

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062006

研究課題名（和文） 精子幹細胞における品質管理機構の解析

研究課題名（英文） Analyses on the quality control mechanism of mouse spermatogonial stem cells

研究代表者 篠原 隆司（SHINOHARA TAKASHI）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322770

研究成果の概要（和文）：

本研究で我々は胎児期の生殖細胞からヒストン修飾異常をもつ germline stem (GS)GS 細胞を樹立した。この細胞から生まれた子孫はインプリント遺伝子の DNA メチル化異常が数代に渡り継続して発生する。更に GS 細胞の遺伝的安定性に p53 が重要であること、また epigenetic な安定性には DNMT3a/b 分子が関与すること、その腫瘍化には epigenetic な不安定性が伴うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to understand the mechanism of quality control of spermatogonial stem cells. In our previous grant on priority area, we reported a long-term culture system for spermatogonial stem cells, which were designated as germline stem (GS) cells. We used GS cells to produce knockout animals by homologous recombination in these cells.

In the course of this study, we noticed that GS cells are very stable in their genetic and epigenetic properties. Unlike embryonic stem (ES) cells that change their chromosome number and DNA methylation patterns in imprinted genes, GS cells maintained normal chromosome number and androgenetic DNA methylation patterns in imprinted genes for more than 2 years in vitro. Based on this observation, we hypothesized that GS cells have a unique mechanism to prevent germline transmission of genetic and epigenetic abnormalities to subsequent generations and that defects in these properties will lead to pluripotent cell derivation or abnormalities in spermatogenesis.

In the current grant, we were able to establish GS cells from fetal germ cells, which had defects in histone modification patterns in imprinted genes. Offspring that were derived from these cells showed abnormal DNA methylation patterns in imprinted genes, which continued at least five generations. We also analyzed the impact of Dnmt genes or oncogenes in genetic and epigenetic properties of GS cells. Our analysis revealed that p53 is important in genetic integrity of GS cells and that DNMT3a/b are responsible for maintaining epigenetic integrity. We also established the first experimental system for in vitro transformation of germ cells, which will be useful for understanding the mechanism of epigenetic regulation in SSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	20,700,000	0	20,700,000
2009 年度	20,700,000	0	20,700,000
2010 年度	20,700,000	0	20,700,000
2011 年度	20,700,000	0	20,700,000

2012 年度	20,700,000	0	20,700,000
総計	103,500,000	0	103,500,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：発生学

キーワード：精子形成、幹細胞、移植、培養、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は個体の精子形成の源になる細胞であり、自己複製機能をもつ。この細胞は精巣内においては数が非常に少なく(2-3万個/精巣)、その解析は困難であった。しかしながら、前特定領域研究において我々は精子幹細胞の自己複製因子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の添加により、この細胞の長期培養に成功した。こうして培養された精子幹細胞は germline stem (GS) 細胞と命名された。

我々は GS 細胞を用いることにより遺伝子ノックアウトマウスの作成に成功した。その研究の過程で、見いだしたのはこの細胞がもつ高度の遺伝的な安定性であった。その後の解析により GS 細胞は embryonic stem (ES) 細胞と異なり、2 年以上の長期にわたって培養を行っても染色体やインプリンティング遺伝子の DNA メチル化異常は認められないことが分かった。これらの結果は精子幹細胞を含む生殖細胞には子孫への遺伝子やエピゲノムの異常の伝達を防ぐための独特の分子機構が存在することを強く示唆するものであった。そこで本研究はこの GS 細胞の安定性に関与する分子を同定し、GS 細胞の品質管理メカニズムを解析する目的で開始された。

2. 研究の目的

本研究の目的は GS 細胞の遺伝的およびエピゲネティックな安定性に関与する遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

精子幹細胞の自己複製因子である GDNF の添加により、胎児期および生後の生殖細胞からの GS 細胞の樹立および培養精子幹細胞への遺伝子導入を行った。遺伝子導入についてはレンチウイルスベクターを利用した。細胞が正常な幹細胞機能を持つか否かの検定は不妊マウスの精巣の精細管内への細胞移植を行い、ドナー由来の細胞が作る幹細胞コロニーの性状を切片で観察することにより判定を行った。

4. 研究成果

(1) 胎児期生殖細胞由来の GS 細胞の樹立

我々は胎生期の生殖細胞から精子幹細胞活性を持つ細胞の樹立に成功し、この細胞を eGS 細胞と名付けた。eGS 細胞は GS 細胞と同様に GDNF の存在下で増殖し、外見上は GS 細胞と区別することができない。この細胞は正

常な DNA メチル化パターンを持つが、ヒストン修飾パターンが生後の精巣由来の GS 細胞と異なっているという特徴を持つ。この細胞を精巣内に移植すると精子形成を行なうことができるが、インプリンティング遺伝子における異常な DNA メチル化を持つ個体で作成されることが分かった。また、この DNA メチル化の異常は子孫にも代々伝達されていく(現在までに 8 代)。これは通常のエピジェネティックな異常が胎児期の生殖細胞の発生時に消失するのとは対照的な結果であり、DNA メチル化異常が子孫に伝達された最初の例である。

