

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06864

研究課題名(和文)精子幹細胞の低下した精子形成能力を回復させる技術の開発

研究課題名(英文)Development of a technique to recover the decreased ability of spermatogenesis

研究代表者

鈴木 伸之介(Suzuki, Shinnosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・基礎科学特別研究員

研究者番号：00755994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体外で精子形成能力を維持しながら培養が可能な精子幹細胞(GS細胞)に着目し、GS細胞と精子形成能力を失ったdGS細胞(defective GS細胞)において遺伝子発現量の変化のある遺伝子に着目し解析を行った。しかしながら、複数の遺伝子の発現を単独で回復させたのみでは、精子形成能力が回復しなかった。また、遺伝子発現が減少している遺伝子の中には遺伝子座が複数あり、正常GS細胞における遺伝子機能解析を行うことが難しかったため、遺伝子編集技術であるCRISPR/Cas9システムを応用し、複数遺伝子の遺伝子発現を制御できる系の開発へ繋がった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on the differential expression patterns between germ line stem cells (GSCs) and defective GSCs (dGSCs), but I can not find a core factor of keeping the spermatogenic ability. On the other hand, I try to establish a new technique to regulate the multiple gene expression using modified genome editing technologies, CRISPR/Cas9 system, because the genes which expression are dramatically reduced in dGS cells compared to GS cells have the multiple loci and its function analysis is difficult.

研究分野：生殖細胞

キーワード：精子形成

## 1. 研究開始当初の背景

個体への環境ストレスや個体の老化により、精巣の精子形成能力は低下し不妊となる。しかし、精巣細胞のうち精子幹細胞は0.02-0.03%の割合でしか存在しないために、詳細な解析は非常に困難であり、精巣内で精子幹細胞がどのようなメカニズムにより精子形成能力を維持しているかは、十分に理解されていない。2003年に京都大学・篠原隆司教授らのグループにより、精子形成能力を維持しながら生体外で培養できる精子幹細胞(GS細胞、Germline stem cells)が株化された。このGS細胞は、精巣内で精子幹細胞がどのように精子形成能力を維持しているかを生体外で明らかにできるだけではなく、遺伝子改変をしたGS細胞を精巣に移植することにより、簡便に遺伝子改変動物を作出することもできる大変優れた細胞である。GS細胞の培養過程もしくは樹立過程において精子形成能力を失った細胞(以下dGS細胞; defective GS細胞)が生じる。このdGS細胞の形態はGS細胞と同一であるにも関わらず、精子形成能力に違いが生じる。そこで申請者は、GS細胞とdGS細胞を遺伝子発現量およびエピジェネティックな変化の観点において解析し、それぞれの細胞の違いを明らかにすることは、GS細胞の精子形成能力を維持するメカニズムを解明する手助けになるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体外で精子形成能力を維持しながら培養が可能な精子幹細胞(GS細胞)に着目し、GS細胞と精子形成能力を失ったdGS細胞(defective GS細胞)を遺伝子発現量の変化およびエピジェネティックな変化の観点において解析することにより、精子形成能力を維持するメカニズムを解明する。最終的

には生体外で得られた結果を個体へと応用し、精子形成能力が低下した個体において精子形成能力を回復させる。

## 3. 研究の方法

GS細胞とdGS細胞の遺伝子発現パターンを評価し、129遺伝子が有意に減少していることを確認した。これらの遺伝子を解析候補遺伝子とし、1遺伝子毎にdGS細胞で過剰発現させ、精子形成能を確認した。また、同時に正常GS細胞で遺伝子欠損させ、遺伝子の機能解析を試みた。

## 4. 研究成果

### GS細胞への遺伝子導入方法の検討

GS細胞へ遺伝子導入を行う場合、レンチウイルスを用いた遺伝子導入は容易に行うことが出来たものの、エレクトロポレーションやトランスフェクションといったウイルスを用いない遺伝子導入は非常に困難であった。また、候補遺伝子の多くは遺伝子座を複数持っており、通常の遺伝子欠損では解析が困難であったため、ゲノム編集技術のCRISPR/Cas9システムを応用し、複数遺伝子の発現制御を行うことが出来る技術開発も行った。

