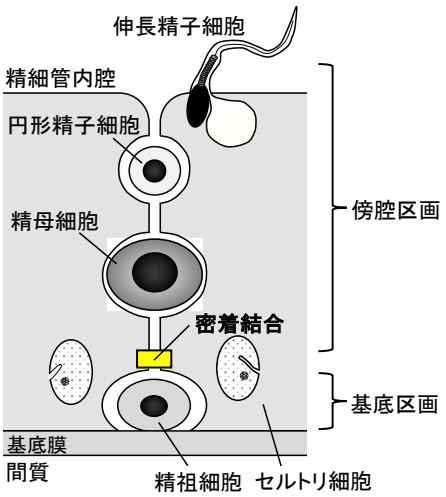
124　密着結合に着目した精祖細胞の分化制御機構の解明	菅原　太一

【目的】哺乳動物の精巣で形成される精子は、次世代の個体発生を担う配偶子である。精子が精子幹細胞から適切に分化するためには、体細胞であるセルトリ細胞の支持機能が必須である。セルトリ細胞は上皮細胞であり、互いに接着することによって密着結合を主要構造とする血液精巣関門を形成する。セルトリ細胞間の密着結合が精子形成において重要な役割を担うことはマウスをモデルとした研究によって示唆されているものの、どのようなメカニズムで精子形成を制御するのかについては未だに明らかにされていない。筆者は、セルトリ細胞間の密着結合の構成分子であるクローディン-11 を欠損させたマウスを用いて解析を行い、クローディン-11 が精細管の基底膜上に存在する分化型精祖細胞の生存・維持に必要であることを見いだした。本研究では、分化型精祖細胞の増殖を促すことが知られている幹細胞因子（Stem cell factor：SCF）に着目し、分化型精祖細胞の生存・維持がクローディン-11 によって制御される仕組みを理解することを目的とした。

【方法】本研究では、セルトリ細胞における SCF の局在を免疫組織化学的に検討した。セルトリ細胞が発現する SCF の正確な局在を明らかにするために、抗悪性腫瘍剤であるブスルファン（44 mg/kg）をマウスに投与することによって生殖細胞系列の造精細胞を除去し、精細管にセルトリ細胞のみ存在する精巣を用いて解析を行った。ブスルファン処理した精巣を固定し、作製したパラフィン切片の免疫蛍光染色を行い、セルトリ細胞における SCF の局在を調べた。同様に、ブスルファン処理したクローディン-11 欠損マウスの精巣から作製したパラフィン切片を用いて免疫蛍光染色を行い、クローディン-11 が SCF の局在を制御するかどうかを調べた。さらに、セルトリ細胞だけでなく、極性化した上皮細胞において SCF がどのように局在するかを調べるために、C 末端に HA タグを付加した膜貫通型 SCF（SCF-HA）を安定発現させた培養上皮細胞（イヌ腎臓上皮由来の MDCK Ⅱ細胞）を樹立し、免疫蛍光抗体法により SCF-HA の局在を調べた。

【結果】ブスルファン処理により造精細胞を除去した精巣切片の免疫蛍光染色を行ったところ、造精細胞非存在下でも、密着結合の構成分子（ZO1）は基底膜近傍のセルトリ細胞間の接着部位に局在していた。SCF もまた、セルトリ細胞間接着部位に集積していた。さらに、クローディン-11 を欠損したセルトリ細胞では、その SCF の集積が消失することがわかった。また、MDCKⅡ細胞に安定発現させた SCF-HA は、ラテラル膜に局在していた。以上の結果は、SCF が基底区画（セルトリ細胞間の密着結合と基底膜によって挟まれた区画）に集積し、その局在がクローディン-11 によって制御されることを示唆する。

哺乳動物における精細管内の模式図



124. 密着結合に着目した精祖細胞の分化制御機構の解明

菅原　太一

熊本大学 大学院先導機構／大学院生命科学研究部 生体微細構築学講座

Key words：精巣，セルトリ細胞，密着結合，クローディン-11，幹細胞因子

緒　言

哺乳動物の精子は、精祖細胞（マウスでは未分化型と分化型に分けられる）、精母細胞、精子細胞を経て形成され、体外に排出される。また、精子形成の場である精細管には、体細胞であるセルトリ細胞が存在する。セルトリ細胞は互いに接着して、密着結合を主要構造とする血液精巣関門を形成する［1］。密着結合は 2 つの細胞膜を密着させることで細胞間隙を塞ぎ、傍細胞経路における物質透過を制限することによって、上皮バリア形成に寄与する細胞間接着装置である［2］。セルトリ細胞間の密着結合は、自己抗原を発現する精母細胞や精子細胞を免疫系から隔絶する免疫学的バリアとして働くことによって精子形成に寄与すると考えられてきたが、その働きは未だに実証されていない。

