

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・  
制御等の医療基盤技術」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成26年3月

研究代表者: 篠原 隆司  
(京都大学大学院医学研究科、教授)

## § 1. 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本グループでは精子幹細胞の培養株である germline stem (GS)細胞の多能性制御機構について研究を行ってきた。GS 細胞は多能性幹細胞である mGS 細胞へと変化する能力を持つものの、mGS 細胞の樹立頻度は 30 個の精巣に1個程度と極めて低く、その変化を引き起こす分子メカニズムについては明らかではなかった。この CREST 研究においては、1) 樹立頻度の改善、2) 多能性細胞への変化の分子メカニズムの解明、3) GS/mGS 細胞と ES 細胞の違いの解明の3つのテーマに取り組んできた。この中で最も重要であったのは、多能性幹細胞への変化の促進を促す分子の同定であった。樹立頻度の改善のために、GS 細胞へ山中因子を導入しても多能性細胞への変化を見るに至らなかったこと、また出現する多能性コロニーの全てが Nanog 陽性であることを鑑み、GS 細胞から mGS 細胞への変化は体細胞からのリプログラミングとは異なる分子機構が働いている可能性が高いと予想していた。本研究の過程で、mGS 細胞においては ES 細胞と異なり、H19を含むインプリンティング遺伝子の脱メチル化がほとんどのケースで起こることから、エピジェネティックな異常がその誘因になりうるのではないかと疑いをもつに至った。実際に H19 の脱メチル化は奇形腫を含む、多くの生殖細胞由来の腫瘍で起こるものであり、体細胞においては Dnmt1 の抑制はがんを誘導することが証明されている。したがって、生殖細胞における DNAメチル化異常は発がんの誘因になる可能性があった。そこで私は GS 細胞の多能性制御においては、ちょうど奇形腫形成と同じような刺激が起こっており、mGS 細胞の形成には DNA メチル化が関与するのではないかと仮説を立て研究を進めた。

この仮説を試すために、研究期間の前半部分は GS 細胞の増殖促進分子と epigenetic modifier の強制発現/ノックダウン(KD) のスクリーニングに力点をおいて実験を行った。しかしながら、この実験で問題となったのは、GS 細胞への遺伝子導入効率の低さであった。GS 細胞は倍加時間が 2.5 日であり、外来遺伝子の発現レベルも体細胞に比較すると顕著に抑制される。このため、体細胞株で行われているような大規模なスクリーニングを簡単に行うことができず、レンチウイルスを作成し、100 倍程度の濃縮をかけて GS 細胞へと遺伝子導入し、1ヶ月の観察期間で結果を判定するという方法で合計 120 の遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、DNA のメチル化維持酵素である Dnmt1 の KD と共に p53 の KD による細胞死の抑制を行うことで、mGS 細胞への変化を誘導することに成功するに至った。細胞分裂の遅い GS 細胞では、Dnmt1 の KD では脱メチル化のスピードが遅く、これが原因で先行研究において Dnmt1, 3a/b 遺伝子の機能解析した時には多能性細胞の樹立に至らなかったと考えられる。

そこで、次のステップとして、下流遺伝子の解析に取り組んだ。この実験では p53 ノックアウト (KO) マウス由来の GS 細胞を用いて、これまで記載されている合計20個の生殖細胞腫瘍形成の原因候補遺伝子の過剰発現と KD を行うことで機能的にスクリーニングを行った。その結果、Dnd1 と Dmrt1 が多能性誘導に関与することを見いだした。残念ながら、野生型 GS 細胞を用いた際には Dnd1 KD では mGS 細胞は誘導できなかったが、Dmrt1 遺伝子の KD では Dnmt1 KO よりも早く、かつ効率良く mGS 細胞を誘導することができた。実際に Dnmt1 KD により、Dmrt1 の発現低下が起こるのみならず、Dmrt1 の強制発現により mGS 細胞の樹立は抑制されたので、Dnmt1 によるメチル化異常により Dmrt1 の発現が抑制されることでリプログラミングが起こると予想された。

Dmrt1 遺伝子は性決定に関わる分子として知られるが、生後の精原細胞では減数分裂誘導に関与する分子として知られる。我々の結果はこれと矛盾するものであったが、Dmrt1 の下流分子を検索した結果、Sox2 が同定された。Sox2 は GS 細胞で mRNA は発現しているものの、タンパク質へ翻訳されていない分子である。そこで遺伝子抑制を克服するために高力価の Sox2 の強制発現と p53 の KD を行ったところ、Oct4 の発現誘導が起こるのみならず、mGS 細胞が誘導された。これらのことから、Dmrt1 の発現抑制で Sox2 が過剰発現することが GS 細胞の多能性獲得の基本メカニズムであるとの結論を得た。

## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. GS 細胞からの多能性誘導メカニズムの解明

概要: 今後この実験系を用いることで、生殖細胞のリプログラミングのメカニズムが詳細に明らかになる。GS 細胞と ES 細胞の遺伝子発現は酷似しているが、GS 細胞がどうやって多能性を抑制して幹細胞としての安定性を獲得・保持しているのかを解析することが可能となる。

本研究を進展させることで、ES/iPS 細胞から直接 GS 細胞を得られるようになると期待される。また、体細胞からの GS 細胞の作成に関する研究も促進される。

#### 2. 生殖細胞がんの試験管内誘導系

概要: 従来、生殖細胞の発がんメカニズムを調べる実験系は生体モデルしかなかったために、その研究が遅れていた。現在、生殖細胞の発がんに関する遺伝子はヒトのゲノムワイド解析から次々と候補が同定されているが、まだその機能を調べる適当な方法が見つかっていない。

本研究をヒトへと進展させることで、生殖細胞の発がんに関わる新規遺伝子の同定やそのメカニズムの解明を行うことが容易になる。

#### 3. 精子幹細胞の増殖制御における活性酸素の役割の解明

概要: 活性酸素は生殖細胞の機能に悪影響を与え幹細胞の老化に関与するとされていた。しかしながら、この成果により活性酸素の産生促進が精子幹細胞の自己複製には必要であることが明らかになった。

活性酸素がどのようにして作用するのかを明らかにすることで、精子幹細胞の自己複製機構の解明に繋がる。またヒト不妊症治療においては活性酸素を抑制することが通常であったが、活性酸素の精子形成における役割を再評価する必要がある。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. GS 細胞のフィーダーフリー、無血清培養系の確立

概要: 従来の GS 細胞の培養では血清の添加が必須であった。このため血清内の未知の成分の混入により、外来因子の増殖分化への影響を解析することを妨げていた。この研究により、GS 細胞の培養を単純化された実験系で行うことが可能になったため、GS 細胞の培養系が改善されその増殖も亢進するようになった。また、無血清培養系の確立は生殖毒性の検査や不妊治療に応用される可能性がある。

#### 2. セルトリ細胞の培養系の確立

概要: セルトリ細胞は精子形成を支える細胞として知られるが、生殖細胞との共培養により幹細胞を維持された例はなく、あまり解析が進んでいない細胞である。GS 細胞の無血清培地を改良することにより、セルトリ細胞の長期培養が可能となり、精子幹細胞の新たな機能的アッセイを行えるようになった。この実験系を用いて、生殖細胞の増殖分化に関わる新規分子の同定や GS 細胞からの in vitro spermatogenesis 系の確立に貢献しうる。

## § 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

### ① 「篠原」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
篠原 隆司	京都大学大学院医学研究科	教授	H20. 6～
高島 誠司	同上	助教	H20. 6～
藤井 渉	同上	D1	H20. 6～H21. 3
箕口 滋	同上	CREST 研究員	H20. 8～H20. 11
森本 裕子	同上	CREST 研究員	H20. 6～
緒方 佑夏	同上	教務補佐員	H20. 6～H23. 3 H25. 4～ H25. 7
石井 慧	同上	B5	H21. 4～
田中 敬	同上	助教	H22. 4～
立石 幸代	同上	CREST 研究員	H22. 4～H23. 3
李 知英	同上	助教	H20. 6～H21. 1
奥田 英伸	同上	学術振興会特別研究員	H25. 4～H25. 6
森 圭史	同上	D1	H25. 4～
小柴 孝太	同上	オフィスアシスタント	H24. 8～
西田 和樹	同上	オフィスアシスタント	H23. 10～H24. 3
西尾 太樹	同上	オフィスアシスタント	H23. 8～H24. 7

研究項目

- ・ GS 細胞から mGS 細胞を生じるメカニズムの解析
- ・ mGS細胞樹立の効率化
- ・ ES細胞との生物学的な差の評価

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

論文発表を行った研究としては、押村グループと染色体解析についての共同研究により 2 報の論文発表を行った。西田グループとはマイクロアレイ解析について共同研究を行い、1 報の論文発表を行った。

現在進行中の研究としては、古関グループからは Ring1, Ezh2 の KO マウスの供与を受け、その解析を行っている。岩間グループからは non-canonical ポリコム遺伝子についての共同研究を行っている。米田グループとは Oct1 の制御についての共同研究を開始した。佐谷グループからは CD44 variant に対する抗体や aurora, myc 遺伝子の供与を受けた。吉田グループとは小分子化合物によるスクリーニングの共同研究を行っている。佐々木アドバイザーからは Dnmt KO マウスの譲渡やエピゲノム解析について共同研究を行っている。国外では JST の国際共同研究支援をうけ、Dr. John McCarrey との共同研究を行っている。

### § 3. 研究実施内容及び成果

#### I. GS 細胞から mGS 細胞を生じるメカニズムの解析(京都大学 篠原グループ)

##### (1) 細胞融合による GS 細胞と mGS 細胞の性質の解析

GS 細胞は精巣内へ移植すると精子形成能を持つ細胞であるが、胚盤胞内へマイクロインジェクションしてもキメラを形成することができない。一方、mGS 細胞、ES 細胞は精巣内に移植しても精子を作ることができないが、これらの多能性幹細胞は胚盤胞にマイクロインジェクションして初めて精子へと分化できる。このように精子形成能とキメラ形成能はお互いに排他的な性質であり、いずれの形質が優勢であるかを調べるために、細胞融合実験を行った。

