

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 29 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究 B
 研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度
 課題番号：22380150
 研究課題名（和文） 家畜精巣由来の生殖幹細胞培養と生殖細胞への分化制御に関する研究

研究課題名（英文） Long term culture and regulation of differentiation of germ cells from the testis in domestic species.

研究代表者 今井 裕（IMAI HIROSHI）
 京都大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：10303869

研究成果の概要（和文）：

ウシ精巣に由来する前精原幹細胞の性質と体外での長期培養について検討した。本研究によって、ウシの前精原幹細胞は、無血清培地でポリ L リシンを細胞接着基質とする培養条件下で 2 カ月以上にわたってコロニーの増殖と生存性を維持することが可能になった。また、これらのコロニーは、多能性分化能と精原幹細胞としての性質を併せ持っていた。長期培養用培地に成長因子を添加して培養すると、減数分裂直前の精母細胞に分化させることができた。

研究成果の概要（英文）：

A long-term culture of male primitive germ cells from bovine testis has been examined. Bovine primitive germ cells can proliferate and survive in culture for over 2 months in the condition with serum-free components and on poly-L-lysine-coated dish. The resulting cell colonies have both pluripotent and stem cell potent characteristics. After culture of cells in the presence of growth factors, cells are differentiated into spermatogonia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
23 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
24 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：発生工学・生殖幹細胞

1. 研究開始当初の背景

精巣に由来する幹細胞を体外に取り出し、短期間の培養後、再度精巣に戻して精子形成を促す試みは、マウスを用いた Brinster と Zimmermann の先駆的な研究がある。最近では、これらの幹細胞から、マウス精巣への移植に

よって精子形成が可能な Germ Stem (GS) 細胞や Embryonic Stem (ES) 細胞のように個体の再構築が可能な細胞株の作製もマウスで報告されている。さらに、最近になってヒト精巣からも生殖幹細胞株の作出が報告されている。このことから、多能性幹細胞は未分

化な初期胚からだけでなく、生体内に存在する体性幹細胞からも作製できることが明らかとなってきた。

一方、マウス以外の動物、特に家畜においては、改良・増殖などの産業応用としてES細胞株の樹立がこれまで数多く試みられてきた。しかし、マウスとは異なり、個体への再構築が可能な多能性幹細胞の樹立にはいっていない。なぜマウス以外の動物種でそのような幹細胞株が樹立できないのかは明らかではないが、細胞分化の進行や多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現時期が動物種によって大きく異なっていることから、ES細胞の樹立に適した細胞はマウスとは異なった発生時期に存在する可能性がある。例えば、生殖細胞として知られている始原生殖細胞は、将来精子や卵子の形成に関与する。マウスでは、この始原生殖細胞からも、ES細胞に類似した性質を持つEG細胞が樹立されている。さらに、前述したように、精子幹細胞からもES細胞と同様の細胞が樹立されるなど、少なくともマウスでは個体形成に関与する幹細胞株が樹立されるルートはいくつかある。このことから、家畜における幹細胞株の作出にも、ES細胞の起源となる初期胚以外にも幹細胞株樹立のルートが存在すると思われる。そこで、ブタの精巣から幹細胞を分離することから始めた。しかし、マウスの幹細胞を認識する抗体は、ブタの精巣由来の幹細胞を認識しなかった。そこで、ブタ幹細胞を認識するマーカーを検索し、細胞表面糖鎖を認識するレクチンDBAが、ブタ精巣由来の幹細胞を特異的に認識することを見出した。幹細胞の分離は、パーコールによる密度濃度勾配遠心法によって、約70-80%の精製度で幹細胞を集めることができた。これらの細胞を体外の培養液で培養したところ、数週間にわたってDBAに対してポジティブな

