「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

H22 年度
実績報告

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

我々は昨年、GS 細胞に Ras 遺伝子を導入すると生体内でセミノーマへと変化することを見いだした。本年度、我々はセミノーマから奇形腫を誘導するためにGS細胞に活性化型Ras, c-myc, p53 dominant negative 体の3つの遺伝子導入を行った。GS 細胞に遺伝子導入を行った場合には特に細胞の外見上の変化を認めることができなかったが、同じ遺伝子を精巣から直接純化した精子幹細胞に導入したところ、ES 様細胞を得ることができた。更に我々は Yamanaka factor の遺伝子導入を試みたが、この場合でもGS細胞においては変化を認めることができなかったが、純化した精子幹細胞からはES様細胞を得ることができた。これらの結果はGS細胞と精子幹細胞とは必ずしも同一の機能を持つものではないことを示すものである。また、mGS 細胞への誘因因子を同定するために、p21, p27, p53 ノックアウトマウスの精巣細胞の継代移植をおこなったところ、p27 ノックアウトマウスの場合には自己複製分裂の頻度が低下したが、p21, p53 ノックアウトマウスの精子幹細胞は野生型の細胞と同程度の増殖効率を示し、いずれの移植実験においても奇形腫への変化を認めることができなかった。これは、精子幹細胞の増殖誘導のみでは mGS 細胞へと変化させるには十分ではないことを示唆する。

§2. 研究実施体制

(1)「篠原」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

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。生殖細胞においてはセントロメア付近のリピート配列のメチル化レベルが低いことから、ES 細胞の融合体よりも mGS 細胞の場合ではこのメチル化のレベルが低いことが予想される。現在、この実験をさらに追加して本年度中の論文投稿を準備中である。

(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)

ES 細胞で重要な役割を果たしているポリコー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。また Ezh2 のノックダウン細胞の作製も行った。 この Ezh2 の欠損細胞およびノックダウン細胞で mGS 細胞が誘導されるかを調べてみたが、両者の細胞において外見上に大きな変化は見られず、増殖速度、細胞増殖因子の依存性、H19 などの DNA メチル化について野生型の GS 細胞と顕著な差を認めることができなかった。

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

p53 knockout マウス由来の GS 細胞を用いて 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、mouse embryonic fibroblast (MEF)上へ細胞を移動した際に mGS 細胞が出現する場合が多いことが分かった。このことから、p53 knockout 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る。また、p53knockout マウス由来の embryonic fibroblast は GS 細胞を mGS 細胞に効率よく変化させる可能性についても調べてみたが、通常の野生型の 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。薬剤の影響については、5-azacytidine, trichostatin A、RG108, scriptaid, valproid acid を異なる濃度で GS 細胞の培養に加えて検証を行ったが、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。

精子幹細胞の増殖刺激が奇形腫／mGS 細胞への変化を促すか否かを検討するために、p21, p27, p53 ノックアウトマウスの精巣細胞の継代移植を行った。p27 ノックアウトマウスの場合は自己複製分裂の低下が見られたが、p21, p53 ノックアウト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。また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 [3)]。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. 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

平成 21 年度の実験から、Rac の抑制により GS 細胞の増殖が促進されることが示唆されていたが、本年度我々は Rac1 の dominant negative mutant の導入により GS 細胞の増殖が促進され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。この結果を確認するために、Rac1 の conditional knockout 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 knockout した細胞は野生型細胞と特に大きな変化は認められなかった。幹細胞の数および自己複製については精子幹細胞移植法により確認を行ったところ、野生型の細胞と比較して Rac1 knockout 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。

(2) 遺伝子導入による mGS 細胞の樹立

p53 knockout GS 細胞は高頻度に mGS 細胞へと変化することから、我々は GS 細胞から mGS 細胞への変化ががん化と関連がある可能性が高いと仮説をたてた。昨年我々は GS 細胞へ Ras 遺伝子の導入を行った結果、試験管内においては Ras 導入 GS 細胞は外来のサイトカインを必要とせずに増殖し、精細管内に移植すると腫瘍化し、セミノーマを形成することが明らかとなった。本年度我々はさらに p53 knockout GS 細胞へ Ras に加えて c-myc を同時に導入した。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。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 factor 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 factor の発現上昇によるものではないことが示唆された。

