

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. 研究実施体制

(1) 「篠原」グループ

① 研究代表者: 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
 - (1) 細胞融合による GS 細胞と mGS 細胞の性質の解析
 - (2) エピジェネティック因子の影響の解析
 - (3) p53 knockout mouse からの奇形腫 / mGS 細胞の誘導
- 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
 - (2) 遺伝子導入による mGS 細胞の樹立
- 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
 - (2) DNA ダメージ後のストレス反応の解析
 - (3) 細胞の初期化能の解析
 - (4) リプログラミング異常のメカニズムの解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は (3-1) 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

この研究については論文投稿を行い、現在査読中である。

(2) エピジェネティック因子の影響の解析 (これまでに解析した DNA メチル化酵素の影響を含む)

昨年に ES 細胞で重要な役割を果たしているポリコム遺伝子群の機能解析のために Ezh2 の conditional knockout マウスを古関グループから導入し、その子孫から GS 細胞の樹立に成

功した。この GS 細胞を不妊マウスの精巣内に移植を行い、精子幹細胞活性、奇形腫および精子形成能について検証を行ったところ、精子形成細胞の頻度も野生型と同程度であり、奇形腫形成および精子形成能についても特に異常を認めることはできなかった。また Ezh2 の cDNA の強制発現を行ったが、特に細胞増殖については大きな影響がなく、精巣に移植後も精子幹細胞活性、奇形腫および精子形成能について異常を認めることができなかった。

別のポリコム因子である Ring1 の knockout マウスを理研古関グループより導入を行った。このマウスより GS 細胞の樹立に成功した。

(3) p53 knockout mouse からの奇形腫/mGS 細胞の誘導

p16 knockout マウス由来の精巣細胞を用いて継代移植実験を行った。野生型細胞に対して、その精子形成細胞コロニーの数および分化レベルについては、とくに大きな異常を認めることができなかった。また奇形腫の形成についてもいずれの移植ホストにおいても認められなかった。

p53 遺伝子については p63, p73 遺伝子がファミリー分子として知られており、これらの分子の機能を抑制することのできるノックダウンベクターもしくは dominant negative 変異体を用い、p53 ファミリー分子の機能を抑制した GS 細胞を作成に成功したが、これらの遺伝子操作を行っても、特に GS 細胞からの mGS 細胞の誘導を行うことができなかった。現在、生殖細胞腫瘍候補遺伝子 Dnd1, Dmrt1, Akt, Pten, beta-catenin などを導入しており、Dnd1 については ES 細胞様コロニーを確認していることから、野生型細胞でも有効か否かを検討しつつある。

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

これまでの実験から、Rac の機能抑制により GS 細胞の増殖が促進されることが示されていたことから、Rac 機能のインヒビター分子(NSC23766, EHT 1864, Rac inhibitor I)を用いて、この GS 細胞の分裂制御を遺伝子導入を用いずに行うことができるか否かの検討を行ったが、遺伝子導入による Rac 機能抑制の場合とは異なり³⁾、これらの薬剤では GS 細胞の増殖促進を誘導することができなかった。

(2) 遺伝子導入による mGS 細胞の樹立

昨年度に我々は p53 knockout mice 由来の GS 細胞は遺伝子導入により ES 細胞様に変化することを見いだしたが、野生型の GS 細胞では同様な変化が起こらないことが分かった。また、Ras, Myc, p53 dominant negative 体を CD9 により濃縮した精子幹細胞に導入すると ES 様コロニーを形成するが、分化マーカーである EPCAM 陽性細胞に導入すると同様な変化を誘導できないことから、幹細胞の方が分化型細胞より ES 様細胞に変化しやすいことが分かった^{2,4)}。Elongation factor 以外のプロモーターの検討についても実験を行った。GS 細胞においては、ユビキチン、beta-actin のプロモーターは有効であったが、CMV ウイルスプロモーターは作動しないことが確認された。また、理研 BRC 三好浩之博士よりレンチウイルスベクターの供与を受け、テトラサイクリンを用いた遺伝子発現誘導系を用いて誘導的に外来遺伝子を GS 細胞に発

