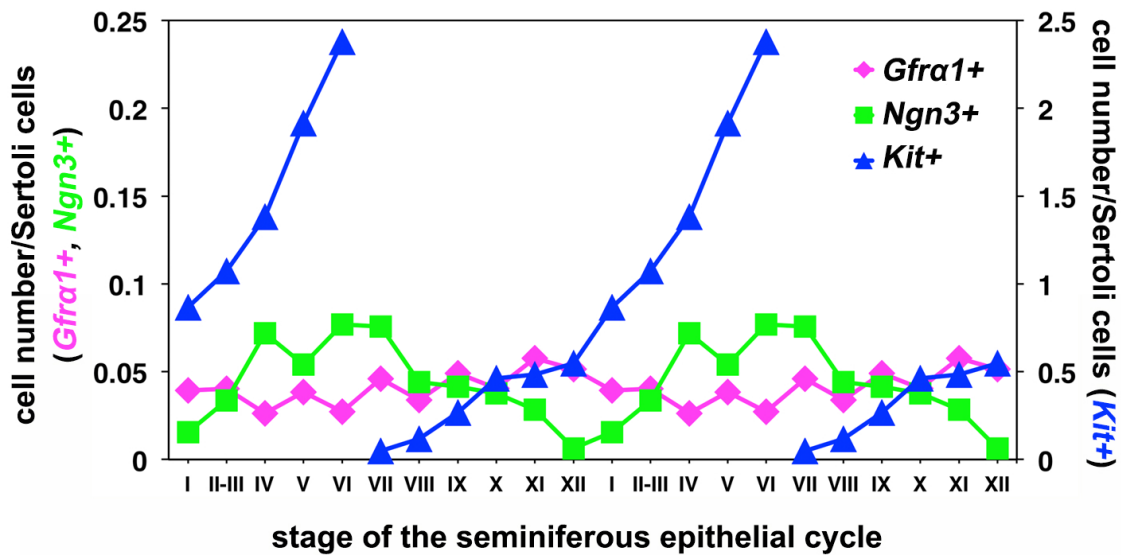


図 44. 精細管周期の各ステージにおける *Gfra1+*, *Ngn3+* および *Kit+* 細胞の数の変化

精細管周期のそれぞれのステージにおいて、*Gfra1+*、*Ngn3+*、*Kit+* 細胞の数をセルトリ細胞あたりの数で示した。3 精巢の切片から *in situ* hybridization によって精細管計 894 断面の *Gfra1+*、*Ngn3+*、*Kit+* 細胞を計数し、セルトリ細胞あたりの数として表示した。ステージは隣接切片の PAS 染色により判定した。実数値は表 5 に示す。