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。これらの細胞を用いて細胞の融合条件を検索したところ、mGS 細胞については GS 細胞、胸腺細胞などの融合細胞を得ることができた(図1)。一方、GS 細胞については mGS 細胞との融合細胞を得ることができたものの、胸腺細胞との融合細胞を得ることはできなかった。胸腺細胞に加えて、胎児脳由来の neurosphere、骨髄細胞、mouse embryonic fibroblast (MEF) などを体細胞の融合相手として選んだが、いずれも electrofusion やポリエチレングリコールによる融合直後に融合細胞は見られたものの、neomycin と puromycin の2重の薬剤選択後にコロニーを得ることができなかった。

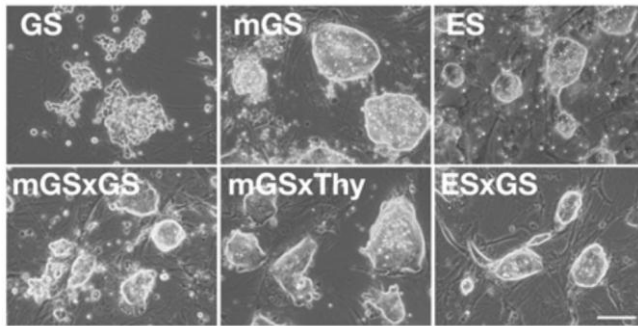


図1: mGS 細胞と細胞融合した場合には ES 細胞と同様に多能性幹細胞型の ES 細胞に酷似したコロニーを形成した。これは相手が GS 細胞であったも同様であった。

こうして得られた融合細胞の性質を調べるために、まずはこれらの融合細胞の表現型を検討した。mGS 細胞と GS 細胞、mGS 細胞と体細胞の融合細胞は ES 細胞と同じ表現型を示した。両者は特に培養下では違った表現型を示すことがなく、通常の ES 細胞の培養条件 (DMEM/15% fetal calf serum +

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未分化性を維持することは難しく、増殖能力は限られており、最終的には分化した形態の

細胞を得た。ES 細胞の培養条件で維持されている融合細胞を用いて RT-PCR およびフローサイトメトリーにより ES 細胞マーカーの発現を調べてみると、Nanog や SSEA1 などの ES 細胞で発現されている典型的なマーカーの発現を確認することができた。このように融合細胞は基本的には mGS 細胞としての性格を優勢に持つことが明らかとなった。

次に、GS および mGS 細胞との融合細胞におけるゲノムインプリンティングの状態を解析した。GS 細胞では精子型のメチル化パターンを示すために、H19, Meg3 IG の differentially methylated region (DMR) では高メチル化を示す一方で、Igf2r, Peg10 DMR では低メチル化を示す。この H19, Meg3 IG, Igf2r, Peg10 の4つの部位の DMR について Combined bisulfite restriction analysis (COBRA)法により解析したところ、GS 細胞で見られた精子型のメチル化パターンは、融合した細胞に影響されており、融合細胞は精子型のメチル化パターンを示さないことが分かった。一方 mGS 細胞と体細胞との融合細胞では体細胞のメチル化が概ね維持されていた。従来の研究で胎生期 12.5 日目の始原生殖細胞から樹立される多能性幹細胞である embryonic germ (EG)細胞は融合相手方の核を脱メチル化する能力があることが知られる。しかしながら、この結果から、mGS 細胞には EG 細胞で見られたような脱メチル化能を持たないことが分かった。

GS, mGS 細胞は ES 細胞と同様に Oct4 を発現することが知られている。そこで、融合細胞の Oct4 遺伝子の発現と enhancer のメチル化パターンを調べた。Oct4 の発現は ES 細胞に比べると GS 細胞では弱い、これは GS 細胞における Oct4 の発現が proximal enhancer に依存しており、distal enhancer がメチル化されているためだと考えられている。これに対し、ES 細胞や mGS 細胞などの多能性幹細胞では両方の enhancer が脱メチル化されているために Oct4 の発現レベルが高い。GS 細胞や胸腺細胞を mGS 細胞や ES 細胞と融合したときには、Oct4 の distal enhancer と proximal enhancer の脱メチル化がおこり、両タイプの細胞で Oct4 の発現が上昇することが分かった。

更に X 染色体について活性化レベルを検討した。一般に ES 細胞などの多能性幹細胞は X 染色体が活性化されており、細胞融合により体細胞核の不活性化された X 染色体を活性化することができる。mGS 細胞との融合細胞について同様の解析を行ったところ、ES 細胞の様に融合相手の体細胞や GS 細胞の X 染色体を活性化することが分かった。

最後に、これらの細胞の分化能力を調べるために、ヌードマウスの皮下および精巣内に細胞移植を行った。いずれの融合細胞を移植した場合においても奇形腫の形成を確認することができた。これらの結果は mGS 細胞は多能性幹細胞として ES 細胞と同等の体細胞核のリプログラミング能を持つものの、EG 細胞で観察されるような相手核を脱メチル化する能力を持たないことを示唆している (Biol. Reprod. 2012)。

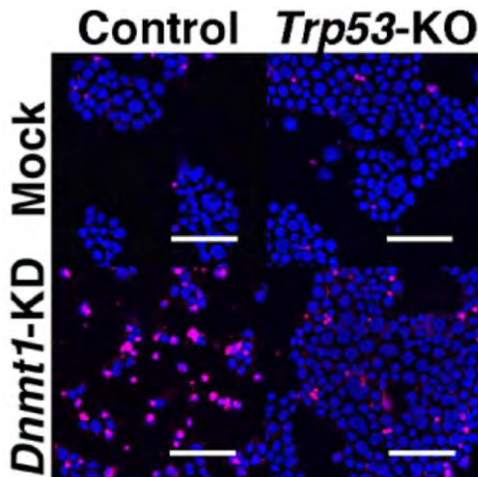


図 2: Dnmt1 を KD した GS 細胞は顕著に細胞死を起こした。Dnmt1 KD による細胞死は p53 欠損 GS 細胞では見られなかった。

## (2) エピジェネティック因子の影響の解析

理研古関グループより Ring1, Ezh2 KO マウス、佐々木アドバイザーからは Dnmt1, Dnmt3a/b の KO マウス、Jax からは Dicer KO マウスを導入し、これらの遺伝子の欠損が GS 細胞のリプログラミングに関与するか否かを検討した。

### a) Dnmt1, Dnmt3a/b

RT-PCR により GS 細胞と mGS 細胞で発現している Dnmt 遺伝子の発現を確認した。GS 細胞には Dnmt1 が高レベルで発現しているのに加え、Dnmt3a1, 3a2, 3b2, 3b3 が発現されている。しかしながら Dnmt3L は発現されていない。一方で mGS 細胞は ES 細胞と同様に Dnmt1, Dnmt3a1, 3a2, 3b1, 3b6, Dnmt3L が発現している。つまり、GS 細胞では ES 細胞よりも Dnmt1 の発現が高く、Dnmt3L の発現が認められないという違いがある。

そこで Dnmt1, 3 の conditional KO マウスを導入し、GS 細胞の樹立を行った。樹立された GS 細胞は cre を発現するアデノウイルスにより KO 細胞を作成した。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った (図 2)。これは p53 依存性の細胞死であることが p53 KO マウス由来の GS 細胞を使った解析で明らかになった。一方で、Dnmt3 KO マウスから樹立された GS 細胞は正常に増殖し、特に表現型についての異常は見当たらなかった。しかしながら、bisulfite sequencing により解析したところ、Dnmt3a/b を欠損した GS 細胞は反復配列である SineB の DNA メチル化レベルが低下していることが分かった。

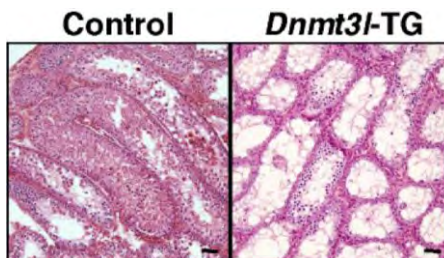


図 3: Dnmt3L を導入された GS 細胞は試験管内では一見正常に増殖したが、精巣内に移植すると精子形成不全を起こした。



この細胞を不妊マウスの精巣に移植したところ、完全な分化は認められなかった。RT-PCR と免疫染色を用いた解析では、移植細胞は精母細胞の段階で細胞死をおこしており、円形精細胞のステージに至る途中で分化が停止してしまうことが明らかとなった。(Biol. Reprod. 2009)。

#### b) Dnmt3L

Dnmt3L は ES 細胞で高発現している。mGS 細胞を得るためにこの遺伝子を GS 細胞に強制発現したところ、増殖速度や細胞の分化マーカーの発現については野生型の細胞と同等であり、多能性細胞を得ることはできなかった。しかしながら、bisulfite sequencing を用いてこの細胞のメチル化解析を行うと、major と minor satellite sequence の DNA メチル化の亢進が起こることが分かった。Dnmt3L を強制発現する GS 細胞は精巣に移植しても精子形成を完成することがなく、半数体の細胞を見いだすことはできなかった。(Biol. Reprod. 2009)。

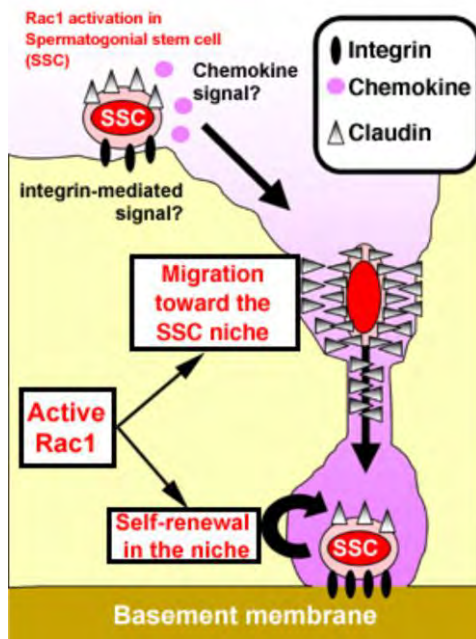


図 4: Rac の抑制は GS 細胞の増殖を促進するが、自己複製能が低下している。移植時のコロニー数の低下は Rac の抑制により claudin3, 7, 8 の発現低下を起こした精子幹細胞が血液精巣関門を通過しにくくなるためであると考えている。

することを見いだした。5 日間の培養で、野生型の細胞が 4-5 倍に増殖するのに対し、Rac の dominant negative mutant を導入した場合は約 10 倍程度に増殖することが明らかになった。