活性を持つ細胞が得られた。さらに、ブタ精巣より単離した前精原幹細胞を、あらかじめ精巣の幹細胞を欠損させたヌードマウスの精巣内に導入すると、細胞は精巣の底部に定着し、増殖した。一方、分離精製した幹細胞を体外で数週間培養した後、細胞をヌードマウス精巣に注入すると、ガン細胞のように精細管の外側に細胞は浸潤した。これらの細胞は多能性マーカー遺伝子やタンパク質を発現していることから、精子細胞への分化を決定づけられた細胞が、体外で多能性幹細胞へリプログラムされていると考えられた。そこで、今後検討すべきことは、これらの幹細胞を体外で多能性細胞株として株化できるような培養条件を検討するとともに、体内や体外で精子形成を分化制御できる培養系を作り出し、最終的にはそれらの細胞から体外受精や顕微授精システムを使って、個体生産が可能な技術を開発することである。

2. 研究の目的

これまでに、ブタの精巣から幹細胞を分離・精製し、これらの細胞を体外で培養することによって、体外で幹細胞としての性質を維持しながら数週間増殖可能なことを明らかにした。さらに、精巣由来の幹細胞である、前精原幹細胞 (Gonocyte) を特異的に識別する細胞表面マーカー (レクチンの一種で細胞表面糖鎖を認識するレクチン (*Dolichos biflorus agglutinin*; DBA) を、家畜で初めて見出した。このマーカーを利用することによって、精巣から前精原幹細胞を識別し、この幹細胞から体外培養によって精子形成や個体形成が可能な幹細胞株樹立への道を開くことができた。本研究は、上記の成果をもとに、ブタおよびウシ精巣由来幹細胞から無限増殖が可能な細胞株を樹立するとともに、樹立した細胞からの個体構築能の検討、ヌー

ドマウス精巣へ移植後の精子形成の可能性、体外での精子細胞への分化誘導能について検討する。

3. 研究の方法

ブタ（生後2日から3週令）およびウシ（生後1週齢、3ヶ月—6カ月齢および1歳以上の成熟個体）精巣から前精原幹細胞を採取した。採取した精巣を細片し、コラゲナーゼとDNase Iを含むDMMEM/F12培地で培養することにより精巣由来の細胞を分散させた。得られた細胞浮遊液は、まず40および80 μ m径のナイロンメッシュによってろ過し、大きな組織断片を排除した。さらに、20-60%濃度のパーコール密度濃度勾配法で遠心分離することによって、40%と50%の細胞画分に前精原幹細胞（gonocyte）が存在していた。この方法による、幹細胞の精製度は約40%であった。

上記の方法によって回収した前精原幹細胞を含む精巣由来の細胞は、 2×10^5 cells/mlの濃度で培養皿に播種した。用いた培養液は、DMEM/F12培地を基本とした培養液中で培養するが、実験によっては、種々の濃度の血清あるいは無血清培養液（KSR）、bFGF、GDNFあるいはEGFなどの成長因子を添加した。培養は、炭酸ガス培養装置内で、5%CO₂と95%空気の37°Cの湿潤条件下で行った。細胞培養後、培養液は、一日おきに交換し、培養皿内に出現したコロニーは、7-10日おきに、トリプシンとEDTA溶液で細胞を分散するか、鋭利なガラスピペットの先端で物理的に小細胞塊にすることによって継代を繰り返した。

細胞を培養するための細胞接着基質として、ジェラチン、ラミニン、ポリLリシンおよびレクチンDBAを用い、これらの溶液であらかじめコートした培養皿を用いて、これらの細胞外基質が前精原幹細胞の増殖・生存性

に及ぼす影響について検討した。

体外および精巣内の前精原幹細胞の性質を特定するために、以下のような特異抗体を用いて免疫組織染色を行った。まず、精原幹細胞の特異的マーカーとして、レクチンDBA、UCHL-1およびDDX4抗体、多能性幹細胞マーカーとして、OCT3/4、NANOG、E-CADHERINに対する特異抗体を用いた。出生直後から生体の精巣における精原幹細胞の同定や体外で種々の期間培養した前精原幹細胞の細胞生物学的特性の検定に用いた。上記の幹細胞マーカーの発現は、タンパクレベルだけでなく、遺伝子発現レベルでも確認した。また、長期培養後の前精原幹細胞の多能性分化能を検討するために、浮遊培養により胚様体を形成させ、その細胞群における細胞の分化を三胚様性分化細胞特異抗体によって検出した。