筆者は、精子形成においてセルトリ細胞間の密着結合が形成される意義を明らかにするために、その構成分子であるクローディン-11 を欠損させたマウス［3，4］を用いて解析を行ってきた。クローディン-11 欠損マウスの精巣では、セルトリ細胞による透過バリア機能が低下していただけでなく、セルトリ細胞の上皮極性異常が観察された（未発表）。また、クローディン-11 欠損によって、分化型精祖細胞、精母細胞、精子細胞の数が減少し、精巣上体尾部に蓄積するはずの精子が完全に消失していた（未発表）。精子形成に関するこれらの表現型は、先行研究において報告されていた結果と一致している［5，6］。以上の点を踏まえ、筆者はクローディン-11 欠損による精子形成異常が、分化型精祖細胞の生存・維持機構の破綻に起因する可能性があると考えた。本研究では、分化型精祖細胞の増殖を促進する幹細胞因子（Stem cell factor：SCF）に着目し［7，8］、クローディン-11 が分化型精祖細胞を維持する仕組みの理解を目的とした。

最近の研究により、セルトリ細胞に由来する SCF が分化型精祖細胞の増殖に必須であることが示された［8］。そのため、本研究では、抗悪性腫瘍剤であるブスルファンをマウスに投与することによって、生殖細胞系列である造精細胞を除去した精巣を用い、セルトリ細胞における SCF の局在を免疫組織化学的に評価した。ブスルファンを腹腔内注射したマウスの精巣では、造精細胞が消失することを確認した。また、密着結合マーカーである ZO1 は、基底膜近傍のセルトリ細胞間接着部位に集積していたことから、ブスルファン処理したマウスのセルトリ細胞間において密着結合が維持されていることが示唆された。SCF もまた、セルトリ細胞間の接着部位に局在しており、クローディン-11 欠損によって、その集積が消失することがわかった（未発表）。さらに、極性化した上皮細胞における SCF の局在を調べるために、C 末端に HA タグを付加した膜貫通型 SCF（SCF-HA）をイヌ腎臓上皮由来の培養上皮細胞（MDCKⅡ細胞）に安定発現させたところ、SCF-HA はラテラル膜に局在することがわかった（未発表）。これらの結果は、精細管において SCF が基底区画（セルトリ細胞間の密着結合と基底膜によって挟まれた区画）に集積し、その局在がクローディン-11 によって制御されることを示唆する。本研究により、クローディン-11 が SCF の局在制御を介して分化型精祖細胞の生存・維持に寄与する可能性が示された。

方法および結果

1. ブスルファン処理による造精細胞除去の確認

10 週齢の雄マウス（C57BL/6）の腹腔内にブスルファン（44 mg/kg）を注入した。ブスルファンを注入してから 5 週間後、精巣を回収、固定、脱水、パラフィン包埋し、切片を作製した。精巣切片の免疫蛍光染色を行い、造精細胞がブスルファン処理によって除去されているかどうか調べた。溶媒である DMSO（コントロール）を注入したマウスの精巣では、TRA98（造精細胞特異的に反応するラットモノクローナル抗体）によって認識される細胞が精細管内に観察されたのに対して、ブスルファン処理したマウスの精巣では TRA98 で認識される細胞が観察されなかった（図 1）。したがって、ブスルファン処理によって造精細胞を除去し、セルトリ細胞のみで構成される精上皮を構築できることがわかった。また、ブスルファン処理した精細管において ZO1 は、セルトリ細胞間の接着部位に局在していたことから（図 1）、造精細胞非存在下でも、セルトリ細胞間の密着結合が維持されていることが示唆された。