次に遺伝子導入の結果を確認するために、Rac1 の conditional KO マウスから GS 細胞の樹立を試みたが、Cre 遺伝子を導入して Rac1 を KO した細胞は野生型細胞と外見上大きな変化は認められなかった。しかしながら、幹細胞の数および自己複製能について精子幹細胞移植法により確認を行ったところ、Rac1 KO 細胞および dominant negative mutant 導入細胞においては精子幹細胞の頻度が有意に低下していることが分かった。これらの結果から Rac の機能低下により、自己複製分裂の頻度が低下し、それに伴い分化型の精原細胞が増加することが示唆された。

しかしながら、Rac 機能のインヒビター分子(NSC23766, EHT 1864, Rac inhibitorI)を用いて Rac

#### c) Dicer

Dicer conditional KO マウスを導入し、GS 細胞の樹立を行った。樹立された GS 細胞に cre を発現するアデノウイルスを感染させることより KO 細胞を作成した。Dicer を欠損する GS 細胞は、野生型細胞よりも増殖が遅くなることが分かったことから、Dicer が生じる microRNA が GS 細胞の増殖を促進している可能性がある。しかしながら、この細胞からも mGS 細胞を樹立することはできなかった。

## 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

a) 小分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング  
Selleck chemical (476 個)、calbiochem (65 個)もしくは Prestwick 社(1120 個)由来のケミカルライブラリーを用いてスクリーニングを行った。しかしながら、いずれのライブラリーによっても mGS 細胞を得ることができなかった。さらに約 200 分子の増殖因子について GS 細胞に対する増殖刺激活性を試したが、顕著な増殖刺激効果がある分子を同定するには至らなかった。

#### b) Rac の抑制による増殖効率の促進

これまでの研究で beta1-integrin を KO された GS 細胞ではやや増殖レベルが低下することに着目し、この下流分子について KD および dominant negative 体を用いて増殖能力についてのスクリーニングを行った。その結果、Rac の抑制が GS 細胞の増殖を促進

遺伝子の活性化を抑制を試みたが、遺伝子破壊による Rac 機能抑制の場合とは異なり、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。

この幹細胞活性の低下の理由を調べたところ、Rac を欠損する細胞では claudin3, 7, 8 タンパク質の発現低下が起こっていることが明らかになった。恐らくこれらの claudin の発現低下により移植時に blood-testis barrier を通過するのが困難になっていることが移植効率の低下の原因であろうと考えている(図 4)(Cell Stem Cell 2011)。

### c) 過酸化水素による増殖促進

小分子化合物ライブラリーでは増殖に効果がある化合物を同定することはできなかったが、市販の薬剤を購入してスクリーニングを行っていたところ、活性酸素の産生の抑制剤である apocynin もしくは lipoic acid が GS 細胞の増殖を抑制することを見いだした。そこで、細胞内で活性酸素を直接高めるために過酸化水素を GS 細胞の培地に添加すると高濃度では細胞死を誘導し、細胞の増殖については大きな影響を認めることができなかった。しかしながら、10-50 マイクロモルの生理的状态に近い濃度では、当初はほとんどその増殖能力には影響が見られなかったものの、添加後2-3週間を過ぎたころから増殖を促進することが分かった。また、このようにして過酸化水素の存在下で培養された GS 細胞を不妊マウスへ移植すると正常な子孫を得ることができた。これらの結果は活性酸素が GS 細胞の増殖に関与することを示唆する。

活性酸素の産生に関わる分子として Nox 遺伝子が知られている。Nox 分子の抑制剤である diphenylene iodonium (DPI) を添加しても、GS 細胞の増殖抑制が観察されたことから、Nox を介した活性酸素の産生が GS 細胞の増殖に必要であることが示唆された。この Nox 分子は

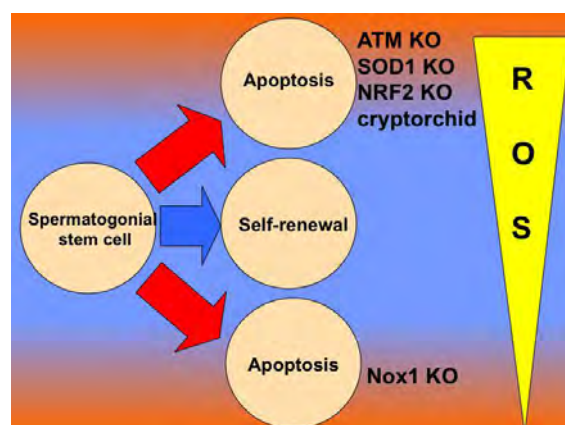


図 5: 活性酸素の量は精子幹細胞の運命決定に重要な役割を果たす。活性酸素の量が過剰になる変異マウスでは精子幹細胞は細胞死を起こす一方で、Nox1 が欠損したマウスでは幹細胞の自己複製能が低下している。

サイトカインの添加により活性酸素を発生する分子であることから、GS 細胞にその自己複製因子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) と fibroblast growth factor2 (FGF2)を添加すると、活性化酸素のレベルが顕著に上昇し、増殖に活性化酸素が関与する可能性が示唆された。そこで、RT-PCR で Nox1-4 の遺伝子のうちのいずれかが GS 細胞に発現を調べると、Nox1 と Nox4 遺伝子の発現が強発現していることが分かった。

Nox4 遺伝子は多くの組織で恒常的に発現しており、FGF2 や GDNF の添加により発現変化を起こさなかった。更に Nox4 の KD を行っても GS 細胞の増殖に影響を与えることがなかった。一方で、Nox1 遺伝子の発現は FGF2 もしくは GDNF のいずれでも誘導され、Nox1 遺伝子の KD により GS 細胞の増殖を

顕著に抑制できたことから、Nox1 が GS 細胞で自己複製に関与している可能性が示唆された。

最後に、この可能性を KO マウスを用いて検証した。Nox1 KO マウスは完全な精子形成が認められたものの、精巣の重量は野生型よりも縮小しており、その精原細胞の増殖は顕著に抑制されていることが分かった。特に最も未分化な細胞マーカーである GFRA1 (自己複製因子である GDNF の受容体コンポーネント)の発現はこのマウスで有意に低下していた。そこでこのマウスの精巣細胞をドナーとして継代移植実験を行うと、Nox1 KO マウスに存在する精子幹細胞の総数は野生型マウスと同等であるが、この細胞の生体内での自己複製分裂が野生型マウスに比較すると顕著に抑制されていることが分かった。これらの結果は、Nox1 を介した活性酸素の産生が精子幹細胞の自己複製に必要であることを示す。

従来、活性酸素は精子幹細胞の増殖に悪影響を与えられていたが、この成果は従来



の考えとは反するものである。一定レベルの活性酸素の産生が精子幹細胞の自己複製に必要であることから、不妊症治療における活性酸素の役割を見直す必要を提起した(図 5)(Cell Stem Cell 2013)。

d) p53 KO マウス由来 MEF の役割の解析

p53 KO マウスを用いて GS 細胞から mGS 細胞に変化する時期を調べた。培養開始直後には mGS 細胞の出現は見られなかったものの、MEF 上へ細胞を移動した際に mGS 細胞が出現するケースが多いことが分かった。このことから、p53 KO マウス由来の精巣の体細胞が GS 細胞から mGS 細胞への変化を抑制している可能性が示唆された。しかしながら、p53 KO マウス由来の MEF を用いた場合でも野生型 GS 細胞を mGS 細胞に効率よく変化させることもなく、その増殖についても特に刺激する効果については野生型の MEF の場合と特に大きな違いを認めることができなかった。

e) 胎生期の生殖細胞由来の mGS 細胞の樹立

mGS 細胞は生後の精巣細胞から樹立されるが、我々は胎児期の生殖細胞であればより効率良く mGS 細胞を樹立できるのではないかと考え、胎生 12.5-18.5 日の生殖細胞を用いて mGS 細胞の樹立を試みた。胎生期の生殖細胞をトリプシンで回収し、GS 細胞の培養条件 (EGF + bFGF + GDNF + LIF) で細胞培養を行った。その結果、GS 細胞と似た細胞を樹立するとともに (我々はこの細胞を embryonic germline stem cell, eGS 細胞と名付けた)、胎生 12.5 と 14.5 日の精巣より mGS 細胞を得ることができた(図 6)。従来胎生 13.5 日以降の生殖細胞は EG 細胞に変化することがないとされていたが、これらの結果はより発生が進んだステージの生殖細胞にも mGS 細胞に変化する能力があることを示す。また、EG 細胞の培養条件 (SCF + LIF + bFGF) とは異なる培養条件であったことから、EG 細胞の樹立とは違ったメカニズムで mGS 細胞が得られたことが示唆された。しかしながら、その頻度は 1/20 回の低頻度であり、とくに胎児期の細胞がより高頻度に mGS 細胞として樹立できるわけではなかった。



図 6: 左より生後の精巣より樹立された GS 細胞、胎生期 12.5 日齢マウス由来 eGS 細胞、胎生期 14.5 日マウス由来 ES 様細胞

この胎児期の生殖細胞から樹立された eGS 細胞は GS 細胞と同じく精子型の DNA メチル化パターンを示すことから、試験管内で成熟し、インプリント遺伝子の DNA メチル化パターンを獲得していた。そこで、この細胞の精子形成能を調べるために、不妊マウスの精巣内に移植すると、正常な精子形成が確認された。そこで、この個体由来の精子細胞を由来として顕微授精により子孫を作成したところ、体のサイズの異なる個体が頻繁に見つかった。この胎児期の増殖の異常を示す結果はインプリント遺伝子の発現異常を示唆したため、生まれた個体の H19, Snrpn 遺伝子の DMR においてメチル化の異常を観察すると、H19 と Snrpn DMR の DNA メチル化異常が一部の個体に認められた。Snrpn の異常は最初の世代のみに認められたが、H19 の異常な DNA メチル化は最大 16 代までの子孫にも伝達されることがわかった(図 7)。更に異常が観察された個体から GS 細胞を樹立し、Chromatin immunoprecipitation アッセイで解析すると、H19 の DMR における H3K27me1 と H3K9me3 のメチル化レベルの低下が観察された。初めに樹立された eGS 細胞においてはインプリント遺伝子の DNA メチル化は正常に獲得されていたことを鑑みると、eGS 細胞から世代を経て子孫に遺伝情報が伝達される過程で、インプリント遺伝子の DNA メチル化をリセットする機構が破綻していると考えられる。ヒストン修飾の異常がこの現象においてどのような役割を果たしているのかについては未だに不明であるが、野生型の GS 細胞に

