

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25112003

研究課題名(和文)精子幹細胞のエピゲノム安定性と発がんとの関係の解析

研究課題名(英文)Analysis of epigenome stability and germ cell tumor formation

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

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 163,000,000円

研究成果の概要(和文):2004年に我々は培養精子幹細胞であるgermline stem(GS)細胞が培養中に自発的に脱分化し、embryonic stem(ES)細胞と同等な多能性幹細胞であるmultipotent GS(mGS)細胞へと変化することを見出した。しかしながら、その効率は極めて低く、分子メカニズムについても不明であった。本研究で我々はGS細胞においてDNAの脱メチル化が起こるとmGS細胞へ変化することを見出した。DNAの脱メチル化は発がん遺伝子Dmrt1の発現低下を引き起こし、これがES細胞の維持に必要なとされるSox2の発現上昇を誘導することでGS細胞が多能性を獲得することがわかった。

研究成果の概要(英文):In 2004, we discovered that cultured spermatogonial stem cells, designated as germline stem (GS) cells, can spontaneously dedifferentiate into embryonic stem (ES) cell-like multipotent GS cells. However, the frequency of conversion was very low and the mechanism underlying this dedifferentiation remained unknown. In this research, we found that DNA demethylation in GS cells induces downregulation of Dmrt1, which is one of the germ cell tumor genes. This Dmrt1 downregulation leads to induce Sox2 gene, which is one of the essential genes involved in the maintenance of ES cells. Our results suggest that epigenetic abnormalities in GS cells are responsible for the acquisition of pluripotency in GS cells.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 がん

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代に遺伝子を伝達するのみならず、奇形腫へ変化することにより様々な種類の体細胞へと分化するユニークな能力を持っている。しかしながら、その**体細胞への発生能力を抑制している分子機構は未解明である**。生殖細胞の腫瘍化に関わる因子の多くが ES 細胞の未分化性制御因子であることから生殖細胞がんの発生と細胞分化能のリプログラミングには密接な関係があると考えられている。例えば、生殖細胞腫瘍で高頻度に重複が見られる 12 番染色体短腕には Nanog, GDF3, EDR1 など ES 細胞で高発現している複数個の遺伝子が局在しており、ES 細胞関連遺伝子群の高発現が生殖細胞腫瘍の発生を促進するのではないかと指摘されている。また、これらの因子は生殖細胞の発生にも重要であることから、**体細胞への発生能力の抑制とリプログラミング・がん化は密接な関係があると予想される**。

しかしながら、生殖細胞腫瘍の実験系は動物実験モデルに限られていることが研究の大きな妨げになっており、そのために腫瘍の発生起源、細胞系譜や分子機構についても詳細な解析は行われていない。また、生殖細胞腫瘍のごく一部が体細胞への分化能力をもつことから、**がんとリプログラミングの違いがどこにあるのかについても未解明である**。

我々のグループは 2003 年に精子幹細胞の長期培養に成功し、この細胞 (GS 細胞) を利用して精子幹細胞の研究を行って来た。この培養系の確立により大量の生殖細胞を調製し、分子生物学・生化学的な解析を行うことが可能になった。また、従来は生殖細胞に遺伝子導入を行うことは極めて困難であったが、GS 細胞の樹立により精子幹細胞の遺伝子操作は比較的容易な技術となった。我々は GS 細胞の自己複製過程の研究で、この細胞がさまざまな種類の生殖細胞がんへと変化することを明らかにしてきた。例えば 2004 年に我々は GS 細胞が奇形腫を作る ES 細胞様の幹細胞である multipotent GS (mGS) 細胞に高頻度で変換することを見いだした (Kanatsu-Shinohara et al. *Cell* 2004)。この mGS 細胞への変換はがん抑制遺伝子である p53 の欠損により促進され、mGS 細胞はその表現型のみならず、キメラ形成能も持つ点で ES 細胞と酷似している。

