

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14362

研究課題名(和文) 始原生殖細胞を用いた発生工学技術の開発

研究課題名(英文) Genetic engineering of primordial germ cells for germline modification

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞は個体の遺伝子改変で広く使われる細胞であるが、マウス以外の動物種には適用できないという問題がある。この問題を解決するために、我々は胎児期の生殖細胞である始原生殖細胞(PGC)に注目した。PGCは強力な増殖能を持ち、将来精子や卵子へと発生する能力を併せ持つことから発生工学の魅力的な標的であることから、本研究ではPGCの培養系を確立することを目標とした。合計約3000個の化合物もしくはサイトカインを用いてPGCの増殖刺激を示す実験系条件設定を行ったところ、PGCの増殖像を確認することができた。しかしながら、増殖したPGCから精子形成を誘導することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem cells are widely used for germline modification. However, this technique is mostly limited to mice and such technology has not been applied to other animal species. To overcome this problem, we focused on primordial germ cells (PGCs). Because PGCs can proliferate very actively in vivo and can differentiate into sperm and oocytes, they represent an attractive target for germline modification. Therefore, we focused on the development of a long-term culture system for mouse PGCs. Although we were not able to find any positive results using gene transfection, 12 small chemicals induced proliferation of PGCs by screening > 3,000 chemical compounds. Of these, 5 chemicals were able to support PGCs for at least 2 months. We transplanted the cultured PGCs into the seminiferous tubules of infertile mice. However, we were not able to find any germ cell colonies. These results suggested that the candidate chemicals are not suitable for sustaining functionally active PGCs.

研究分野：生殖生物学

キーワード：始原生殖細胞 精子形成 卵子形成

## 1. 研究開始当初の背景

ES細胞は個体の遺伝子改変で広く使われる細胞であるが、ES細胞を用いた発生工学はほぼマウスに限られているという問題がある。近年、CRISPR-Cas9系を受精卵で用いた遺伝子改変が登場したものの、モザイク胚を生じることと、非特異的な標的遺伝子を破壊するオフターゲット効果が問題となっている。正確な遺伝子改変を行うには将来配偶子となる幹細胞を試験管で増殖させる系の確立は依然として重要な課題である。

胎児期の生殖細胞である **primordial germ cells (PGC)** は胎生期 7.25 日目に尿膜基部に発生し、その後活発に増殖しながら、腸管を経て生殖巣へと移動していく(右図)。雄の PGC はその後も 15 日頃まで増殖し、雌の PGC は 13 日頃から減数分裂に入りその数は増加しないが、その前の発生段階では雄と同様に活発に増殖している。PGC は強力な増殖能を持ち、将来精子や卵子へと発生する能力を併せ持つことから ES 細胞に勝るとも劣らない発生工学の魅力的な標的であるが、PGC を用いた個体遺伝子改変系は確立していない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では PGC の培養系を確立することを目標とした。PGC を培養し、遺伝子導入を行い、適当な目的遺伝子を改変したのちに個体作成を行えば、ES 細胞と同様に個体レベルの遺伝子改変技術となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 精子幹細胞無血清培地による PGC 培養系の確立

PGC は多能性分子マーカーである Oct4 を強く発現することが知られている。この Oct4 プロモーター下に EGFP を発現するトランスジェニックマウスは既に研究室に導入されている。雌雄の決定は Sry の発現を RT-PCR により確認し、生殖巣を回収し、PGC を Oct4 依存性に発現する EGFP を指標にしてセルソーティングにより回収する。

申請者が最近開発した GS 細胞培養用の培地は、ラミニン上での精子幹細胞の長期培養を可能とするのみでなく、その前駆細胞である Prospermatogonia についてもその生存を促進することが確認された。この培養系を PGC に適用するに当たり、以下の点に注目して改変を試みる。