において H3K27me1 もしくは H3K9me3 に影響するエピゲノム修飾因子を KD しても H19 の DNA メチル化に大きな影響を認めることはなかった。従来の生殖系列幹細胞由来の子孫ではエピジェネティックな異常は次世代では消失することが知られていたが、この eGS 細胞は、その形質が持続する点で異なる (Biol. Reprod. 2009)。

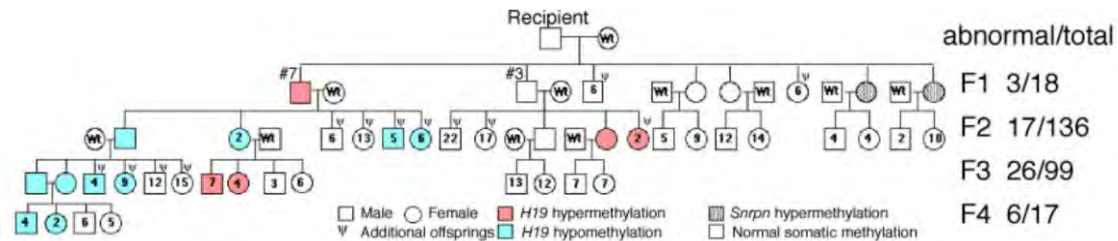


図 7: eGS 細胞より生まれたマウスでは H19 遺伝子の DNA メチル化異常が子孫へと伝達する。DNA メチル化レベルは雄からも雌からも伝達するのみならず、そのレベルも変動していく特徴がある。この異常は現在 16 代目まで継続している。

## (2) 遺伝子導入による mGS 細胞の樹立

### a) 薬剤スクリーニング

薬剤の影響については、これまで iPS 細胞の生成を刺激する分子や核移植効率を促進することが知られている 5-azacytidine, trichostatin A, RG108, scriptaid, valproic acidなどを異なる濃度で GS 細胞の培養に加えて検証を行った。しかしながら、いずれの因子についても特に変化を認めることができなかった。これに加えて Selleck chemical (476 個), calbiochem (65 個) もしくは Prestwick 社 (1120 個) 由来のケミカルライブラリーを用いてスクリーニングを行ったが、いずれのライブラリーによっても mGS 細胞を得ることができなかった。

### b) CDK インヒビターの影響

#### i) p16, p18, p19, p21, p27 KO マウスの継代移植による増殖刺激

精子幹細胞の増殖刺激が奇形腫および mGS 細胞への変化を促すか否かを検討するために、p16, p18, p19, p21, p27, p53 KO マウスの精巣細胞の継代移植を行った。p27 KO マウスの場合は自己複製分裂の低下が見られたが、p16, p18, p19, p21, p53 KO マウスについては野生型の細胞と同等の分裂速度を示し、通常の精子形成コロニーを形成するのみであった。しかしながら、p21 と野生型細胞を同時に不妊マウスに移植して競合させた場合には、野生型細胞に比して、p21 KO マウス由来細胞が選択的により多くの子孫を作成した。したがって、p21 の欠損は精子形成細胞のいずれかのステージにおいて野生型細胞よりも増殖分化能力が勝っていることが予想される (PNAS 2010)。

移植されたホストマウスの組織学的な解析を行ったところ、CDK インヒビターが欠損するいずれのドナーマウスを移植に用いた場合にも奇形腫の発生を認めることができなかった。これらの結果は単純に精子幹細胞の増殖スピードの上昇のみでは mGS 細胞の誘導を起こすことができないという可能性を示唆する。

#### ii) p53 ファミリー分子の抑制

p53 遺伝子は p63, p73 遺伝子と共にファミリー分子として知られており、これらの分子が p53 KO マウスで p53 の機能を代償するために p53 遺伝子の欠損のみでは mGS 細胞が誘導できない可能性がある。そこで、p53 ファミリー全体の機能を抑制することのできる KD ベクターもしくは dominant negative 変異体(delta p73)を用い、p53 ファミリー分子の機能を抑制した。しかしながら、これらの遺伝子操作を行っても、GS 細胞の増殖能に影響は見られなかったのみならず、mGS 細胞の誘導を行うことができなかった。

### c) 試験管内における自己複製の過剰刺激

#### i) Ras と cyclin

これまでの研究から GDNF と FGF2 が精子幹細胞の自己複製に関与していることが知られていた。そこで、これらのサイトカインにより活性化される Ras と、Ras の活性化により誘導される cyclin 遺伝子の役割に注目した。実は、いずれの遺伝子も生殖細胞腫瘍で高発現が報告されており、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 細胞に H-RasV12 (活性化型 H-Ras) もしくは cyclin D2 と cyclin E1 を同時に遺伝子導入された細胞は、一見正常に見えるが、その増殖速度は野生型の GS 細胞よりも早いのみならず、FGF2 や GDNF などの自己複製因子を添加せずとも長期間にわたり増殖できるということが分かった。Cyclin D2 もしくは cyclin E1 のみを単独で導入した場合には増殖を誘導できなかったことから、この二つの異なる種類の cyclin が協調することが自己複製の誘導に関与することを示唆する。

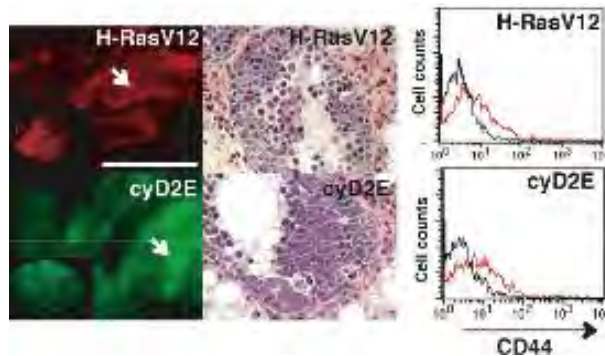


図 8: H-RasV12, cyclin D2+cyclin E を遺伝子導入された GS 細胞は精巣に移植後、セミノーマを形成した。これらの腫瘍はがん幹細胞マーカーである CD44 を高発現していた。

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 E1 を同時に導入された GS 細胞は精子細胞へと分化する能力はなく、精原細胞のみが精細管に蓄積し、セミノーマの形成が全例で確認された (図 8)。悪性像を示していた RasV12 導入細胞とは異なり、cyclin 導入 GS 細胞は間質への腫瘍細胞の浸潤は認められなかった。いずれの細胞を用いた場合においても組織学的解析では奇形腫の形成は認められなかった。

これらの腫瘍ががん幹細胞に依存するか否かを検討するために、別マウスの精巣に継代移植を行うと、RasV12 導入細胞、cyclin 導入細胞のいずれもが二次ホストに生着し、一次ホストと同じ組織像を示すセミノーマ形成が観察された。また、これらの腫瘍にはがん幹細胞のマーカーである CD44 の発現も認められた。これらの結果は、いずれの腫瘍においてもがん幹細胞が存在することを示唆する (Cell Stem Cell 2009)。

#### ii) Bcl6b による自己複製の過剰刺激

Bcl6b は GDNF により GS 細胞に誘導される遺伝子として Brinster らのグループにより報告されていた。通常 GS 細胞は GDNF と FGF2 の共存することで自己複製分裂を行うが、Bcl6b の自己複製に対する影響を調べるために GS 細胞に遺伝子導入したところ、Bcl6b の強制発現細胞は FGF2 がなくとも長期に渡り培養することができることが明らかになった。Bcl6b の発現は FGF2 でも GDNF でも誘導できるが、そのレベルは FGF2 による方が強い。また、Bcl6b の発現は MEK インヒビターにより抑制されたことから MEK の下流にあることが示唆された。その後の解析で、活性化された MEK は Etv5 の発現誘導を起こし、Bcl6b の発現は Etv5 の発現上昇に依存することが分かった。MEK は Ras の下流分子であることから、活性化 Ras による GS 細胞の増殖には Bcl6b が関与していることが分かった。

Bcl6b を導入された細胞は、Ras や cyclin D2/E1 を導入された細胞と同様に試験管内ではその表現型に異常は見られなかったが、生体内に移植すると生殖細胞腫瘍を形成した。この場合の腫瘍のサイズは Ras の場合よりもより大きく、Bcl6b 遺伝子の強い細胞増殖能を示唆した。免疫染色を行うと、この腫瘍の性状はアルカリフォスファターゼを発現する Ras の場合とは異なっており、MAGEA4 を発現するセミノーマに限定されていることが明らかになった (図 9) (Development



2012)。

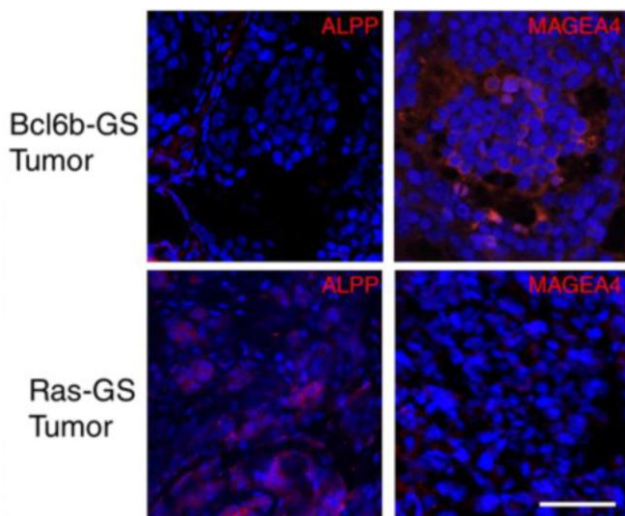


図 9: Bcl6b を導入された GS 細胞は精巣内に移植すると生殖細胞腫瘍を形成する。しかしながら、その組織像はアルカリフォスファターゼを発現 Ras を導入した GS 細胞とは異なり、セミノーママーカーである MAGEA4 の発現を認めた。