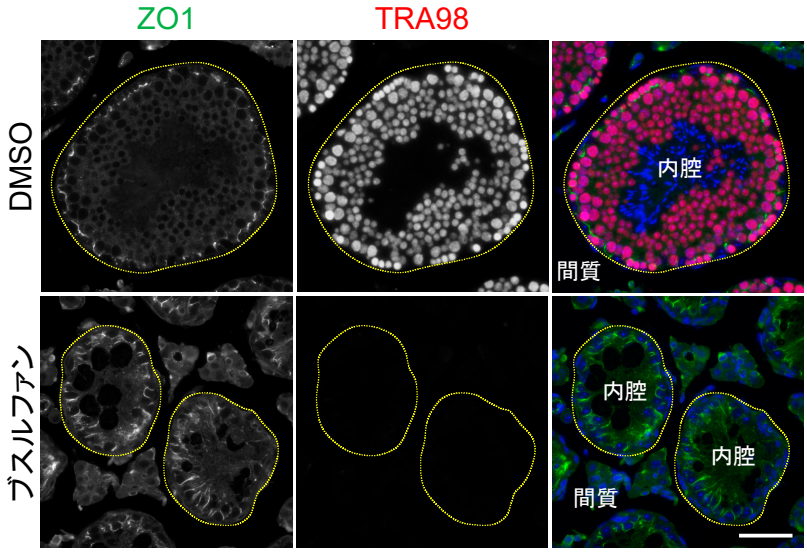


図 1. ブスルファン処理による造精細胞の除去
ZO1：密着結合マーカー、TRA98：造精細胞マーカー、
黄色点線：精細管の外周、スケールバー：50 μm。

2. ブスルファン処理したコントロールマウスとクローディン-11 欠損マウスにおける SCF の局在解析

ブスルファンで処理した精巣では、SCF が基底膜近傍でセルトリ細胞間の接着部位に局在することが免疫蛍光抗体法により明らかになった（未発表、data not shown）。また、興味深いことに、クローディン-11 を欠損したセルトリ細胞では、その細胞間接着部位に SCF は集積しなかった（未発表、data not shown）。以上により、クローディン-11 が精細管の基底区画への SCF 局在を制御する可能性が示された。

3. MDCKⅡ細胞における SCF-HA の局在解析

SCF には分泌型と膜貫通型が存在し（図 2）、とくに膜貫通型 SCF が造精機能に重要であることが示唆されている［9］。そこで、極性化した上皮細胞における膜貫通型 SCF の局在を、MDCKⅡ細胞を用いて調べた。細胞質領域に位置する膜貫通型 SCF の C 末端に HA タグを付加した SCF（SCF-HA）を哺乳動物細胞で発現させるベクターを構築し、MDCKⅡ細胞にトランスフェクションした。その後、抗生物質 G418（500 μg/ml）を用いて SCF-HA を安定発現する MDCKⅡ細胞（SCF-HA 発現細胞）を樹立した。SCF-HA 発現細胞をトランズウェルに播種・培養した後、細胞を固定し、免疫蛍光染色を行った。コンフルエントになった SCF-HA 発現細胞におい

て、抗 HA 抗体を用いて SCF-HA の局在を調べると、SCF-HA は ZO1 よりも基底側、かつラテラル膜に局在する CDH1（接着結合マーカー）の近傍に局在することがわかった（未発表、data not shown）。以上により、極性化した上皮細胞において SCF-HA はラテラル膜に局在することが示唆された。

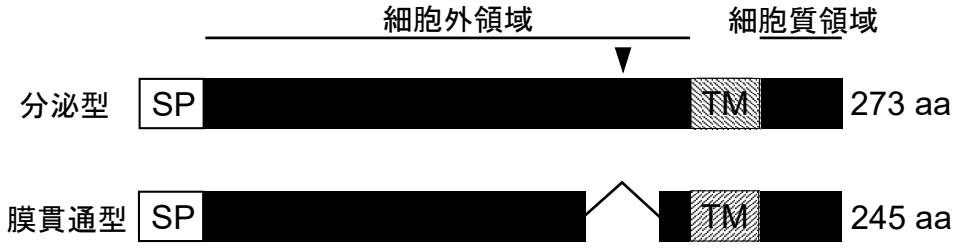


図 2. 選択的スプライシングにより生じる 2 種類のマウス SCF
SP：シグナルペプチド、TM：膜貫通領域、矢頭：タンパク質切断サイト。

考　察

本研究では、精子形成においてセルトリ細胞間の密着結合が担う役割を明らかにするために、その構成分子であるクローディン-11 を欠損させたマウスを用いて解析を行った。クローディン-11 欠損マウスの精巣では、分化型精祖細胞の数が有意に減少していたことから、その増殖制御を担う SCF に着目した。本研究では、精細管内の基底区画に SCF が集積し、その局在がクローディン-11 によって制御される可能性を示した。

