

奨励金No.1450

精巣・腎臓の臓器間間質細胞移植 ～精巣は慢性腎臓病を救えるか～

内田 あや

理化学研究所バイオリソースセンター 客員研究員



Testicular interstitium as a novel tool to rescue the endocrine function of kidney

Aya Uchida,

RIKEN BRC, Visiting Researcher

腎臓と精巣は共に個体発生の過程において中間中胚葉から発生し、共通して管構造と間質からなる組織学的特徴を持つことに加え、両者のシグナル因子を介した器官発生および細胞制御機構には共通項が多い。本研究では精巣・腎臓間の共通性に着目し、これら臓器間の間質細胞の互換性・可塑性を解析すべく、両臓器間での間質細胞交換移植を試みた。結果、若齢マウスの精巣間質には腎臓間質に定着しうる未分化な幹細胞集団が存在する事を明らかにした。同時に、精巣には腎臓同様液体の流れがあることに着目し、精巣内の「液体の流れ」を介したホメオスタシス制御機構に迫った。

The kidneys and testes both originate from the intermediate mesoderm during embryonic development in mammals. Their interstitial tissue is both responsible for hormone secretion, and they share many signaling pathways in common to modulate their homeostasis. By focusing on the similarity of the kidneys and testis, this study aims to rescue impaired functions of renal interstitial cells by utilizing testicular interstitial cells. We explored the plasticity of interstitial cells between the mouse testis and kidney and uncovered a novel progenitor interstitial cell population residing in the juvenile mouse testis which can colonize in the renal interstitium. Noting that fluid flow in the kidney plays an important role in its organ homeostasis, we uncovered unexpected functions of unidirectional luminal fluid flow in the testis to modulate its organ homeostasis.

1. 研究内容

腎臓は血液を濾過して尿を産生し、代謝老廃物の排出や体液恒常性の調節をするとともに、間質からのホルモン産生を介して血圧調整・造血促進を行う内分泌器官である。一方、精巣は性成熟以降生涯を通して精子産生を担う一方で、同じく間質からのホルモン産生を担う臓器である。腎臓と精巣は共に個体発生の過程において中間中胚葉から発生し、共通して管構造と間質からなる組織学的特徴を持つことに加え、両者のシグナル因子を介した器官発生および細胞制御機構には共通項が

多い。本研究課題では精巣・腎臓間での間質細胞交換を通して腎機能のレスキューを可能とする実験系の確立を目指すとともに、これらの臓器におけるホメオスタシス制御機構、および細胞運命決定機構の解明を目的として研究を行った。申請者は当初の予定どおり (1) 精巣・腎臓間での間質細胞交換移植実験に取り組む傍ら、(2) 「液体の流れ」を介した精巣内ホメオスタシス制御機構の解明に迫った。

1. 精巣-腎臓間の間質細胞交換移植

重症度の程度に拘らず世界人口の10%は慢性腎臓病に罹患しており、そのうち10%の人は腎代替療法なくしては生存できないと言われている。一般的に腎機能の低下は不可逆的なものだが、その根本的な治療法は未だ存在しない。慢性腎臓病では腎臓間質の線維化により腎臓間質由来のホルモン分泌量が低下することで、血圧の上昇・腎性貧血が進行することが知られている。そこで、本研究では精巣と腎臓の発生起源の同一性に着目し、精巣-腎臓間の間質細胞交換移植精巣間質細胞を用いた腎臓間質細胞のレスキューを試みた。本研究ではまず、両臓器間の間質細胞の可塑性を解析するため、ドナーとして全身の細胞でGFP発現を誘発するCAG-EGFPマウス、レシピエントとして野生型C57BL/6マウスを用いて、腎臓-精巣間の間質細胞移植を行った。まず腎臓由来間質細胞の精巣間質への移植を試みたところ、これらの細胞の定着は若齢(1-2週齢)マウス間の移植であってもごく僅かしかみられなかった。一方で、精巣由来間質細胞の腎臓間質への移植を試みたところ、若齢マウス間では腎臓間質への定着が顕著にみられ、一部ドナー由来細胞の尿管上皮への定着も確認された。しかしながら、成体(8週齢)マウス精巣由来の間質細胞は腎臓被膜下には定着