現する実験系を確立することができた。

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

長期培養 GS 細胞 (ICR 系統、DBA/2 x ICR F1, ICR x DBA/2 F1) については、1 年以上に渡りフィーダーフリーの laminin 上と mouse embryonic fibroblast 上で継続して行っていたところ、ICR 由来の GS 細胞が laminin に対して接着率が低下してくるクローンが存在することが明らかになった。またラット GS 細胞の遺伝子操作の過程において染色体異常が起こることを見いだした¹⁾。しかしながら、マウス GS 細胞については未だに染色体異常や DNA メチル化については特に異常を認めるに至っていない。

また培養環境の及ぼす影響として酸化ストレスが一つの要因として重要な役割を果たしていることから、GS 細胞を加酸化水素の存在下で培養し、GS 細胞の染色体数、インプリント遺伝子の DNA メチル化について解析を行った。低レベルの過酸化水素の添加は GS 細胞の増殖促進効果があり、かつ染色体数について特に異常は認められなかったが、高濃度の過酸化水素の添加において H19 遺伝子の脱メチル化が起こることが分かった。しかしながら、いずれの場合においても、精子幹細胞移植法による精子幹細胞自己複製能の解析においては、幹細胞の頻度に影響を及ぼすことはなかった。低レベルの過酸化酸素に暴露された GS 細胞については移植後も正常な精子形成が確認されており、その精子を用いて顕微授精を行った。

(2) DNA ダメージ後のストレス反応の解析

GS 細胞と p53 knockout GS 細胞を用いて放射線照射解析をおこなったところ、GS 細胞は p53 knockout GS 細胞に比較して放射線抵抗性が低いことが明らかになった。生存率についての Dose response カーブを書いてみたところ、LD50 は、前者は 1.5 Gy、後者は 4 Gy ということが明らかになった。

(3) 細胞の初期化能の解析

この項目については研究を終了した。

(4) リプログラミング異常のメカニズムの解析

これまでの実験で、我々が胎児期の生殖細胞から樹立した embryonic GS 細胞は生殖系列の発生時におけるリプログラミングを経ても H19 遺伝子のメチル化の異常が世代を超えて持続することが明らかになった。胎児期の精巣からの細胞培養条件を改善するために、昨年度の実験で同定されている GS 細胞の増殖亢進分子である過酸化水素を培地に加えて増殖刺激を行ったところ、順調に胎児期の生殖巣から GS 細胞様の細胞を樹立することができた。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Mito Kanatsu-Shinohara, Megumi Kato-Itoh, Masahito Ikawa, Masanori Takehashi, Makoto Sanbo, Yuka Morioka, Takashi Tanaka, Hiroko Morimoto, Masumi Hirabayashi and Takashi Shinohara, “Homologous recombination in rat germline stem cells”, *Biology of Reproduction*, vol. 85, No. 1, pp.208-217, 2011
(DOI: 10.1095/biolreprod.111.090837)
2. Mito Kanatsu-Shinohara, Seiji Takashima and Takashi Shinohara, “Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis”, *PLoS One*, vol. 6, No. 8, pp.e23663, 2011
(DOI: 10.1371/journal.pone.0023663)
3. Seiji Takashima, Mito Kanatsu-Shinohara, Takashi Tanaka, Masanori Takehashi, Hiroko Morimoto and Takashi Shinohara, “Rac mediates spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier”, *Cell Stem Cell*, vol. 9, No. 5, pp.463-475, 2011
(DOI: 10.1016/j.stem.2011.08.011)
4. Hiroko Morimoto, Jiyoung Lee, Takashi Tanaka, Kei Ishii, Shinya Toyokuni, Mito Kanatsu-Shinohara and Takashi Shinohara, “In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection”, *Biology of Reproduction* (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)