我々はさらに 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、同じ遺伝子を導入を行った。興味深いことに、これらの細胞は ES 様細胞に変化することが分かった。

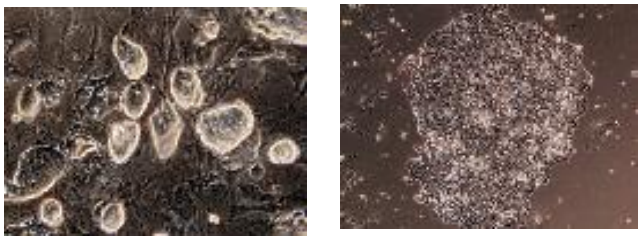

図 1 の説明: RasV12, c-myc p53 dominant negative を遺伝子導入された精子幹細胞は ES 様細胞(左)やエピブラスト状細胞シート(右)を形成した。

III. 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

GS 細胞(ICR 系統、DBA/2 x ICR F1, ICR x DBA/2 F1)を長期培養し、これまでに 2, 6, 9 ヶ月に渡りフィーダーフリーの laminin 上と mouse embryonic fibroblast 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。また GS 細胞をこれまで樹立ができなかった系統(C3H、AKR など)についても樹立可能である

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 [1,2]。mGS 細胞については長期培養後に正常の ES 細胞と同様に生体内で分化することが確認された [4]。

血清の GS 細胞の核型に及ぼす影響を調べるために、我々は serum およびフィーダーが存在しない条件での GS 細胞の培養系を確立した [5]。この培養系においては GS 細胞は六ヶ月以上の期間において増殖することができたが、精子幹細胞の頻度が有意に低下していることが移植実験から明らかになった。またこうした GS 細胞からの顕微授精による子孫作成率についても有意な低下が見られた。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。

(2)DNA ダメージ後のストレス反応の解析

EGFP を発現する Green mouse と p53 knockout マウスの交配ができ、細胞移植も終了した。さらに追加移植を行っている。

(3)細胞の初期化能の解析

この実験については必要な解析を終了したために、本年度中の論文投稿を準備している。

§4. 成果発表等

(4－1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Mito Kanatsu-Shinohara, Narumi Ogonuki, Hiromi Miki, Kimiko Inoue, Hiroko Morimoto, Seiji Takashima, Atsuo Ogura and Takashi Shinohara “Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal” J Reprod Dev vol 56, No. 1, pp.145-153 2010　doi:10.1262/jrd.09-153N
2. Masanori Takehashi, Mito Kanatsu-Shinohara and Takashi Shinohara “Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells” Dev Growth Differ vol. 52, No. 3, pp..303-310, 2010　doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01167.x
3. Mito Kanatsu-Shinohara, Seiji Takashima and Takashi Shinohara. “Transmission distortion caused by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation” Proc Natl Acad Sci USA vol.107, No. 14, pp.6210-6215, 2010　doi: 10.1073/pnas.0914448107
4. Toru Iwasa, Shiro Baba, Hiraku Doi, Shinji Kaichi, Noritaka Yokoo, Takahiro Mima, Mito Kanatsu-Shinohara, Takashi Shinohara, Tatsutoshi Nakahata and Toshio Heike. “Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model” Biochem Biophys Res Commun vol.400, No. 1, pp.27-33, 2010　doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.131
5. Mito Kanatsu-Shinohara, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Hiroko Morimoto, Atsuo

Ogura and Takashi Shinohara. “Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells” Biol. Reprod. Vol. 84, No. 1, p. p97-105, 2011
doi:10.1095/biolreprod.110.086462

（4－2） 知財出願

① 平成22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）