するものの、腎臓間質への定着・コロニー形成は見られなかった。このことから、若齢マウス精巣には双方の臓器に定着しうる、より未分化かつ臓器間での可塑性を持つ間質細胞が存在するのではないかと考えられた。これに対し、若齢マウスの精巣間質細胞の特性を明らかにするため、申請者は2週齢マウス精巣についてシングルセルRNAシーケンス(scRNAseq)解析により一細胞レベルでの精巣間質細胞の性状解析を行った。その結果、精巣間質細胞は6つのクラスターに分かれることが明らかとなった。この中でも特にネスチン(Nes)陽性として標識される、少数の間質細胞からなるユニークな未分化精巣間質細胞の集団を新たに同定した(図1)。先行研究から、精巣におけるNes陽性細胞は精巣間質幹細胞である可能性が示唆されている(Jiang et al., 2014)。しかし、Nesは血管周皮細胞にも強く発現しているため、Nes陽性の精巣間質幹細胞と血管周皮細胞との切り分けが困難であった。本研究では一細胞レベルで精巣間質細胞の特性解析を行うことによって、Nes陽性の精巣間質細胞集団の同定に成功し、当該幹細胞集団がMxd3をはじめとする複数のがん抑制遺伝子を高発現することを見出した。今後は、更なる解析によって当該細胞の分化の軌跡を明らかにする一方、最終的には当該細胞の分取および培養下

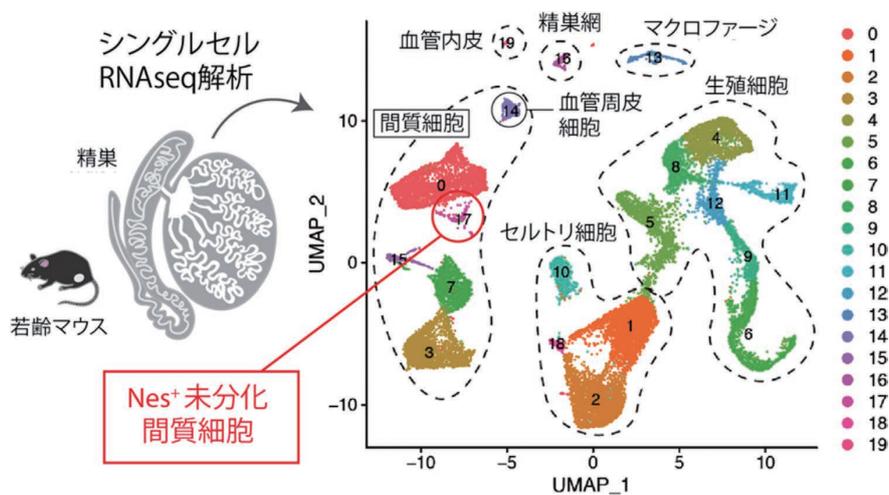


図1: シングルセルRNAseq解析による未分化精巣間質細胞の新規同定

でのスケールアップを通して、より未分化な形質をもつ間質細胞を優先的に移植実験に用いることのできる実験系の立ち上げに取り組む予定である。

2. 精巣弁セルトリバルブを介した精巣ホメオスタシス御機構の解明

ほ乳類の精巣内には腎臓同様に管腔液が流れており、精巣で作られた精子は精細管内の管腔液の流れに乗って精巣の外へと運ばれる。しかし、精巣内における管腔液の流れが精巣の恒常性の維持にどのような機能を果たすのかは、明らかとなっていない。精巣の出口部分には精巣網という網目状の構造があり、これに隣接してセルトリバルブと呼ばれる弁構造が存在する。本研究を通して申請者は精巣網特異的な転写因子 Sox17 の欠損がこのセルトリバルブ弁の形成不全を引き起こし、これによる管腔液の逆流が精子発生不全による男性不妊に繋がることを明らかにした。このことから、精巣内における管腔液の流れはセルトリバルブ弁によって一方向性に保たれていること、そして管腔液の流れそのものが、精巣における正常な精子形成を支えていることが明らかになった。さらに、セルトリバルブ弁形成不全マウスに scRNAseq 解析を行うことによって、Sox17 を欠損した精巣網上皮細胞では R-spondin1、TGFb2、FGF9 をはじめとする様々な成長因子をコードする遺伝子発現が低下していることを発見した。同時に、セルトリバルブを構成するセルトリ細胞がこれらの成長因子を受容する受容体をコードする遺伝子を他のセルトリ細胞と比べて高いレベルで発現することを解明した。以上のことは、精巣網とセルトリバルブの間におけるパラクライン制御によるクロストークが存在することを示唆している。最後に、Sox17-cKO マウス精巣由来のセルトリ細胞を他マウス精巣の Sox17 を発現する精巣網の隣へと再配置したところ、これらのセルトリ細胞はセルトリバルブ弁を形成し、上流の精細管における正常な精子発生を支えられることが明らか