#### ① フィーダーの有無

申請者の以前に発表した論文において、胎児期の PGC も生後の精巣内に移植すると生着し、精子形成を起こすことが知られることから、今回の PGC の培養においては、フィーダーフリー培養を試すと共に、最近開発したセルト

リ細胞との共培養も試みる (Cell Stem Cell 2012; 11:567))。セルトリ細胞は EGF, FGF2, FGF9 を添加した無血清培地で培養し、FSH をさらに追加することでニッシュとしての機能を増強することができた。この培養系を用いて PGC の増殖因子を添加し長期培養を試みる。

#### ② 基質の性質

PGC の接着性は発生段階により異なることが知られている。これまでに報告した精子幹細胞についてはラミニンに接着性が高いので、ラミニンが無血清培養に用いることで長期培養が可能となった。しかしながら、PGC については同様の基質が適当であるとは限らない。そこで、ファイブロネクチン、I 型および IV 型コラーゲン、マトリゲルなどの異なった細胞外基質を用いて培養を行う。

#### ③ (4) 増殖因子・小分子化合物

PGC の生存を促進する増殖因子は全て明らかになっていないが、Steel 因子、BMP, FGF2, LIF などはその生存を促進することが知られている。これらの因子を添加すると共に、既に知られている増殖因子受容体の発現を RT-PCR にて解析し、そのリガンドを加えることで増殖・生存の改善を試みる。増殖因子に加えて、PGC の生存を促す小分子化合物を 96 穴プレートを用いて自動スクリーニングを行う。現在のところ、Selleck chemical (476 個)、calbiochem (65 個) もしくは Prestwick 社 (1120 個) 由来のケミカルライブラリーを用いてスクリーニングを行う。

### (2) cDNA 強制発現および遺伝子ノックダウンによる PGC の増殖誘導

これまで体細胞については細胞株を得るために SV40, polyoma large T 抗原などが遺伝子の遺伝子導入が行われてきた。生後の精原細胞についても SV40 を用いて細胞株が得られているが、PGC についてはこれらの方法によって細胞株が得られたという報告はない。これは一つには遺伝子導入効率が悪かったことが原因として考えられる。最近の研究によれば PGC が生体内で増殖停止を起こす際には Rb 遺伝子が活性化されると共に p21 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) の発現が上昇することがわかってきている。そこで Rb や p21 を抑制できる分子を利用することにより PGC の増殖停止を回避して細胞株を作成することができると期待される。

具体的には、Rb を抑制することができると知られている SV40 large T 遺伝子もしくは

はパピローマウイルス由来 E7 の cDNA を発現するレンチウイルスを作成し、これを回収したばかりの PGC に発現させることにより PGC の増殖誘導を試みる。これに加えて Rb もしくは p21 CDKI のノックダウンベクターも用いて Rb の発現レベルを制御することで PGC の増殖刺激を行う。もし、増殖が誘導できるのであれば、テトラサイクリン (Tet-on) による誘導発現系により自在に増殖誘導ができるような PGC 株を作成する (これは遺伝子導入により得られた細胞株の場合はその発現をオフにした後に細胞分化誘導を行い、分化に対する影響を回避するためである)。

### (3) 長期培養を行った PGC の表現型解析

培養された PGC については、生殖細胞マーカー (例えば nanos2, vasa など) を RT-PCR もしくは flow cytometry により発現解析を行う。さらに核型の異常の有無を確認すると共に、bisulfite シークエンシングにより H19 などのインプリンティング遺伝子の differentially methylated region の DNA メチル化パターン解析やクロマチン沈降法による同部位のヒストン修飾パターンなどの解析を行う。可能な限り、培養した PGC の表現型を生体から取り出したものと比較検討し、本来の PGC の性質がどのくらい保持されているのかについて検討を行う。