### 解析候補遺伝子の過剰発現および精子形成能への影響

dGS細胞において、解析候補遺伝子を過剰発現するDNAをレンチウイルスによって導入し、1遺伝子毎にその遺伝子発現を回復させた。このdGS細胞とGS細胞の遺伝子発現パターンを比較したところ、GS細胞と同様な遺伝子発現パターンを示す解析候補過剰発現dGS細胞は確認されなかった。精子形成能について

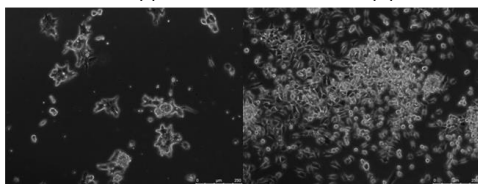
は現在確認中である。

近年 CRISPR/Cas9 システムはゲノム編集技術として着目を浴びており、目的遺伝子の配列 20bp をもつガイド RNA (gRNA) を設計すれば、簡単に目的遺伝子を欠損できるが、遺伝子導入の困難な細胞を使用する場合や非常に多くの遺伝子を同時に欠損させる場合には現状方法では困難である。そこで、本研究ではこの技術を応用することにより複数遺伝子の遺伝子発現を抑制のみならず、活性化させる技術開発も行った。

#### 複数遺伝子の発現制御技術の開発

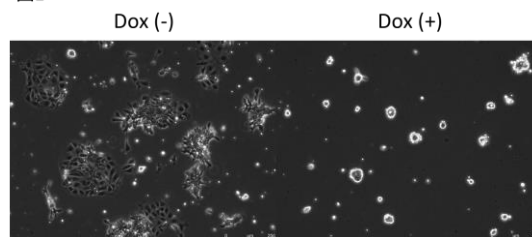
dCas9-VP160 (CRISPRa-ES 細胞) もしくは dCas9-KRAB (CRISPRi-ES 細胞) をもつ 2 種類の ES 細胞を樹立した。CRISPRa-ES 細胞へ Gata6 gRNA を導入し Gata6 を活性化すると、胚体外内胚葉へと分化誘導することができ (図 1)、胚体外内胚葉マーカーである Gata4、Sox7、Sox17、Foxa2、Dab2 が発現していることも確認された。

図1 Dox (-) Dox (+)



一方、CRISPRi-ES 細胞へ Gsk3a、Gsk3b および Erk2 の gRNA を導入した細胞を、LIF 非存在下で 4 日間培養しても、2i 条件下で培養したナイーブ型のマウス ES 細胞に類似した特徴的なコロニー形態を維持できた。

図2



このように遺伝子発現の活性化もしくは抑制化を単独に行うことはできた。しかし、遺伝子発現の活性化と抑制を同時に行うことは現在改良中である。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. Shinnosuke Suzuki、Kuniya Abe、Development of technology for activation and repression of multiple genes in the same cell using defective CRISPR/Cas9 system、RIKEN Epigenetics 2017、理研 BRC、2017 年 2 月 16 日～17 日

2. 鈴木伸之介、阿部訓也、Germline Stem (GS) 細胞における複数遺伝子の高効率機能解析技術の開発、第 109 回日本繁殖生物学会、麻布大学、2016 年 9 月 11 日～15 日

3. 鈴木伸之介、池田理恵子、浦大樹、佐藤卓也、小川毅彦、阿部訓也、Germline Stem (GS) 細胞の精子形成能獲得に必要な遺伝子の探索、第 108 回日本繁殖生物学会、宮崎大学、2015 年 9 月 17 日～20 日

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 伸之介 (Suzuki Shinnosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソ  
ースセンター・基礎科学特別研究員

研究者番号：00755994

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：