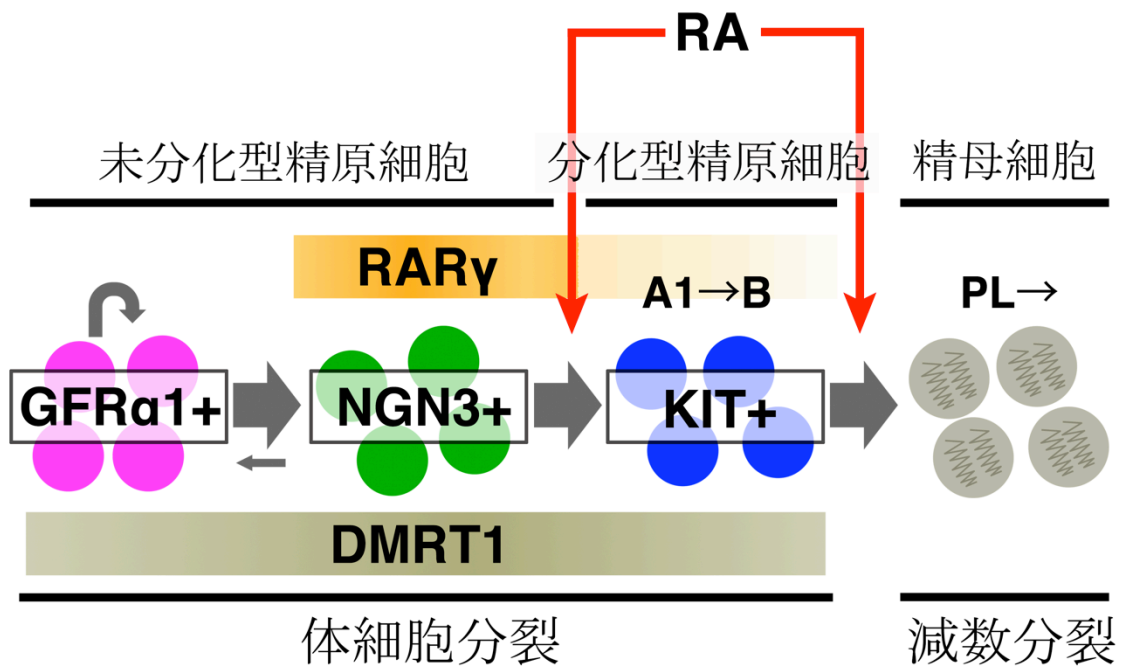


図 45.  $RAR\gamma$  と  $DMRT1$  の発現パターン

$RAR\gamma$  は  $NGN3+$ 細胞に、 $DMRT1$  は未分化型精原細胞から  $KIT+$ 細胞まで発現している。同じ  $RA$  シグナルに対して、 $RAR\gamma$  が未分化型精原細胞から分化型精原細胞へ分化する際の制御を、 $DMRT1$  が減数分裂に入る際の制御に主に関与している可能性が考えられる。

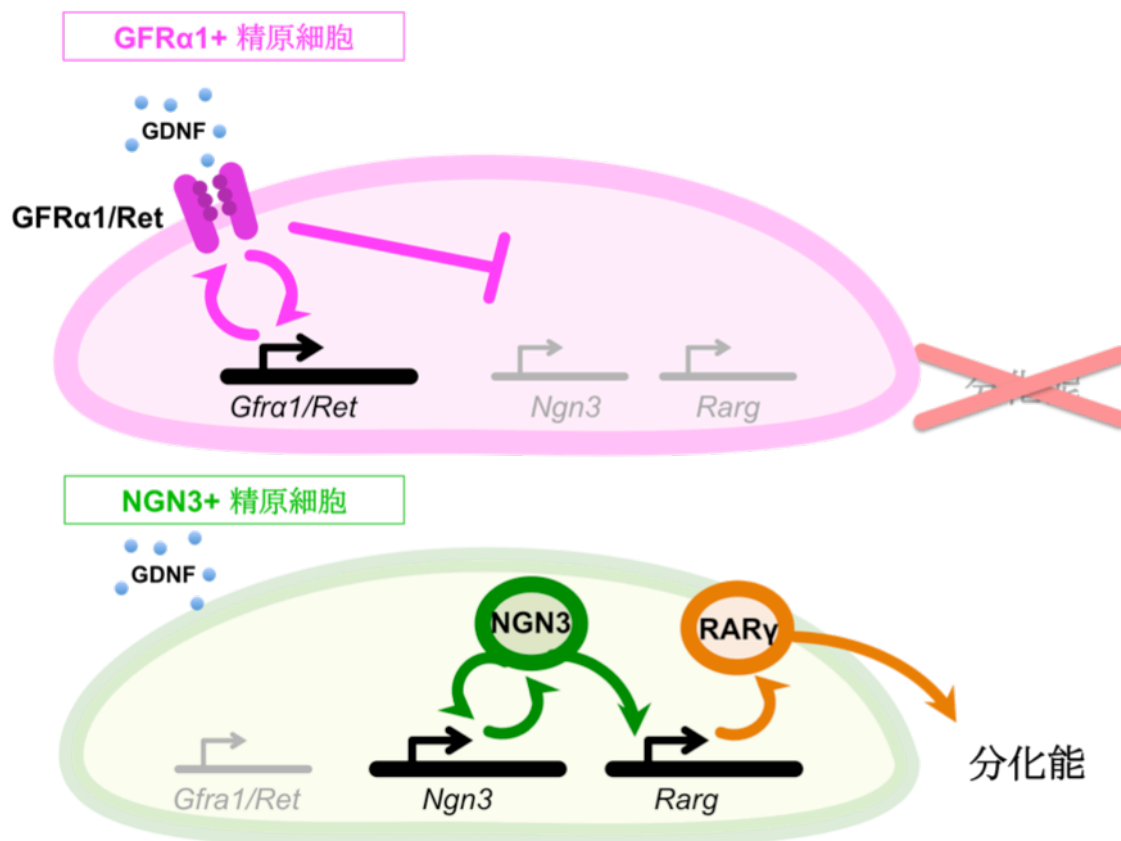


図 46. GFRα1+状態と NGN3+状態を保つ機構と、RAR $\gamma$  発現によって分化能を生み出す機構のモデル

GDNF の受容体である GFRα1/Ret は GDNF シグナルを伝達するとともに、それら自身の遺伝子発現を活性化する。これによってポジティブフィードバックを形成し、GFRα1+細胞として安定する。一方で GDNF シグナル系が弱まると *Ngn3* 転写の抑制が外れ、NGN3 自身によるポジティブフィードバックにより NGN3+細胞として安定する。NGN3 は RAR $\gamma$  の転写を活性化し、RAR $\gamma$  を発現した NGN3+細胞は RA により分化する能力を獲得する。

