

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

篠原 隆司

京都大学大学院医学研究科・教授

精子幹細胞のリプログラミング機構の解明と医学応用の可能性の検討

§ 1. 研究実施の概要

我々は Germline Stem (GS) 細胞が培養の環境によってはその表現型を変化させ、c-kit や SSEA-1 といった embryonic stem (ES) 細胞や始原生殖細胞のマーカーを発現するようになることを見いだした。また、GS 細胞における oncogene の導入系を立ち上げ、Yamanaka factor とは違う方法によるリプログラミングの検討も行った。その結果、H-Ras, cyclin D2+cyclin E の遺伝子導入により GS 細胞をサイトカインフリーの条件で培養することに成功し、さらに seminoma を誘導することができた。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「京都大学」グループ

- ① 研究分担グループ長: 篠原 隆司 (京都大学、教授)
- ② 研究項目
 - I. GS 細胞から mGS 細胞を生じるメカニズムの解析
 - II. mGS 細胞樹立の効率化
 - III. ES 細胞との生物学的な差の評価

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

- I. GS 細胞から mGS 細胞を生じるメカニズムの解析
 - (1) 細胞融合によるGS細胞とmGS細胞の性質の解析

昨年までに樹立した GS 細胞および mGS 細胞と体細胞との融合細胞の分化能を検討した。全身に LacZ 遺伝子を発現する ROSA26 マウスから GS 細胞を樹立し、同じく全身に GFP 遺伝子

を発現するグリーンマウスから GS、mGS 細胞を樹立した。前者にはもともと neomycin 耐性遺伝子が transgene として入っており、後者には puromycin 耐性遺伝子を導入し、安定発現株を得た。GS 細胞と体細胞との融合細胞は昨年来継続的に試みているが、mGS 細胞とのみ融合したものしか得られていないために、mGS 細胞と GS 細胞および体細胞との融合細胞の相席を行った。mGS 細胞と GS 細胞、体細胞などとの融合細胞は特に培養下では違った表現型を示すことがなく、ES 細胞の培養条件(DMEM+15%FCS+leukemia inhibitory factor)で増殖が確認できた。一方、GS 細胞の培養条件ではその増殖は限られており、分化した形態の細胞を得た。この細胞は RT-PCR およびフローサイトメトリーを用いて ES 細胞マーカーを調べてみると、これまで調べる限りのマーカーについてはすべて発現しており、基本的には mGS 細胞としての性格を優勢に持つことが示唆された。また、この細胞をヌードマウスの皮下および精巣内に移植したところ、いずれの場合においても奇形腫の形成を確認することができた。

(2) GS細胞の表現型の可塑性の解析

GS 細胞は培養精子幹細胞として、試験管内では精原細胞として増殖し、精巣内に移植すると精子形成を再開することが確認されている。しかしながら、GS 細胞の中でこの精子幹細胞活性を持つ細胞は 1-2%とかなり低いものであり、どの細胞に多能性幹細胞としての活性があるのかなどの点については分かっていない。これらの点を明らかにするために、我々は GS 細胞の表面マーカーの発現解析を行った。GS 細胞は mouse embryonic fibroblast(MEF)やラミニンでコートされたプレート上で培養できるが、これらの異なった培養条件で維持された GS 細胞を c-kit チロシンキナーゼの発現をフローサイトメトリーにより解析してみた。C-kit は通常始原生殖細胞や分化精原細胞のマーカーとして使われている。GS 細胞においては、c-kit の発現は MEF 上でもラミニン上でも観察された。さらに、ラミニン上で培養した GS 細胞では ES 細胞マーカーである SSEA-1 の発現も誘導されていることが分かった。次に我々はこの c-kit および SSEA-1 発現細胞が精子幹細胞であるかどうかを確認するために精子幹細胞移植法により不妊マウスの精巣へと細胞移植を行った。その結果、c-kit および SSEA-1 発現細胞はこれらのマーカーを発現していない細胞とほぼ同等の精子幹細胞活性があることが分かった。これらの結果は GS 細胞は培養環境により大きくその表現型が変化することを示すものである。これらの結果から精子幹細胞は表現型の可塑性があることが確認された⁴⁾。

(3) DNAメチル化酵素(DNMT酵素)の影響の解析

GS 細胞における DNA メチル化の異常の影響を調べたところ、DNMT1 が低発現になると細胞死が起こるが、DNMT3 については精子形成の異常がおこるものの GS 細胞としては特に大きな変化を認めることができなかった。DNMT3L についても強制発現細胞では ES 細胞に変化することではなく、精子形成過程で減数分裂の異常が認められた¹⁾。

II. mGS 細胞樹立の効率化

(1) 精子幹細胞の新規増殖因子の同定

GS 細胞への遺伝子導入により、Rac の dominant negative 体の導入により、その細胞増殖効率が上昇する結果を予備的に得ることができた。現在、Rac1 のノックアウトマウスからの GS 細胞の