#### d) がん遺伝子の導入

上の Ras, cyclin, Bcl6b を用いた実験では、奇形腫形成を認めることができなかったが、セミノーマの発生起源は奇形腫と密接に関わりがあると考えられていることから、発がん遺伝子の導入パターンを変更すれば奇形腫を生じることは可能であると予想された。しかしながら、これまでの生殖細胞腫瘍の研究は生体モデルに限られており、生殖細胞の試験管内での形質転換系は確立されていなかった。これは適当な遺伝子導入方法がなかったことと均質な生殖細胞の採取が困難だったことが原因だと考えられる。そこで、まずは腫瘍化しやすい p53 KO GS 細胞へ Ras と c-myc を同時に導入する実験を計画した。この p53 の抑制と Ras, c-myc の導入はマウス体細胞の試験管内形質転換をもたらす古典的なプ

ロトコルであり、生殖細胞が形質転換された場合はどのような表現系を示すのかを調べてみた。

興味深いことに、p53 KO マウス由来の GS 細胞に遺伝子導入された GS 細胞は ES 細胞と非常によく似た形態をもつ細胞へと変化することが確認できた(図 10)。このことから、ES 細胞は生殖細胞が形質転換されたものに近い細胞であることが示唆された。しかしながら、Ras, c-myc, p53 dominant negative (p53 DD)を野生型 GS 細胞へ導入したところ、この細胞は ES 細胞様へと変化することはなかった。山中因子を導入しても GS 細胞には特に変化が認められなかったことから、GS 細胞から mGS 細胞への変化は単純に山中因子の発現上昇によるものではないことが示唆された。

そこで我々は GS 細胞ではなく、精巣から直接精子幹細胞を抗 CD9 抗体で濃縮し、上述の遺伝子の導入を行った。この場合には、遺伝子導入された細胞は一週間から 10 日で ES 様細胞に変化することが分かった。しかしながら、RT-PCR による解析を行うと、これらの細胞には ES 細胞の未分化マーカーである Nanog は発現されておらず、完全なリプログラミングが起こっていないことが判明した。興味深いことに、EpCAM 抗体を用いて濃縮された分化型の精原細胞ではこのような形質転換現象は認められなかったことから、標的細胞の分化レベルが形質転換に影響することが示唆された。

通常精子幹細胞は遺伝的に安定していると考えられているので、これらの細胞の染色体数をカウントしたところ、p53 DD, myc, Ras を導入した細胞は異常な核型を持つ細胞がほとんどの細胞を占めていた。一方、山中因子を導入した細胞では正常な核形の細胞が多く見られた。

多くの生殖細胞腫瘍では H19 DMR において脱メチル化が起こっていることが知られているため、次にインプリンティング遺伝子の DNA メチル化パターンの解析を COBRA 法により行った。形質転換を起こした全ての細胞について解析すると、p53 DD, myc, Ras を導入した細胞のみならず、山中因子を導入した細胞でも H19 DMR の脱メチル化が全例で起こっていることが分かった。この結果はがん化とリプログラミングに共通して DNA 脱メチル化が重要な役割を持つことを示唆する。

最後に、これらの細胞の分化能を調べるために、形質転換細胞を皮下に移植を行った。意外

なことに、p53 DD, myc, Ras を導入した細胞も山中因子を導入した細胞と同様の組織像を示し、セミノーマ、奇形腫、卵黄嚢腫のマーカーが混在する混合型胚細胞腫瘍を形成した。また、試験管内では発現が見られなかった c-kit の発現上昇も確認されたから、移植後に細胞の性質が変化していくことが示唆された (Biol. Reprod. 2012)。

以上の研究により生殖細胞を試験管内で形質転換する実験系を初めて構築することができた。

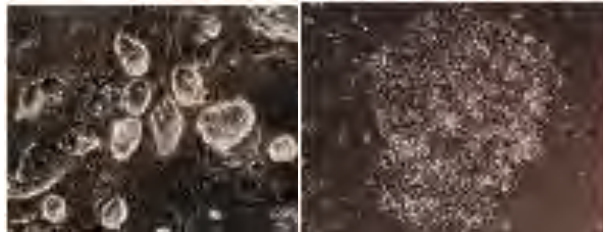


図 10 : RasV12, c-myc p53 dominant negative を遺伝子導入された精子幹細胞は ES 様細胞 (左) やエピブラスト状細胞シート (右) を形成した。

### iii) GS 細胞における DNA メチル化異常の誘導

上記の実験で ES 細胞とは遺伝子発現は異なるものの、形態的には良く似た形質転換コロニーが樹立できたことから、多能性細胞へのリプログラミングは生殖細胞の発がんと同様に密接に関係していることを示唆していた。次のステップとして、DNA メチル化に注目した。なぜならば、H19 DMR の脱メチル化は p53 DD, myc, Ras を導入した細胞のみならず、山中因子を導入した細胞でも共通して見られたからである。そこで、この H19 の脱メチル化がリプログラミングやがん化に共通して重要な役割を果たしているのではないかと予想された。実際に体細胞を用いた研究では Dnmt1 によるグローバルなゲノムの脱メチル化は細胞の腫瘍化を誘導することが知られていた。GS 細胞では 2009 年に Dnmt1, Dnmt3a/b の機能解析を行った際には mGS 細胞を得られていなかったものの (項目 I(2)a を参照)、この間に遺伝子導入効率が改善したこともあり再度この DNA メチル化の問題に取り組むこととした。

まず p53 KO GS 細胞へ Dnmt1 の shRNA を導入して DNA の global な脱メチル化の誘導を行った。2009 年に報告した実験では、細胞死が多く多能性細胞を検出することができなかったが、今回は感染後の培養時間を一ヶ月まで延長し、十分に脱メチル化が起こることを期待して実験を行った。Dnmt1 KD は約 3% のグローバルな DNA メチル化の低下を引き起こし、H19 DMR につ

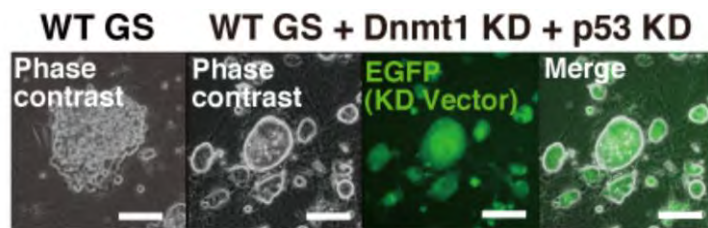


図 11: GS 細胞で Dnmt1 と p53 遺伝子を KD すると、mGS 細胞が出現してくる。

いては、その効果は更に大きく 50% まで脱メチル化が起こることが確認された。Dnmt1 を KD した結果、ほぼ一ヶ月前後で p53 KO GS 細胞は ES 細胞様のコロニーへと変化することが確認された。この細胞は Nanog を含む ES 細胞のマーカーを発現しており、精原細胞の分化マーカーは消失していたことから、p53 DD, myc, Ras を導入

して出来上がった ES 細胞様細胞よりもより ES 細胞に近い細胞であることが分かった。

この細胞は p53 を欠損した細胞であったために、確認のために野生型細胞に対して p53 と Dnmt1 のダブル KD を行ったところ、細胞死はより多く起こったものの、野生型細胞でも同様の ES 細胞様細胞を得ることができた (図 11)。

最後に、この細胞の分化能を調べる実験を行った。Dnmt1 の発現低下があると分化した細胞が得られないことから、この実験で用いた mGS 細胞は、inducible に Dnmt1 KD を行って作成した。この細胞は皮下注射により奇形腫を形成するのみならず、キメラ形成能を持つことも確認できた (Genes Dev. 2013)。



iv) 生殖細胞腫瘍候補遺伝子の発現異常による mGS 細胞の誘導

Dnmt1 の KD で ES 細胞様細胞を得ることができたことは、DNA の脱メチル化により発がん遺伝子の発現異常が起こっていることを示唆する。そこで、これまでにマウスおよびヒト生殖細胞腫瘍に関連しているとされる遺伝子を対象にして、p53 KO マウス由来 GS 細胞を用いて発現異常を誘導した。具体的には Dnd1, Dmrt1, Akt, Pten, beta-catenin, Hras, Bcl6b, FgfrIII, Lts2, Sprouty4, KitL, Tert, Atf7ip などを対象とした。この場合、腫瘍で発現上昇が起こっている場合は候補遺伝子の強制発現を行い、発現低下が起こっている場合には KD により発現低下を誘導した。遺伝子導入を行い 1 ヶ月で ES 細胞様のコロニーの出現をアッセイしたところ、Dnd1, Dmrt1 の KD により再現性良く ES 細胞様の形態をしたコロニーが出現することが明らかになった。

次にこの二つの遺伝子についても野生型の細胞を用いて遺伝子 KD を行った。Dmrt1 のみの KD では細胞死が多く起こり、多能性細胞を誘導することができなかったが、細胞死を抑制するために p53 の KD と組み合わせることで、ES 細胞様の細胞を得ることができた。興味深いことに、Dmrt1 の KD を行った際には Dnmt1 を KD した時よりも早く(早くて 11 日間)かつ効率良く mGS 細胞を得ることができた。Dnmt1 KD を行った際の遺伝子発現変化を調べたところ、実際に Dmrt1 の発現低下が遺伝子導入後 1-2 週間の間でおこなっていることが確認された。さらに

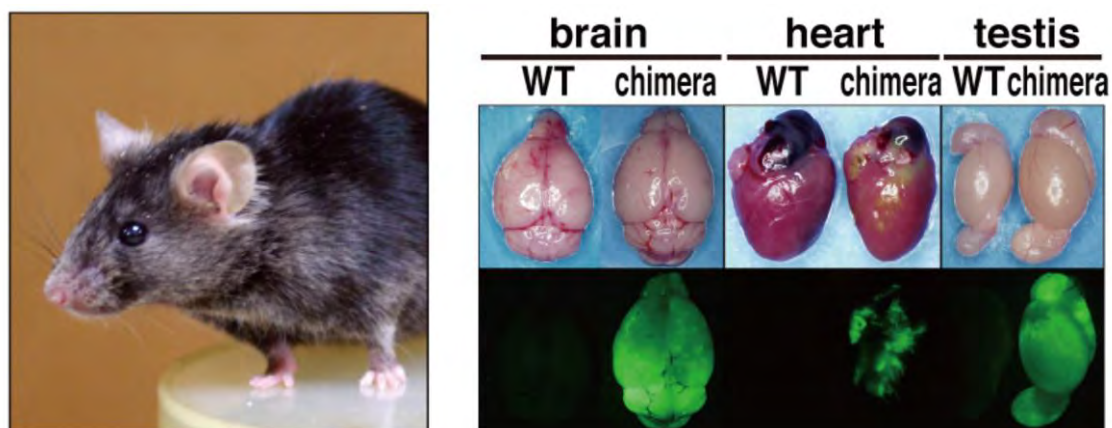


図 12: Dmrt1 と p53 のダブル KD により生じた mGS 細胞はキメラ形成能をもつ。GFP を発現しているのが mGS 細胞由来の組織を示す。

Dnmt1 KD と同時に Dmrt1 遺伝子の強制発現を行うと Dnmt1 による mGS 細胞の出現が抑制された。これらの結果は Dnmt1 KD により Dmrt1 の発現低下が起こり、ES 細胞様細胞が出現したことを示唆する。一方、Dnd1 KD は野生型細胞においては細胞死を誘導しなかったが、p53 を同時に KD しても mGS 細胞の発生を確認することができなかった。p53 KO の細胞では再現性良く Dnd1 の KD により多能性を誘導できたことから、別因子の関与の可能性が残ると共に Dnd1 KD の効率が十分でなかったことも否定できないので、野生型細胞でも Dnd1 が有効である可能性は今後さらに検討していく予定である。