### (4) 精細管内への移植による機能解析と遺伝子導入

長期培養により精子形成能力が失われているか否かを調べるために、培養細胞は精細管内に移植を行い、精子形成能の有無を判定する。

胎生期の PGC は生後間もない 5-10 日齢の不妊マウスへと移植を行うことで精子形成を再開することを申請者は以前に報告している (Development 2005; 132: 117)。具体的には c-kit チロシンキナーゼの変異マウスである WBB6F1-W/W<sup>v</sup> mice を氷上において麻醉し、輸精管から細胞を導入する。このときにドナー細胞にレンチウイルスを用いた CRISPR-Cas9 システムによりチロシンキナーゼ遺伝子の破壊を試みる。もし正常な精子が得られた場合には顕微授精を行うことで PGC 由来の産仔の作成を行う。

### (5) 卵巣細胞との再構成による機能解析と遺伝子導入

卵子については的場らの方法に従い (Biol. Reprod. 2011; 84: 631)、胎児由来の卵巣をバラバラにして回収し、メンブレンフィルター上で PGC と共培養し、凝集塊を作成する。このときにドナー細胞にレンチウイルスを用いた CRISPR-Cas9 システムによりチロシンキナーゼ遺伝子の破壊を試みる。翌日にこの凝集塊を成熟した雌の卵巣皮膜

下へと移植を行う。移植卵巣は 2-3 ヶ月後に回収し、follicle として培養を行う。成熟した卵子細胞が得られた場合には、EGFP の発現によりドナー細胞由来の卵子を確認し、野生型の精子を PGC 由来の卵子にマイクロインジェクションを行う。正常発生した胚を別個体の仮親の子宮内へと移植することで子孫形成能を判定する。

### 4. 研究成果

遺伝子操作による増殖誘導では PGC の増殖を誘導することができなかったが、それと並行して研究代表者は合計約 3000 個の化合物もしくはサイトカインを用いて PGC の増殖刺激を示す実験系条件設定を行ったところ、PGC の増殖像を確認することができた。このうち、2 個については多能性幹細胞への変化を促すものであり、この細胞を用いて遺伝子欠損を行うことに成功した。残り 10 個については一定の期間は増殖刺激を行うことができたが、長期に渡る培養は困難であった。これは細胞培地に含まれていた若干量の血清が原因であることが無血清培地との比較実験より明らかになった。無血清培養により 5 個の分子については血清を含んだ培地で培養したときと同様に一過性の増殖のみを示すものであった。しかしながら、残った 5 個については 2 ヶ月以上に渡り培養することが可能であった。PCR を用いて性別を確認したところ、全ての培養で増殖してきたのは雄由来の細胞であった。雌由来の細胞については増殖像を認めることができなかった。

そこで、この細胞から子孫を作成することができるか否かを確認する目的で、不妊マウスの精巣内への移植実験を行った。この実験では先天的に生殖細胞を欠損している Kit 変異体マウス (WBB6F1-W/W<sup>v</sup> マウス; 以下 W マウスとして省略) をホストマウスとして用いた。W マウスが 5-10 日齢の幼若な時期に培養を行った細胞を、それぞれの分子に対して 3 匹以上のホストマウスを用いてマイクロインジェクションを行った。移植後 2 ヶ月後にこのホストマウスを屠殺し、その精巣を回収し、切片を作成し解析したが、いずれのホストマウスの精巣にも精子を認めることができなかった。この実験では精子形成が成功しなかったため、培養細胞には精子幹細胞活性が存在しないことが明らかになった。

### 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 2 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/iox141.
- 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 transchromosomic mice. *Stem Cell Reports*. 2017, 9, 1180-1191, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.012.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 精子幹細胞の遺伝情報パターン、口頭、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, 口頭、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, 口頭、篠原隆司、American Society of Andrology 2017 42nd Annual conference, 2018/4/24, 米国マイアミ.

[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

[その他]

ホームページ等  
[http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen/research\\_summary.html](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

森本 裕子 (MORIMOTO, Hiroko)

京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90540097

### (4) 研究協力者

( )