また 2009 年には GS 細胞の自己複製シグナルの中心にある Ras の活性化型分子を過剰刺激することでセミノーマを生じうることを報告 (Lee et al. *Cell Stem Cell* 2009)、2012 年には H-Ras, c-myc, p53 抑制体などのがん遺伝子を、精巣から採取した濃縮精子幹細胞集団へ遺伝子導入することにより生殖細胞の試験管内形質転換に成功した (Morimoto et al. *Biol Reprod* 2012)。この形質転換細胞はキメラ形成能を持たないが、ES 細胞と類似した形態をもち、生体に移植すると未分化奇形腫を作った。これらの実験の結果、我々は**生殖細胞**

からのがん化プロセスはエピエノム異常と密接な関連があるという仮説を持つに至った。特にインプリンティング遺伝子である H19 は生後に発生する一部のがんを除き、ヒトでもほぼ全例で DNA の脱メチル化が起こっており、インプリンティング遺伝子のメチル化制御は発がんの過程に深く関わる可能性が高いのではないかと考えられる。一方、この発がん誘導法は初代培養の精子幹細胞には有効であるが GS 細胞には適用できなかったことから、**GS 細胞と生体内にある精子幹細胞は精子形成能を持つという点では共通するものの、機能的な差異があることも分かってきた**。これらの研究により従来は生体モデルしかなかった生殖細胞がんの研究を試験管内において行うことがようやく可能となった。

2. 研究の目的

そこで本研究では申請者はこれらの**インプリンティング遺伝子の制御異常が精子幹細胞の体細胞への分化能力の脱抑制を引き起こし、リプログラミング・生殖細胞の腫瘍化を引き起こすのではないかと仮説を立てた**。より具体的には GS 細胞のがん化・リプログラミングに関与しうるエピジェネティック因子群を機能的にスクリーニングを行い、マイクロアレイや次世代シーケンサーを駆使し、最終的に**1) どのように生殖細胞が体細胞への発生能力を抑制しつつ未分化性を維持するのか、2) リプログラミングとがんの違いはどこにあるのかを明らかにしたい**。更にその知識に基づき、**3) GS 細胞のリプログラミングの人為操作を目指す**。

3. 研究の方法

本研究ではがん幹細胞の前駆細胞である p53 欠損 GS 細胞を用いた機能的スクリーニング、GS 細胞と精子幹細胞の違いの解析、精子幹細胞からのリプログラミング制御を行うストラテジーの開発を目指す。

(1) p53 欠損 GS 細胞を用いたがん遺伝子・エピジェネティック因子のスクリーニング

これまでの我々の研究において、p53 欠損マウスから樹立された GS 細胞は高頻度で mGS 細胞へと変化することを見いだしている (Kanatsu-Shinohara et al. *Cell* 2004)。しかしながら、多能性幹細胞への変化は偶発的なものであり、この細胞を精巣内に移植すると精子形成を行い、p53 の欠損はリプログラミングを起こすための十分条件ではない。その意味では、p53 欠損 GS 細胞は試験管内では正常の表現型を示すが、外来性の自己複製因子を添加せずとも増殖する“前がん幹細胞”状態にある。そこで、この実験系を利用して、これまでヒト全ゲノム相関解析の結果得られた生殖細胞がん関連分子 (例えば KITL,

ATF71P, DMRT1, TERT など) とエピジェネティック因子群 (ヒストン修飾酵素、DNA メチル化酵素、ポリコーム関連因子、Piwi-interacting 因子、microRNA 経路を含む) を候補として、これらの遺伝子の発現異常を誘導する。即ち、生殖細胞がんで増強が見られる場合は、遺伝子ノックダウンを行い、発現低下が見られる場合は過剰発現を行う。遺伝子導入された細胞は未分化細胞特異的分子である Nanog の発現と軟寒天コロニー形成法をアッセイとして、候補遺伝子のがん化活性をスクリーニングする。