当初 p53KD については細胞死を抑制することが目的で遺伝子導入を行ったが、Bax KD を代わりに用いて実験した場合については、Dmrt1 による細胞死をほぼ同程度に抑制することができたものの、mGS 細胞を得ることができなかった。また、p53 の下流分子として知られる p21 についても KO 細胞を用いると共に KD を行ったが、この場合も特に多能性を促進する効果は認められなかった。これらの結果から、p53 の抑制は単なる細胞死の抑制のみならず、多能性を積極的に促進していると想像される。

最後に Dmrt1 と p53 のダブル KD を行った細胞がキメラ形成能を持つことを確認する実験を行った。この実験ではベクターのゲノムへの挿入を防ぐために、野生型 GS 細胞に Dmrt1 と p53 に対する siRNA を用いて mGS 細胞を作成した。こうして出来上がった mGS 細胞を胚盤胞へマイクロインジェクションすると正常なキメラ個体が生じることが確認された。mGS 細胞は脳、心臓、精巣に分布することがドナー細胞の蛍光から確認することができた。更に、この個体は mGS 細胞由来の子孫を作ったことから、生殖細胞になることもできることも明らかとなった(図 12)(Genes Dev. 2013)。

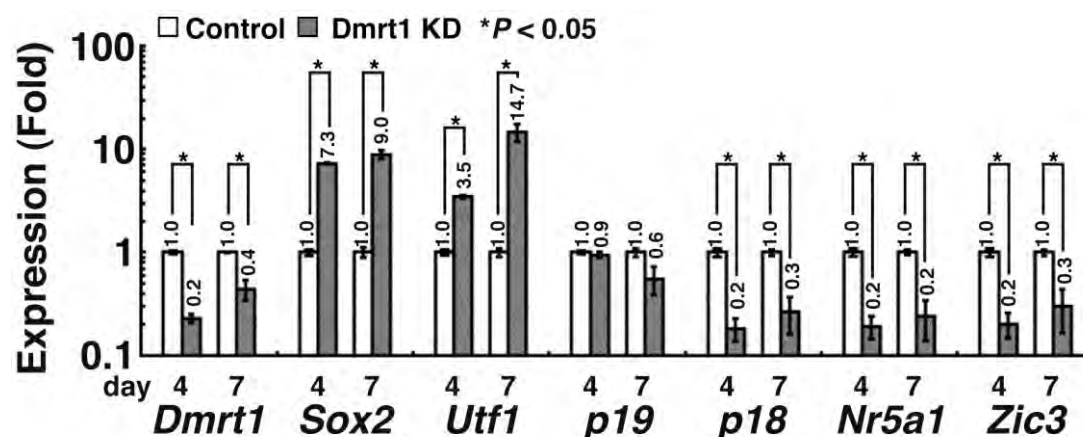


図 13: Dmrt1 の KD を行った際に見られたターゲット遺伝子候補の Realtime PCR 解析を行ったところ、Sox2 を含めた多能性関連遺伝子の発現変化が確認された。

#### v) Dmrt1 の標的遺伝子の同定

これまでに Dmrt1 が精原細胞で発現されていることは既に報告されており、neurog3 プロモーター下で Cre を発現するトランスジェニックマウスとの交配により KO マウスも作成されていた。意外なことに、このマウスでは多能性細胞や奇形腫の発生は報告されておらず、むしろ減数分裂の異常が認められていた。しかしながら、これまでに行われた ChIP-on-Chip 解析により精原細胞においての Dmrt1 の標的遺伝子が 1000 個程度同定されていた。このデータを解析すると、p18, p19 などの細胞周期関連遺伝子に加えて、Sox2, Utf1, p19, Nr5a1 などの多能性細胞関連遺伝子が含まれていた。

そこでこれらの遺伝子の発現変化を Dmrt1 KD 後に調べると、Sox2, Utf1, Nr5a1 の発現は上昇し、p18, p19 の発現は低下していたことから(図 13)、これらの遺伝子の変動が mGS 細胞の誘導に関わる可能性が高いと考えた。候補遺伝子の中で Sox2 遺伝子は GS 細胞でも mRNA が強発現しているが、タンパク質に翻訳されていないことが知られている。p53 KO GS 細胞を用いて発現上昇が起る遺伝子については cDNA を導入し、発現低下が起る遺伝子については KD 実験を行ったところ、この中で唯一 Sox2 を強制発現した細胞のみから mGS 細胞を得ることができた。この mGS 細胞の誘導は p53 KD を同時に行ったときのみ成功することから、p53 の抑制と Sox2 の亢進が多能性の誘導に必要であることが示された。

Sox2 を強制発現した細胞の Western blot を行くと、遺伝子導入後 4 日目には外来性の Sox2 タンパク質が発現されており、外来性の Sox2 の発現レベルの上昇は翻訳のブロックを解除することができることが明らかになった。他の候補遺伝子を組み合わせても特に頻度が上昇することがなかったことと、Sox2 の KD により mGS 細胞が誘導されなかったことを鑑みると、Dmrt1 の発現低下により Sox2 の発現上昇が起ることが mGS 細胞の誘導には必須であることが確認された。

Sox2 遺伝子を強制発現し、外来性の Sox2 を cre により削除した mGS 細胞は正常にキメラ個体を作成することができ、mGS 細胞由来の子孫を作成することができた (Genes Dev. 2013)。

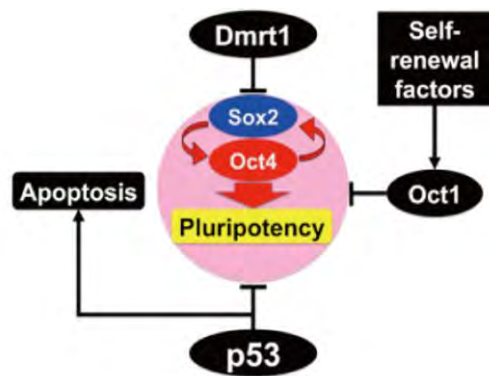


図 14: Dmrt1 は p53 と共同して GS 細胞の多能性制御に関与している。Sox2 は Dmrt1 の下流にあり、Dmrt1 により通常抑制されているが、Dmrt1 の発現低下により Sox2 の発現上昇が起こり mGS 細胞へと変化すると予想される。Sox2 の発現は Oct4 の発現上昇を誘導するが、Oct1 はそれと拮抗することで GS 細胞の多能性を抑制しているのだろう。

にはお互いに正の相関があり、両方の遺伝子が相互に発現促進を行っていることが明らかになった。

RT-PCR を行った解析によると、GS 細胞には Oct4 に加えて、Oct1、Oct6 という二つの Oct ファミリー分子が発現されている。これまでの報告で Oct6 は自己複製に関与することが知られていたが、Oct1 についてはその機能は知られていない。これらの遺伝子の自己複製因子による発現への影響を realtime PCR 法により解析を行ったところ、Oct4、Oct6 遺伝子は GDNF、FGF2 に非依存性であったが、Oct1 はいずれのサイトカインでも発現誘導されるという違いが観察された。Oct1 についての生殖細胞における機能は明らかにされていないが、Oct1 と Oct4 については、標的遺伝子配列が似ていることから、Oct1 の発現抑制は Oct4 の強制発現と同じ効果を持つのではないかと仮説を立てた。

この仮説を検証するために、ES 細胞における Oct4 の標的遺伝子の発現を野生型 GS 細胞において調べた。Oct1 の強制発現は Oct4 を KD した場合と同様に Utl1 の発現低下を引き起こす。逆に Oct1 の KD は Oct4 を強制発現した場合と同様に Utl1 の発現低下を引き起こすことが分かった。さらに Oct1 と p53 KD を同時に行ったところ、Oct4 の強制発現と同様の頻度で mGS 細胞を得ることができた(この実験においても p53 の抑制が必須であった)。Oct1 の KD は Sox2 及び Oct4 の発現が上昇することから、Oct1 と Oct4 のバランスが GS 細胞の多能性制御に重要であることが明らかとなった(図 14)(Genes Dev. 2013)。

### 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

##### a) 遺伝的背景の影響

マウスの奇形腫形成や ES 細胞の樹立には遺伝的背景が大きな役割を果たすことが知られている。GS 細胞は当初 DBA/2 および ICR の系統で樹立されたが、他の遺伝的背景をもつマウスでは樹立されていなかったため、6 つの純系マウス系統(C3H、AKR、BALB/C、A、129、C57BL/6)について GS 細胞の樹立を試みた。立ち上がりにかかる時間の差はあったものの、C3H、AKR、BALB/C、A の 4 つの系統については GS 細胞が樹立可能であることを証明し、長期培養後に正常な子孫の作製をおこなった。特に C3H 系統由来 GS 細胞については遺伝子導入、薬剤選択を行うことで、ト