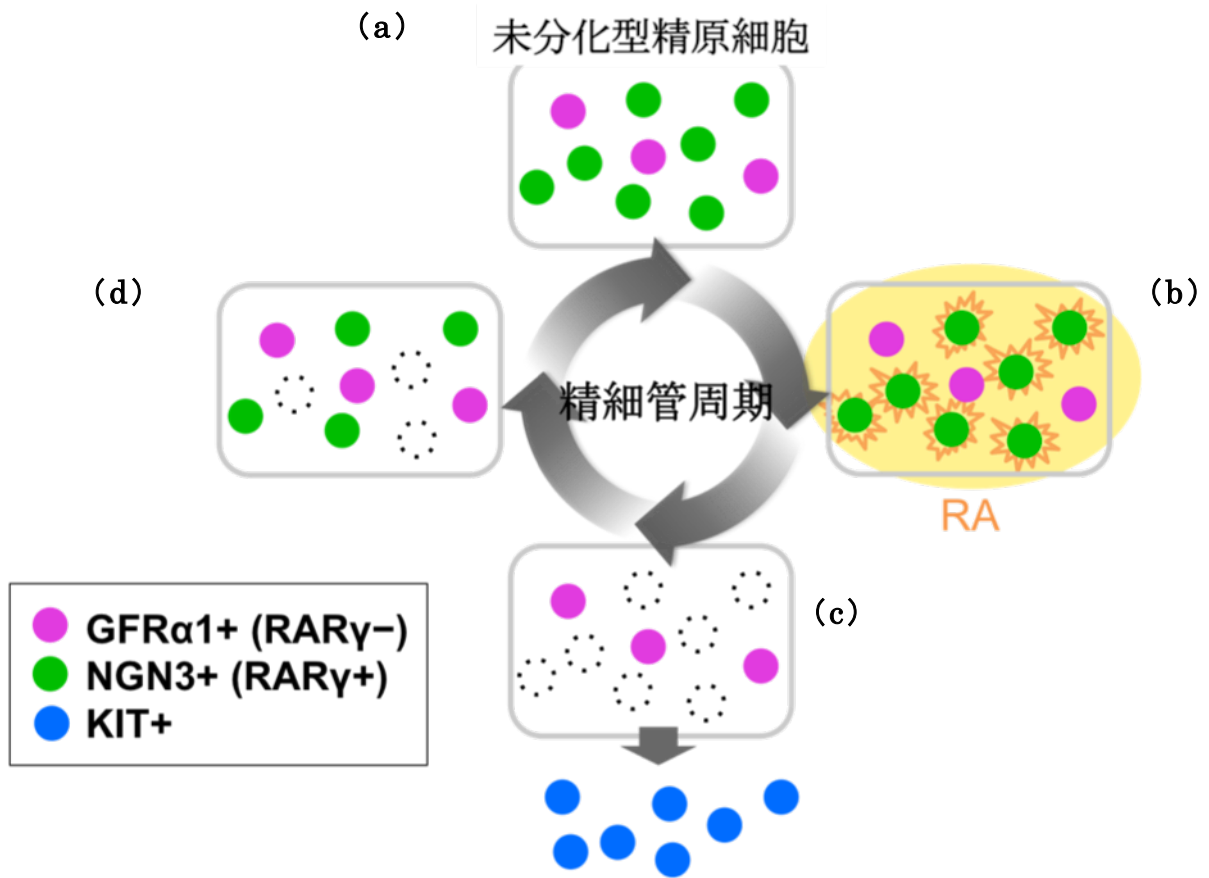


図 47. 精細管周期にともなう、精子幹細胞システムの挙動

$A_{undiff}$  は  $RAR\gamma$  を発現していない  $GFR\alpha 1+$ 細胞（マゼンタ）と、 $RAR\gamma$  を発現している  $NGN3+$ 細胞（緑）で構成される (a)。RA が合成されて細胞全体が RA に暴露されると (b)  $RAR\gamma$  を発現している  $NGN3+$ 細胞のみが反応して  $KIT+$ 細胞に分化する (c)。未分化状態を維持した  $GFR\alpha 1+$ 細胞は RA 非依存的に  $NGN3+$ 細胞を生み出し (d)、再び  $A_{undiff}$  が  $GFR\alpha 1+$ 細胞と  $NGN3+$ 細胞で構成される (a)。 $GFR\alpha 1+$ 細胞は周期を通して一定数保たれている。このサイクルをつくることで精子幹細胞を維持しながら分化細胞を生み出している。