(2) p53 欠損 GS 細胞のリプログラミングを促進する小分子化合物のスクリーニング

本実験では小分子化合物ライブラリーを用いて GS 細胞のエピゲノムに影響する化合物を同定する。1) の実験では特定の分子群についてターゲットを定めてスクリーニングを行うが、外来遺伝子の発現が体細胞よりも抑制されている GS 細胞では、ウイルス発現ライブラリーを用いた規模のスクリーニングを行うのは困難である。そこで、本プロジェクトでは理研・吉田稔グループとの共同研究により 3 万個の小分子化合物を用いたスクリーニングを行う。この実験では大量のサンプルを小規模の培養系で試験するために、効率のよい実験系を構築する必要がある。そこで Nanog リポーターマウスから樹立された GS 細胞に p53 抑制体遺伝子を導入し、リプログラミング効率が亢進している GS 細胞を樹立する。次にこの細胞を 96 穴プレートにプレATINGし、UV 照射下で Nanog レポーター由来の GFP の発現を誘導する化合物をスクリーニングする。最終的な機能の確認には、軟寒天コロニー形成法をアッセイとし形質転換・マウスキメラ作成能を誘導する分子を同定する。

(3) 精子幹細胞と GS 細胞の機能的差異の原因の解明

①全ゲノム DNA メチル化解析とエピゲノム動態の解析

野生型 GS 細胞は初代培養の精子幹細胞と異なり、がん遺伝子や Yamanaka 因子を導入しても形質転換した細胞へと変化することがないことから、GS 細胞の樹立の過程においてエピジェネティックな変化が起こっていることが予想される。実際、GS 細胞と生体内にある精子幹細胞では Sox2 のメチル化パターンが異なっていることが他のグループから指摘されている。本研究では我々がこれまでに確立した精子幹細胞の濃縮プロトコルを利用して、精巣から直接分離した精原細胞と GS 細胞およびリプログラミングを起こした GS 細胞の 3 種類の細胞の DNA メチル化プロファイルを全ゲノムレベルで決定する。違いが見られた遺伝子については、レ

ンチウイルスを用いてそれぞれのタイプの細胞へ遺伝子導入を行い、その機能への影響を精巣への移植およびメチルセルロースコロニー形成能によりアッセイを行う。1) により同定したエピジェネティック因子については、時系列で網羅的マイクロアレイ・Chip シークエンス解析を行い、その発現変動に類似した変化を起こすエピジェネティックマークを検索する。

②精子幹細胞における DNA メチル化酵素の役割の解明

GS 細胞と精子幹細胞の DNA メチル化の違いがあることやその形質転換に対する感受性の違いを鑑みると、生体内における精子幹細胞における DNA メチル化酵素の役割を検討する必要がある。精子幹細胞で特異的に遺伝子破壊を行うことができる Cre 発現マウスは存在しないため、精巣より回収した幹細胞を Cre を発現するアデノウイルスを感染させ、別個体の不妊マウスに移植することにより、精子形成に対する影響を解析する。

③精子幹細胞のエピゲノム操作によるリプログラミング・分化制御系の開発

我々は種々のエピジェネティック因子 (例えば Ring1, Ezh2, Dicer, H3K9 メチル酵素である G9a, GLP など) に対する short hairpin RNA を作成しており、これらを発現するレンチウイルスを精子幹細胞の形質転換時に同時に発現させ定量的にコロニーカウントを行うことにより、精子幹細胞のリプログラミングを制御する分子を同定する。shRNA を用いたスクリーニングで同定された遺伝子についてはノックアウトマウスを用いた解析を行い、その結果を再確認すると共にアデノウイルスを用いて精子幹細胞において conditional に該当遺伝子を欠損させ精子形成への影響を解析する。形質転換を抑制する遺伝子を同定することができた場合には、これまでに我々が構築したレンチウイルスによる発現誘導・抑制系を用いて、これらのエピゲノム制御因子を操作し精子幹細胞の分化・脱分化を自在に操作する実験系の確立を目指す。