#### vi) Oct 関連遺伝子の関与の検討

これまでの ES 細胞を用いた研究により Sox2 の発現は Sox2 と Oct4 の複合体が関与することが知られているので、Sox2 の発現が誘導された際には Sox2 が GS 細胞に少量発現する Oct4 と結合し、多能性幹細胞関連遺伝子の発現が起こると予想された。しかしながら、丹羽らの研究により、ES 細胞においては Sox2 の発現がなくとも、Oct4 の強制発現により幹細胞の未分化性が維持されることが知られている。そこで、Oct4 の GS 細胞に対する影響を調べるために、野生型の GS 細胞に Oct4 の強制発現を行った。Oct4 のみを強制発現すると細胞死を起こし mGS 細胞を得ることができなかった。しかしながら、Oct4 の強制発現と p53 の KD を組み合わせると、GS 細胞は Sox2 の発現誘導を起こし、Sox2 を強制発現した場合とほぼ同じ頻度で mGS 細胞を得ることができた。また、外来性 Oct4 遺伝子を強制発現の後、cre により削除した mGS 細胞は正常にキメラ個体を作成することができ、mGS 細胞由来の子孫を作成することができた。これらの結果は、GS 細胞においても ES 細胞で観察されたように Oct4 と Sox2 の発現



ランスジェニックマウスの作成を行うことが可能であることを証明した(図 15)。

しかしながら、C57BL/6 もしくは 129 系統については GS 細胞の樹立を試みたが、いずれも成功しなかった。特に奇形種を高い頻度で発生することが知られる 129 系統ではほとんどコロニー形成が認められなかった。これらの系統では可溶性 GFRA1 の添加により GDNF シグナルを増強すれば樹立可能との報告が以前にあるが、GFRA1 を添加してもこの2系統については GFRA1 非存在下と比べて特に増殖が改善されることがなかった。

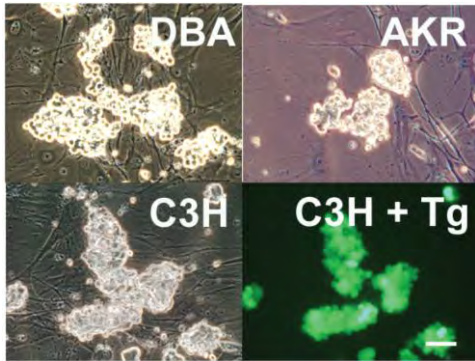


図 15: GS 細胞は通常 DBA/2 マウスより樹立されるが、AKR, C3H などのマウスでも樹立することが可能であった。C3H 系統については neomycin 遺伝子を導入し、薬剤選択を行うことでトランスジェニックマウスを作ることができた。

実際に C57BL/6 系統と DBA/2 の系統の精子幹細胞の自己複製能力を継代移植を用いて直接比較すると、DBA/2 由来の精子幹細胞の方がより効率良く自己複製を行うことから、マウスの遺伝的背景は精子幹細胞の自己複製に重要な影響を与えることが明らかになった (J. Reprod. Dev. 2010)。

#### b) 培養環境の影響

GS 細胞 (ICR 系統、DBA/2 x ICR F1, ICR x DBA/2 F1) をフィーダーフリーの laminin 上と MEF 上で継続して培養した。これらのサンプルの染色体解析を行なったが、特に異常所見は認められていない。

#### c) 培地の影響

これまでの研究では GS 細胞の培養には 1% という低濃度の血清添加が必要であったが、他の組織幹細胞や ES 細胞においては血清の添加が幹細胞の分化を誘導することを鑑みると、血清添加がない培養系の確立が GS 細胞の培養効率の改善につながりうると考えた。そこで、血清に存在している lipid やタンパク質について、置換を試みた結果、通常使っている bovine serum albumin を lipid の含有率が高い albumax に変更した上で、培地に lipid mixture と fetuin を添加することにより血清の非存在下で GS 細胞をラミニンの上でフィーダーフリーの状態でも培養できる実験系を確立した。こうして培養した GS 細胞は血清存在下で培養したものよりも、増殖速度は 1.5 倍程度早くなることが分かった。

しかしながら、この無血清状態で維持された GS 細胞を不妊マウスの精巣に移植すると、精子幹細胞の頻度が有意に低下していることがコロニーカウントから明らかになった。また無血清で培養された細胞から正常な子孫を得ることができたものの、こうした GS 細胞からの顕微授精後の子孫作成率についても有意な低下が見られた。

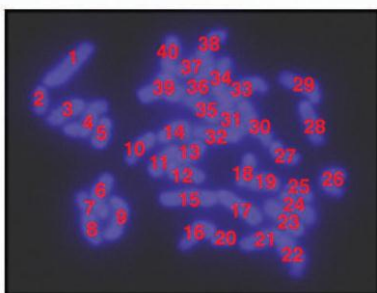


図 16: 無血清で培養した GS 細胞には染色体異常が高頻度で見つかった。この標本には 41 本の染色体が

そこで無血清培養を行った GS 細胞の染色体解析を行うと、異常な染色体数をもつ細胞の数が追う頻度に見つかった (図 16)。

これらの結果から血清には GS 細胞の自己複製分裂の頻度を上昇させる効果があり、血清の存在しない場合には GS 細胞の生物学的な安定性が低下していることが明らかになった (Biol. Reprod. 2011)。

#### d) 薬剤選択の影響

以上の実験は全てマウス GS 細胞を用いて行ったものであるが、ラット GS 細胞について長期培養を行ったところ、1 年半のラミニン上のフィーダーフリー培養後も正常な子孫を作ることができた。こ

の結果はラット GS 細胞もマウスと同様に安定な細胞であることを示唆した。

しかしながら、この細胞に neomycin 耐性遺伝子を導入して薬剤選択を行うと、薬剤選択後に取れたクローンの半数以上に染色体異常が確認された。これまでのマウス GS 細胞を用いた遺伝子改変実験においては、このような染色体異常は確認されていないが、これらの結果は薬剤選択が GS 細胞の核型に悪影響を与えることを示した (Biol. Reprod. 2011)。

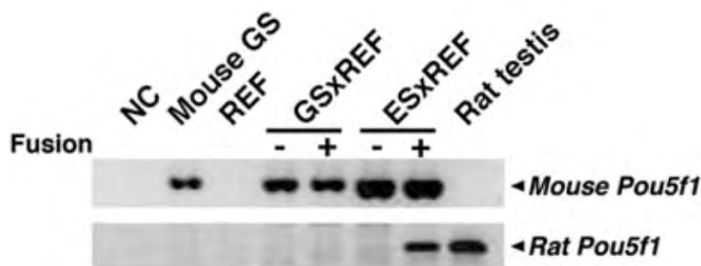


図 19: マウス GS 細胞をラット精巣細胞と細胞融合してもラット由来の Oct4 の活性化を認めることができなかった。一方、マウス ES 細胞はラット Oct4 の発現を誘導することができた。

## (2) 細胞の初期化能の解析

GS 細胞と mGS 細胞を用いて細胞融合を行ったところ、Electrofusion 法、polyethylene glycol 法のいずれによっても安定的に mGS 細胞と GS 細胞の融合を達成することができた。そこで GS 細胞を用いて融合実験をおこなった。GS 細胞と MEF の融合を行った場合でも、GS 細胞が持つ GFP 遺伝子の蛍光を発する MEF 形状の細胞が同定された。

次にマウスとラットの融合細胞を用いて GS 細胞が相手側の細胞の内因性の Oct4 の発現を誘導するかを検討した。マウス間の融合では相手側の核の同定が困難なので、マウス GS 細胞と rat embryonic fibroblast (REF) との融合を試みた。RT-PCR 法を用いた解析では、マウス GS 細胞と融合された REF の場合にはラットの内因性の Oct4 の発現を確認することができなかった(図 19)。しかしながら、mGS 細胞は ES 細胞と同様に体細胞との融合により、ラット由来 Oct4 マーカーの発現を誘導することができた。融合の効率も GS 細胞と mGS 細胞で同程度であったことから、mGS 細胞には GS 細胞よりも強力な初期化能力があることが明らかになった (Biol. Reprod. 2012)。

## (3) 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 eGS 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 DMR 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、項目 II (1) c 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うと、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。しかしながら、この細胞の H19 DMR の DNA メチル化レベルについては野生型細胞と変わらないことが明らかになった。

つぎにこの ICR 系統で維持されていた eGS 細胞由来の子孫を DBA/2 系統に交配し F1 個体の解析を行うと、ICR 系統では 16 代まで確認されていた H19 のメチル化異常は DBA/2 との F1 個体では確認されなくなった。この結果は H19 のメチル化異常にはマウスの遺伝的背景の影響があることを示唆する。

## (4) GS 細胞と多能性幹細胞の突然変異頻度比較

この項目は JST 国際共同研究により平成 25 年度途中より開始した。生体よりセルソーティングにより直接回収した濃縮精子幹細胞、GS 細胞、mGS 細胞、MEF について長期培養後に特定の遺伝子部位についての突然変異解析を行うものである。この実験で使う BigBlue マウスは Lac オペロンのリプレッサーである LacI 遺伝子を突然変異レポーターとして持つトランスジェニックマウスであり、様々な突然変異原性の検索に用いられている。生殖細胞についてはこれまでに体細胞よりも生殖細胞の方が突然変異の頻度が 5-10 倍低いこと、最も未分化な A 型精原細胞の変異が高いこと、老化と共にその頻度が高くなることが分かっている。本研究ではこの実験系を用い、生体内の濃縮された精子幹細胞分画と GS 細胞及び mGS 細胞の突然変異頻度の比



較を行う。同様の解析を GS 細胞からの子孫についても行い、GS 細胞の樹立、germline transmission 及び多能性の獲得が突然変異頻度に及ぼす影響を定量的に評価する予定である。既に Bigblue マウスを Dr. John McCarrey の研究室より導入し、本年度 8 月より繁殖を開始した。現在このマウスを交配して繁殖しつつあるところである。

#### § 4. 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 21 件)

1. Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., Takashima, S., Lee, J., Chuma, S., Nakatsuji, N., Fässler R. and Shinohara, T. 2008. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell* **3**, 533-542 (DOI:10.1016/j.stem.2008.08.002)
2. Kanatsu-Shinohara, M., Kato, M., Takehashi, M., Morimoto, H., Takashima, S., Chuma, S., Nakatsuji, N., Hirabayashi, M. and Shinohara, T. 2008. Production of transgenic rats via lentiviral and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* **79**, 1122-1128 (DOI:10.1095/biolreprod.108.071159)
3. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Morimoto, T., Morimoto, H., Ogura, A. and Shinohara, T. 2009. Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* **80**, 518-527 (DOI:10.1095/biolreprod.108.072330)
4. 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)
5. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Takashima, S., Oshimura M., 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)
6. 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)
7. Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Miki, M., 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)
8. Takehashi, M., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. 2010. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. *Dev. Growth Differ.* **52**, 303-310. (DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01167.x)
9. Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S. and Shinohara, T. 2010. Transmission distortion caused by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 6210-6215. (DOI:10.1073/pnas.0914448107)
10. Iwasa, T., Baba, S., Doi, H., Kaichi, S., Yokoo, N., Mima, T., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T., Nakahata, T. and Heike, T. 2010. Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 7-33. (DOI:10.1016/j.bbrc.2010.07.131)
11. Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Morimoto, H., Ogura, A. and Shinohara, T. 2011. Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol. Reprod.* **84**, 97-105. (DOI:10.1095/biolreprod.110.086462)
12. Shinohara, T., Ishii, K. and Kanatsu-Shinohara, M. 2011. Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *J. Reprod. Dev.* **57**, 288-295. (DOI:10.1262/jrd.10-168N)
13. Kanatsu-Shinohara M., Kato-Itoh M., Ikawa M., Takehashi M., Sanbo M., Morioka Y., Tanaka T., Morimoto H., Hirabayashi M. and Shinohara T. 2011. Homologous recombination in rat germline stem cells, *Biol. Reprod.* **85**, 208-217.