(2) DNA メチル化酵素の役割

DNA methyltransferase (DNMT)1 レベルは GS 細胞の生存に重要であり、DNMT1 のノックダウンを行った GS 細胞は p53 依存性の細胞死を起こすことが分かった。これはすべての DNMT をノックアウトされても増殖を続ける ES 細胞とは異なった性質である。一方、DNMT3 をノックアウトされた GS 細胞は SineB にメチル化異常を持つことが明らかとなった。また、通常 GS 細胞には発現されていない DNMT3L を GS 細胞で強制発現を行った場合は major および minor サテライト DNA のメチル化が亢進することが明らかになった。

(3) cyclin dependent kinase inhibitor (cdki) による精子幹細胞からの子孫作成効率の制御

精子幹細胞の自己複製を制御する候補分子として p21, p27 cdki の機能解析を行った。p21 遺伝子が欠損した精子幹細胞は野生型の幹細胞よりも子孫作成を効率に行うが、p27 遺伝子が欠損した場合には逆に野生型の精子幹細胞の方が効率よく子孫作成を行うことを明らかにした。特に p27 遺伝子については継代移植により精子幹細胞の自己複製分裂を直接制御している可能性が示唆された。

(4) 生殖細胞の試験管内形質転換系の開発

体細胞のがん化については試験管内におけるがん遺伝子導入において再現されている。一方、生殖細胞については形質転換系が存在せず、エピゲノムの変化と形質転換との関係を調べるのが困難であった。そこで同様の実験系を精子幹細胞について確立すべく鋭意努力の結果、新鮮な精巣から精原細胞を回収し、この細胞集団に p53 の dominant negative 体、c-myc, 活性化型 H-Ras を導入

することで ES 細胞と同様な形態をもつ生殖細胞コロニーを誘導することに成功した。この際、H19 などのインプリンティング遺伝子の脱メチル化が生じることを見いだすと共に、p53 の抑制が染色体異常を引き起こすことが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

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(6), 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(10), 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(4), 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(6), 139, (DOI:10.1095/biolreprod.112.103861)
5. 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 (1), 208-217, (DOI:10.1095)
6. 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(8), e2366 (DOI:10.1371)
7. Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Takehashi, T., 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(5), 463-475, (DOI:10.1016)

8. Morimoto, H., Lee, J., Tanaka, T., Ishii, K., Toyokuni, T., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection. 2012. *Biol. Reprod.* 86(5), 148, (DOI: 10.1095/biolreprod.111.095307)
9. Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara T. 2010. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *J. Reprod. Dev.* 56(1), 145-153 (DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01167.x.)
10. Takehashi, M., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara T. 2010. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. *Dev. Growth Differ.* 52(3), 303-310 (DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01167.x)
11. Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S. and Shinohara T. 2010. Regulation of germline transmission in the male mice by p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(14), 6210-6215 (DOI: 10.1073/pnas.0914448107)
12. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Morimoto, T., Ogura, A. and Shinohara, T. 2009. Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 80(3), 518-527 (DOI: 10.1095/biolreprod.108.072330)
13. 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).
14. 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 (1), 76-86 (DOI: 10.1016/j.stem.2009.04.020.)
15. 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 b1-integrin. Cell Stem Cell 3(5), 533-542 (DOI: 10.1016/j.stem.2008.08.002).

16. Kanatsu-Shinohara, M., Muneto, T., Lee, J., Takenaka, M., Chuma, S., Nakatsuji, N., Horiuchi, T. and Shinohara, T. 2008. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. Biol. Reprod. 78 (4), 611-617. <http://www.biolreprod.org/content/78/4/611.long>

17. 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 (6), 1122-1128 (DOI: 10.1095/biolreprod.108.071159.).

[学会発表] (計 11 件)

1. 10th International congress of Andrology 、 “Reconstitution of male germline niche in vitro”. 2013 年 2 月 26 日、豪州 Melbourne
2. Brinster Symposium、“Reconstitution of male germline niche in vitro”. 2012 年 8 月 25 日、米国 Philadelphia
3. The 58th/60th NIBB conference Germline-Specification, Sex, and Stem Cells-, “In vitro transformation of male germline stem cells”, 2012 年 7 月 20 日、岡崎
4. International Workshop of Radiation Effects on Mutation in Somatic and Germline Stem Cells, “Derivation of stem cell lines from the male germline”, 2012 年 1 月 18 日、広島
5. Developmental Control of Sex, Growth and Cellular Fate, “Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche, 2011 年 10 月 12 日、中国蘇州
6. Keystone Meeting, “Positive and negative regulators of mouse spermatogonial stem cell self-renewal” 2010 年 2 月 17 日、米国, Colorado
7. The 36th International Congress of Physiological Sciences, “Derivation of embryonic germline stem cells” 2009 年 8 月 1 日、京都
8. The 11th Kyoto University International Symposium. “Culture

- of Spermatogonial stem cells” 2008 年 10 月 9 日、中国上海
9. Cornell University Stem Cell Lecture “Culture of Spermatogonial stem cells” 2008 年 6 月 3 日、米国 New York
 10. Society for the Study of Reproduction, Annual meeting “Culture of Spermatogonial stem cells” 2008 年 5 月 25 日、米国 Hawaii
 11. 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 [図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称：生殖細胞からの多能性幹細胞様細胞の誘導
発明者：高島誠司、篠原隆司
権利者：京都大学
種類：特許
番号：PCT/JP2012/084138
出願年月日：2012 年 12 月 28 日
国内外の別：国外

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
篠原 隆司 (SHINOHARA TAKASHI)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30322770
 - (2) 研究分担者 ()
研究者番号：
 - (3) 連携研究者 ()

研究者番号：