4. 研究成果

我々はがん抑制遺伝子である p53 と DNA のメチル化維持酵素である Dnmt1 を同時の抑制すると GS 細胞から mGS 細胞を誘導することができることを見出した。Dnmt1 の抑制はグローバルな DNA 脱メチル化を引き起こし、遺伝子導入された GS 細胞はほぼ前例で mGS 細胞へと変化した。P53 と Dnmt1 遺伝子の抑制は体細胞でも発がんを誘導することから、我々はこの処置が生殖細胞の発がん遺伝子の発現上昇を誘導しているのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、ヒト生殖細胞関連遺伝子を候補としてその発現異常を誘

導し、多能性細胞への変化を引き起こす遺伝子をスクリーニングしたところ、Dmrt1 遺伝子を抑制した場合に GS 細胞の脱分化を誘導できることがわかった。Dmrt1 遺伝子は性決定と同時に減数分裂制御にも関与する遺伝子として知られていたが、GS 細胞においては多能性幹細胞で発現する Sox2 遺伝子の mRNA の発現を抑制していることが明らかとなった。Sox2 は ES 細胞の多能性維持に極めて重要な遺伝子であることから、Dmrt1 により Sox2 が抑制されていることにより GS 細胞の脱分化が抑制されていることが予想された。そこで GS 細胞において p53 の抑制と Sox2 の過剰発現を行ったところ、この方法でも GS 細胞から nGS 細胞を誘導することができた。これらの結果は GS 細胞におけるエピゲノムの不安定性が Dmrt1 の発現異常を引き起こし、その結果 Sox2 の発現が上昇することが mGS 細胞の発生の原因となっていることを示唆する。

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 23 件)

- ① Kanatsu-Shinohara M, Naoki H, Shinohara T. Nonrandom contribution of left and right testes to germline transmission from mouse spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction*. 2018, 97, 902-910, doi: 10.1093/biolre/i0x141.
- ② Shinohara T, Kazuki K, Ogonuki N., Morimoto H, Matoba S, Hiramatsu K, Honma K, Suzuki T, Hara T, Ogura A, Oshimura M, Kanatsu-Shinohara M, Kazuki Y. Transfer of a mouse artificial chromosome into spermatogonial stem cells generates transchromosomal mice. *Stem Cell Reports*. 2017, 9, 1180-1191, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.012.
- ③ Kanatsu-Shinohara M, Naoki H, Shinohara T. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. *Dev Cell* 2016, 38, 248-261. doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.011.
- ④ Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Ogonuki N, Ogura A, Morimoto H, Cheng PF, Eisenman RN, Trumpp A, Shinohara T. Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Genes Dev* 2016, 30, 2637-2648. doi: 10.1101/gad.287045.116.
- ⑤ Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Hirose M, Ogura A, Shinohara T. Pluripotent cell

derivateion from male germline cells by suppression of Dmrt1 and Trp53. *J Reprod Dev* 2015, 61, 473-484. doi: 10.1262/jrd.2015-059.

- ⑥ Kanatsu-Shinohara M, Onoyama I, Nakayama KI, Shinohara T. Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, 111, 8826-8831. doi: 10.1073/pnas.1401837111.
- ⑦ Takashima S, Hirose M, Ogonuki N, Ebisuya M, Inoue K, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Nishida E, Ogura A, Shinohara T. Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes Dev* 2013, 27, 1949-1958. doi: 10.1101/gad.220194.113.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 精子幹細胞の遺伝情報パターン、篠原隆司、放射線影響学会、2017/10/26、千葉
- ② Myc-mediated glycolysis enhances spermatogonial stem cell self-renewal, 篠原隆司、第 15 回 幹細胞シンポジウム、2017/05/26、東京。
- ③ Fertility and spermatogonial stem cells, 篠原隆司、American Society of Andrology 2017 42nd Annual conference, 2018/4/24、米国マイアミ。
- ④ Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal, 篠原隆司、American Society of Andrology 2017 42nd Annual conference, 2014/9/2、英国エジンバラ

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：雄性生殖細胞またはセルトリ細胞にポリヌクレオチドを導入する方法
 発明者：篠原隆司、渡邊哲史
 権利者：京都大学
 種類：特願
 番号：20176-092384
 出願年月日：2017年5月8日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 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

http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen/research_summary.html

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：

(4) 研究協力者

()