(DOI: 10.1095/biolreprod.111.090837)

14. Kanatsu-Shinohara M., Takashima S. and Shinohara T. 2011. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis, *PLoS One*, **6**, e23663. (DOI:10.1371/journal.pone.0023663)
15. Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M. Tanakai, T., Takehashi M., Morimoto, H., and Shinohara, T., 2011. Rac mediates spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier, *Cell Stem Cell*, **9**, 463-475. (DOI:10.1016/j.stem.2011.08.011)
16. Takehashi, M., Tada, M., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Oshimura, M., Tada, T. and Shinohara, T. 2012. Hybridization of testis-derived stem cells with somatic cells and embryonic stem cells in mice. *Biol. Reprod.* **86**, 178. (DOI:10.1095/biolreprod.112.098988)
17. 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. (DOI:10.1242/dev.076539)
18. Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Takashima, S., Takehashi, M., Ogonuki, N., Morimoto, H., Nagasawa, T., Ogura, A. and Shinohara, T. 2012. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell* **11**, 567-578. (DOI:10.1016/j.stem.2012.06.011).
19. Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H. and Shinohara, T. 2012. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression. *Biol. Reprod.* **87**, 139. (DOI:10.1095/biolreprod.112.103861)
20. Morimoto, H., Iwata, K., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, T., Yabe-Nishimura, C. and Shinohara, T. 2013. ROS are required for spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **12**, 774-786. (DOI:10.1016/j.stem.2013.04.001).
21. Takashima, S., Hirose, M., Ogonuki, N., Ebisuya, M., Inoue, K., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Nishida, E., Ogura, A., Shinohara, T. 2013. Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Gene Dev.* **27**, 1949-1958. (DOI:10.1101/gad.220194.113)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M. and Shinohara, T. 2008. Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **73**, 17-23 (DOI:10.1101/sqb.2008.73.033)
2. Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. 2010. Germline modification using mouse spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol.* **477**, 17-36 (DOI:10.1016/S0076-6879(10)77002-6)
3. Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. 2013. Self-renewal and differentiation of mouse germline stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* in press.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 0 件、国際会議 14 件)

1. Shinohara T, Society for the Study of Reproduction Annual Meeting, "Culture of Spermatogonial stem cells" 2008年5月26日 米国 Hawaii
2. Shinohara T, Cold Spring Harbor 73rd Symposium: Control and Regulation of Stem Cells, "Culture of Spermatogonial stem cells" 2008年6月2日 米国 New York
3. Shinohara T, Cornell University Stem Cell Lecture Series, "Culture of Spermatogonial stem cells" 2008年6月3日 米国 New York
4. Shinohara T, The 11th Kyoto University International Symposium, "Culture of Spermatogonial stem cells" 2008年10月10日 中国上海

5. Shinohara T, The 36th International Congress of Physiological Sciences, “Derivation of embryonic germline stem cells” 2009年8月1日 京都
6. Shinohara T, Keystone meeting, “Positive and negative regulators of mouse spermatogonial stem cell self-renewal” 2010年2月17日 米国 Colorado
7. Shinohara T, Spermatology meeting, “Positive and negative regulators of mouse spermatogonial stem cell self-renewal”, 2010年6月26日 沖縄
8. Shinohara T, 日本アンドロロジー学会, “Positive and negative regulators of mouse spermatogonial stem cell self-renewal”, 2010年7月31日 東京
9. Shinohara T, North American Testis Workshop, Lonnie Russell Memorial Lecture “Stem cells and Sertoli cells: How stem cells find their way to niche”, 2011年3月31日 カナダ Montreal
10. Shinohara T, Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche, Developmental Control of Sex, Growth and Cellular Fate, 中国蘇州, 2011年10月12日
11. Shinohara T, Derivation of stem cell lines from the male germline, International Workshop: Radiation Effects on Mutation in Somatic and Germline Stem Cells, 広島, 2012年1月18日
12. Shinohara, T, In vitro transformation of male germline stem cells, The 58<sup>th</sup>/60<sup>th</sup> NIBB conference Germline-Specification, Sex, and Stem Cells-, 岡崎, 2012年7月20日
13. Shinohara, T, Reconstitution of male germline niche in vitro. Brinster Symposium 米国 Philadelphia, 2012年8月25日
14. Shinohara, T. Reconstitution of male germline niche in vitro. International Congress of Andrology 豪州 Melbourne, 2013年2月26日

② 口頭発表 (国内会議 6 件、国際会議 1 件)

1. Shinohara T, International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells, “Phenotypic variation of mouse germline stem cells in vitro”, 博多, 2010年11月24日
2. 篠原隆司, Rac による精子幹細胞のホーミング制御、特定領域班会議、大阪、2011年11月17日
3. 篠原隆司、マウス精子幹細胞の試験管内形質転換系の確立、発生工学の最先端、東京、2012年3月8日
4. 篠原隆司、接着分子による精子幹細胞のホーミング制御、発生工学・疾患モデル研究会、東京、2012年3月13日
5. 篠原隆司, Spermatogonial stem cells: Towards the conquest of the male germline, 生殖医学研究会、京都、2012年4月27日
6. 篠原隆司、マウス精子幹細胞の試験管内形質転換系の確立、第53回日本哺乳動物卵子学会、大阪、2012年5月26日
7. 篠原隆司、試験管内における精子幹細胞ニッチの再構成、特定領域班会議、京都、2012年11月22日

③ ポスター発表 (国内会議 0 件、国際会議 1 件)

1. Shinohara T, In vitro transformation of male germline stem cells, International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, 横浜、2012年6月15日

(4) 知財出願

① 海外出願 (2 件)

1. 発明の名称: 生殖細胞からの多能性幹細胞様細胞の誘導  
発明者: 篠原隆司、高島誠司

出願人:国立大学法人京都大学

出願日:2011/12/29

出願番号:US 61/581,172

2. 発明の名称:生殖細胞からの多能性幹細胞様細胞の誘導

発明者:篠原隆司、高島誠司

出願人:国立大学法人京都大学

出願日:2012/12/28

出願番号:PCT/JP2012/084138

(5)受賞・報道等

① マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

- ・「精子幹細胞の必須物質確認 京大グループ」、2008年12月1日 読売新聞
- ・「京大グループ「接着分子」発見」、2008年11月6日 京都新聞
- ・「男性不妊治療に道、特殊タンパク質が精子形成に関与」、2008年11月6日 産経新聞
- ・「精子幹細胞からの生殖細胞腫瘍モデルの作成に成功」、2009年7月2日 京都新聞
- ・「ヒト生殖細胞研究 体内の神秘に迫る 不妊症、遺伝病などの解明に期待」、2010年4月6日 毎日新聞
- ・「精子幹細胞の増殖に働くタンパク質特定」、2011年11月5日 京都新聞
- ・「精子幹細胞生着の機序解明」、2011年11月14日 化学工業日報
- ・「精子幹細胞の精巣生着 関与たんぱく質特定」、2011年11月17日 日刊工業新聞
- ・「精子幹細胞 増殖環境を再現」、2012年10月5日 京都新聞
- ・「精巣内定着率↑ タンパク質特定」、2012年10月5日 産経新聞
- ・「活性酸素不足も原因か 男性不妊、新治療法に道」、2013年6月7日 日本経済新聞
- ・「男性不妊 治療法変わる? 活性酸素除去で精子減少 京大グループ発表」2013年6月7日 毎日新聞
- ・「活性酸素で精子増 京大チーム マウス実験 13倍に」2013年6月7日 読売新聞
- ・「活性酸素 精子幹細胞増殖に関与 欠如が不妊症の原因」2013年6月7日 日刊工業新聞
- ・「精子幹細胞増殖活性酸素が必須 京大などグループ解明」2013年6月7日 京都新聞
- ・「適度な活性酸素、精子形成に必要 不妊治療見直しも 京大大学院」2013年6月7日 産経新聞
- ・「低濃度活性酸素 精子増やす力 京大研究、不妊治療に一石?」2013年6月13日 朝日新聞



## § 5. 研究期間中の活動

### (1) 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2009年5月3日	「次世代生殖幹細胞：Germline Stem Cellの可能性」	紫蘭会館	約 200 名	京都大学医学部父兄に対しての公開講演会を行った。
2011年10月11-15日	Developmental control of sex, growth and cellular fate	Cold Spring Harbor Asia	100 人	生殖細胞、発生学分野を対象とした学会の開催
2012年3月10日	京大アカデミックデイ	京都大学	500 人	一般市民、高校生などを対象に研究成果の発表を行った

## § 6. 最後に

CREST 研究では非常に自由に研究させて頂き、有り難うございました。アドバイザーの先生方のみならず、他のチームとの共同研究などは非常に有益でした。時間はかかりましたが、自分なりに試行錯誤して多能性の問題を解くための端緒を得たことは非常に有意義であり大変役立ちました。この CREST 研究から派生した新しい問題を是非追究していきたいと思っています。とくに、生殖細胞のどこが多能性細胞や体細胞と異なっているのかは重要な課題だと思われます。また CREST を通じて知り合うことのできた、選ばれた優れたメンバーによるアドバイスや交流についても続けさせて頂き、今後の研究に活かしていきたいと思っています。