

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) 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
論文が発表された¹⁾。
- (2) エピジェネティック因子の影響の解析

昨年度理研古関グループよりポリコム遺伝子群の機能解析のために Ring1 の conditional knockout マウスの導入を行い、その 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解析を行ったが、精子幹細胞の頻度について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。Ring1 の cDNA の強制発現を行ったが、特に細胞増殖と分化能については大きな影響が認められず、精巣に移植後も精子幹細胞活性、奇形腫および精子形成について異常は認められなかった。

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

前年度に同じく p53 knockout GS 細胞を用いて発がん遺伝子のスクリーニングを行った際に、Dnd 遺伝子と Dnmt1 遺伝子の発現低下により mGS 細胞を誘導する結果が得られたことから、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 knockdown を行ったが、Dnmt1 の knockdown を行った際には Dnd1 を抑制した時よりも効率良く mGS 細胞を得ることができた。一方、Dnd1 knockdown では野生型細胞においては mGS 細胞の発生を確認することができなかった。

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

前年度の予備実験において我々は活性化酸素の添加が GS 細胞の増殖を促進することを見いだした。本年度はその影響の解析をより詳細に行った。GS 細胞は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上昇し、その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、過酸化水素を産生する過酸化水素を 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の過酸化水素の添加を行ったところ、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が、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。

この実験に加えて、GS 細胞の増殖に関与する分子として MCAM を同定した⁴⁾。MCAM のノックダウンを行うと GS 細胞を移植した際にコロニー形成が低下することから、GS 細胞の幹細胞活性維持に必要であることが示唆された。

我々は更に GS 細胞の新規増殖因子を見つけるために、新たなセルトリ細胞培養法を開発した³⁾。このセルトリ細胞培養法を用いると、通常増殖が起らない C57BL/6 系統由来の GS 細胞の増殖が確認されたことから、未知の精子幹細胞自己複製因子を発現していることが強く示唆された。現在、マイクロアレイを用いてこのセルトリ細胞フィーダーから発現している増殖因子の同定を試みている。

(2) 遺伝子導入による mGS 細胞の樹立

これまでに我々は p53 knockout mouse 由来の GS 細胞に Ras, Myc を導入すると ES 細胞様の細胞へと変化するが、野生型 GS 細胞に Ras, Myc, p53 に対する shRNA を加えても同様の変化は見られないことを見いだしていた。本年度、野生型 GS 細胞を腫瘍化させる遺伝子として新たに

Bcl6b を同定した²⁾。Bcl6b を導入した GS 細胞は FGF2 なしでも自己複製を行う。試験管内ではその表現型に異常は見られないが、生体内に移植するとセミノーマを生じた。この性状は Ras, Myc, p53 抑制の場合とは異なっており、現在この遺伝子を組み合わせることにより mGS 細胞の樹立が可能であるか検討を行っている。

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

II (1)において過酸化水素の添加により GS 細胞の増殖促進が起こることを見いだしていたが、この細胞から正常な子孫を得ることができるか否かを検討するために顕微授精を行った。その結果、野生型の GS 細胞を用いた場合と同じ効率で正常な子孫を得ることができた。この結果により過酸化水素は長期培養を行った場合にも GS 細胞の安定性に大きな影響を与えることなくその増殖を促進す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

精子幹細胞の放射線耐性について mouse embryonic fibroblast (MEF)と mGS 細胞を用いて比較検討を行った。S 細胞では細胞死が亢進するのみならず、細胞周期の抑制が G1 期で抑制されるのに対して MEF では G2 期に抑制され、mGS 細胞では ES 細胞と同様に細胞周期の抑制は認められなかった。また、GS 細胞における放射線照射後の免疫染色で gamma H2AX が MEF および mGS 細胞と同程度のレベルで認められた。これは従来、生体内の精子幹細胞では gamma H2AX の染色が放射線照射後に認められないとされていた結果と異なる。上記に加えて、p53 の放射線に対する反応性を検討するために GS 細胞における p53 のリン酸化パターンの解析を行った。Western blot を行った結果、GS 細胞においては p53 が放射線照射と共に増加し、特に Ser18 と Ser23 に対するリン酸化については、前者が 4 時間頃から同定され、後者は照射後 1 時間の段階で認められた。現在、GS 細胞における p53 遺伝子の下流分子を探索するべく、shRNA を発現するレンチウイルスでスクリーニングを行っている。

(3) リプログラミング異常のメカニズムの解析

胎児期の生殖巣から GS 細胞様の細胞の樹立を昨年度報告したが、この細胞の H19 の DNA メチル化レベルを検討したところ、野生型の場合と変わらないことが明らかとなった。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. 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)

2. 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)
3. 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).
4. 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, 2012 (DOI:10.1095/biolreprod.112.103861)