樹立とその増殖効率の解析を行っており、別方法からの確認を行っている。

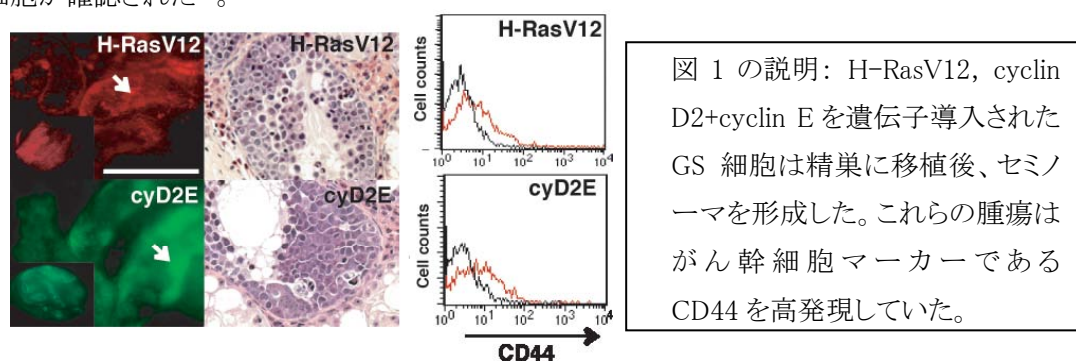
(2) 遺伝子導入によるmGS細胞の樹立

a) Yamanaka 因子の導入による mGS 細胞の誘導

これまでの結果では精巣細胞に山中 factor を導入した場合、ES 細胞と非常によく似た形態をしたコロニーが多数観察することができた。しかしながら、体細胞と同様にこれらの細胞の中で Nanog 遺伝子が発現しているものは限られていた。実際にこれらの奇形腫形成能力があるかどうかをヌードマウスの皮下移植、および精巣内への移植を行ったところ、三胚葉をもつ奇形腫を得ることができた。

b) 別因子によるリプログラミング

我々のグループは p53 ノックアウトマウスからは非常に高頻度に mGS 細胞が得られることを以前に報告した。p53 遺伝子はがん抑制遺伝子として知られていることから、本年度我々はがん遺伝子の役割に注目し、GS 細胞における Ras と cyclin 遺伝子の役割に注目した。いずれの遺伝子も生殖細胞腫瘍で強発現が報告されていることから、これらの遺伝子を GS 細胞に導入することで mGS 細胞を誘導することができるか否かの検討を行った。GS 細胞はその培養に glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF)を必要とする。しかしながら、H-Ras12(活性化型 H-Ras)もしくは cyclin D2 と cyclin E を同時に遺伝子導入された細胞は、これらの自己複製因子を添加せずとも GS 細胞として増殖し、自己複製因子の存在下では GS 細胞の増殖を亢進させることができるということが分かった。さらに、これらの細胞が奇形腫を形成するか否かを確認するために精細管内に移植を行った。移植後3ヶ月で解析を行ったところ、H-RasV12 導入 GS 細胞は精子形成を起こしたが、同時に精原細胞の異常な増殖によりセミノーマ形成が確認された。Cyclin D2 と Cyclin E を同時に導入された GS 細胞は精子形成像はなく、セミノーマの形成のみが確認された (図 1)。いずれの場合においても奇形腫の形成は認められなかった。これらの腫瘍を形成したホストマウスの精巣を別マウスの精巣に継代移植を行ったところ、同様のセミノーマ形成が見られたことから、がん幹細胞が確認された²⁾。



III. ES 細胞との生物学的な差の評価

(1) 長期培養における安定性の評価

生体内、試験管内の両方において、精子幹細胞の自己複製動態について、遺伝的な因子の影響があることが明らかになったことから⁴⁾、我々は GS 細胞の安定性を調べるために、

Genetic な因子と培養環境の影響を調べる実験を開始した。Genetic な因子の影響を調べるためには、ICR 系統, DBA/2 x ICR F1, ICR x DBA/2 F1 マウスからあらたに GS 細胞の樹立を行った。また、培養環境の因子を調べるために、ICR 系統マウスの GS 細胞の培養を MEF を用いたフィーダーがある培養と、ラミニンを用いたフィーダーフリーの培養とで、長期培養を開始した。

(2)DNAダメージ後のストレス反応の解析

昨年度生体内の精子幹細胞における放射線耐性を調べるために、EGFP を発現する Green mouse と p53 knockout マウスの交配を進めるべく、p53 knockout マウスのコロニーを確立した。これまでに移植実験を行い、現在解析を行っている。

(3)細胞の初期化能の解析

GS 細胞と mGS 細胞の融合条件を行ったところ、mGS 細胞は体細胞との融合により、Oct4 マーカーの発現を誘導することが可能であることが明らかになった。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. 2009. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol. Reprod.* 81, 155-164. DOI: 10.1095/biolreprod.108.074708
2. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Takashima, S., Mitsuo Oshimura, Toyokuni, S. and Shinohara, T. 2009. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell* 5, 76-86. DOI: 10.1016/j.stem.2009.04.020
3. Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Chuma, S., Nakatsuji, N., Takehashi, M. and Shinohara, T. 2009. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *Plos One* 4, e7909. DOI: 10.1371/journal.pone.0007909
4. Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Morimoto, H., Takashima, S., Ogura, A. and Shinohara, T. 2010. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *J. Reprod. Dev.* 56, 145-153. doi:10.1262/jrd.09-153N/JOI JST.JSTAGE/jrd/09-153N
5. Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S. and Shinohara, T. 2010. Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* in press.

DOI:10.1073/pnas.0914448107.