となった。以上の結果から、①セルトリバルブ弁が精巣における管腔液の流れを一方方向に保つことによって精巣全体の精子発生を支えること、また、②Sox17 を発現する精巣網の上皮細胞が RSPO1 や TGFb2 をはじめとする成長因子の分泌を介して、パラクライン的にセルトリバルブの誘導を支えることが明らかになった(図2)。

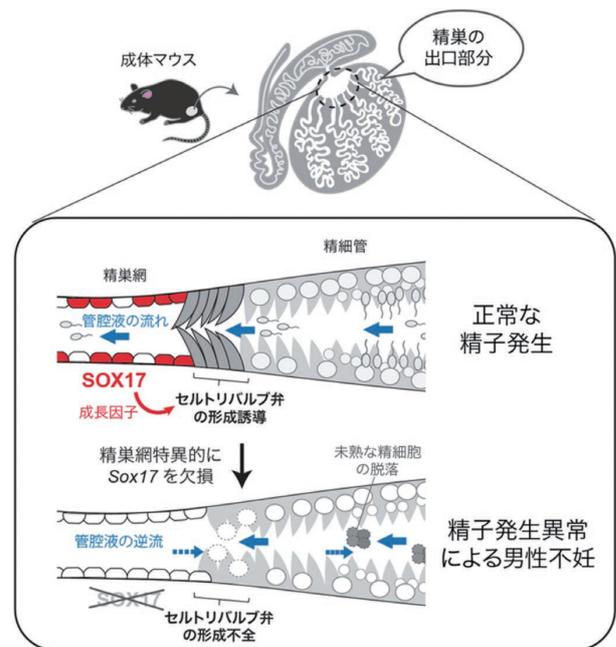


図2：管腔液の「流れ」を介した精巣内ホメオスタシス制御

2. 発表(研究成果の発表)

1. Uchida, A., Imaimatsu, K., Suzuki, H., Han, X., Ushioda, H., Uemura, M., Imura-Kishi, K., Hiramatsu, R., Takase, H.M., Hirate, Y., Ogura, A., Kanai-Azuma, M., Kudo, A., Kanai, Y. "SOX17-positive rete testis epithelium is required for Sertoli valve formation and normal spermiogenesis in the male mouse", Nature Communications, vol. 13, 1, 7860, 2022.
2. Imaimatsu, K., Uchida, A., Hiramatsu, R., Kanai, Y. "Gonadal Sex Differentiation and Ovarian Organogenesis along the Cortical-Medullary Axis

in Mammals”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, 13373, 2022.

3. Imura-Kishi K.#, Uchida, A.#, Tsunekawa N., Suzuki H., Takase, H.M., Hirate Y., Kanai-Azuma M., Hiramatsu R., Kurohmaru M., Kanai, Y. “Low retinoic acid levels mediate regionalization of the Sertoli valve in the terminal segment of mouse seminiferous tubules”, *Scientific Reports*, vol. 11, 1110, 2021. # Equally contributed

4. Aya Uchida. The International Symposium “Totipotency and Germ Cell Development”, Invited speaker. “The formation of Sertoli Valve and spermatogenesis is modulated by SOX17-positive rete testis in mouse testis”. Fukuoka, Japan. 2022.

5. ○内田あや、鈴木穂香、高瀬比菜子、平手良和、平松竜司、宮東昭彦、小倉淳郎、秋元義弘、金井正美、金井克晃「哺乳類の精巣網—セルトリバルブを介した新規の曲精細管内のホメオスタシス維持機構の発見」第115回日本繁殖生物学会大会、東京、2022年（ポスター発表・査読あり）