極性化した上皮細胞の細胞膜は、密着結合を境としてアピカル膜とバソラテラル膜に区分され、それぞれの区画は特有の膜タンパク質や脂質により構成される。密着結合を裏打ちする ZO1/ZO2 を両方欠損した MDCKⅡ細胞では、密着結合の構造が破綻すると同時に、アピカル膜とラテラル膜に分かれて局在する膜タンパク質が細胞膜上で混在し、上皮極性異常が生じる［10］。精細管のホールマウント免疫蛍光染色を行ったところ、コントロールマウスの ZO1 はベルト状の局在を示したのに対して、クローディン-11 欠損マウスにおける ZO1 の局在は非連続的かつ断片的であった（未発表、data not shown）。この結果により、クローディン-11 を欠損したセルトリ細胞は ZO1 を発現するものの、その上皮極性が異常である可能性が示された。実際に、ブスルファン処理したマウスのセルトリ細胞における上皮極性マーカー（アピカルマーカー：EZR、バソラテラルマーカー：ATP1A1）は異常な局在を示したので（未発表、data not shown）、クローディン-11 がセルトリ細胞の上皮極性形成において重要であることが示唆された。以上により、クローディン-11 はセルトリ細胞の上皮極性形成を介して SCF 局在を制御し、分化型精祖細胞の増殖を調節している可能性が考えられた。

共同研究者・謝辞

クローディン-11 欠損マウスを譲渡してくださった自然科学研究機構生理学研究所細胞構造研究部門の古瀬幹夫教授と、本研究を支援していただいた公益財団法人上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げる。

文　献

1） Dym, M., Fawcett, D. W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biol. Reprod. 1970 Dec;3(3):308-26. PMID:4108372 DOI: 10.1093/biolreprod/3.3.308.

2） Otani, T., Furuse, M. Tight Junction Structure and Function Revisited. Trends Cell Biol. 2020 Oct;30(10):805-817. PMID: 32891490 DOI: 10.1016/j.tcb.2020.08.004.

3) Morita, K., Sasaki, H., Fujimoto, K., Furuse, M., Tsukita, S. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. J. Cell Biol. 1999 May 3;145(3):579-88. PMID: 10225958 PMCID: PMC2185072 DOI: 10.1083/jcb.145.3.579.
4) Kitajiri, S., Miyamoto, T., Mineharu, A., Sonoda, N., Furuse, K., Hata, M., Sasaki, H., Mori, Y., Kubota, T., Ito, J., Furuse, M., Tsukita, S. Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. J. Cell Sci. 2004 Oct 1;117(Pt 21):5087-96. PMID: 15456848 DOI: 10.1242/jcs.01393.
5) Gow, A., Southwood, C. M., Li, J. S., Pariali, M., Riordan, G. P., Brodie, S. E., Danias, J., Bronstein, J. M., Kachar, B., Lazzarini, R. A. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. Cell. 1999 Dec 10;99(6):649-59. PMID: 10612400 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81553-6.
6) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Matoba, S., Ogura, A., Shinohara, T. Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2020 Apr 7;117(14):7837-7844. PMID: 32229564 PMCID: PMC7149444 DOI: 10.1073/pnas.1914963117.
7) Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K., Nishimune, Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. Development. 2000 May;127(10):2125-31. PMID: 10769236 DOI: 10.1242/dev.127.10.2125.
8) Peng, Y. J., Tang, X. T., Shu, H. S., Dong, W., Shao, H., Zhou, B. O. Sertoli cells are the source of stem cell factor for spermatogenesis. Development. 2023 Mar 15;150(6):dev200706. Epub 2023 Mar 20. PMID: 36861441 PMCID: PMC10112922 DOI: 10.1242/dev.200706.
9) Flanagan, J. G., Chan, D. C., Leder, P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. Cell. 1991 Mar 8;64(5):1025-35. PMID: 1705866 DOI: 10.1016/0092-8674(91)90326-t.
10) Otani, T., Nguyen, T. P., Tokuda, S., Sugihara, K., Sugawara, T., Furuse, K., Miura, T., Ebnet, K., Furuse, M. Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. J. Cell Biol. 2019 Oct 7;218(10):3372-3396. PMID: 31467165 PMCID: PMC6781433 DOI: 10.1083/jcb.201812157.