体外培養後に得た幹細胞株の精子幹細胞として、あるいは多能性幹細胞としての特性を明らかにするために、体外培養後の幹細胞を免疫不全マウス（B6F1Nude）の精細管に注入した。免疫不全マウスは、あらかじめ精子形成を抑制するためにブスルファンを4週間にわたって投与した。マウス精管内での精原幹細胞の増殖はブタおよびウシ幹細胞に特異的なマーカー（レクチンDBA）を使用することによって確認する。

4. 研究成果

本研究では、ブタやウシ等の大型家畜において、精巣から採取した前精原幹細胞あるいは精原幹細胞の体外での培養系を確立し、長期的な増殖が可能な細胞株を樹立するとともに、精子細胞への分化を誘導しうる培養条件について検討した。

新生仔精巣および性成熟後の精巣よりそれぞれ前精原幹細胞および精原幹細胞を分離し体外培養を行ったところ、少なくともウシの

場合、前者では1カ月以上にわたって、継代培養が可能な細胞株が得られるのに対して、後者では、培養後1週間で細胞は増殖を停止した。1か月以上の長期培養に成功した細胞株は、精巣内に移植することによって精細管基底部分で細胞増殖することが明らかとなり、少なくとも幹細胞としての機能を保持していることを示した。

前精原幹細胞は、出生直後は精細管の中央に位置し、細胞表面には、レクチンの一種であるDBAによって認識される細胞表面糖鎖 N-acetylgalactosamine (GalNAc) を発現している。しかし、この糖鎖の精巣内での機能については明らかになっていない。GalNAcの発現をDBAを指標にして、出生後から性成熟期にわたって精巣組織切片上で観察すると、生殖幹細胞特異的にDBAのシグナルが観察された。このことから、DBAによって認識される糖鎖は、生殖幹細胞の増殖と分化に何らかの役割を果たしていると推察された。そこで、まず、マウスを用いてDBAの発現パターンを詳細に検討したところ、出生直後、前精原幹細胞の細胞表面全体に見られたシグナルは、精原幹細胞への分化にともなって凝集したシグナルへと変化した。しかし、いくつかの前精原幹細胞では、DBAのシグナルは消失していた。DBA以外の生殖幹細胞マーカーと多能性幹細胞マーカーを用いた検討から、前者は前精原幹細胞から直接的に精子形成に向けて細胞分化を進めた幹細胞であり、後者は生涯にわたって精子形成を維持するために精原幹細胞として自己増殖を続ける幹細胞であると考えられた。マウスでは、これまでDBAが認識する糖鎖については知られておらず、今回免疫組織染色法を変えることによって初めてその存在が明らかとなった。また、DBAで認識される糖鎖は、ブタやウシにおいても確認されるとともに、精巣の成熟、前精原細胞の分化にともなっ

て、今回マウスで観察されたものと同様のパターンが認められることから、動物種を超えてGalNAc糖鎖が前精原細胞の増殖と分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

上記の仮説を検証するために、体外の培養条件下におけるウシ Gonocyte における GalNAc の役割を調べるため、GalNAc を認識する DBA あるいはゼラチン、ラミニン、Poly-L-ライシンなどの細胞外基質 (ECM) をコーティングしたディッシュを用いて Gonocyte を培養し、その細胞接着および細胞増殖のパターンを調べ、糖鎖修飾が Gonocyte の長期培養と多能性細胞への誘導におよぼす役割について検討した。その結果、DBA は、Gonocyte の増殖を刺激し、多能性細胞株様のコロニー形成を促した。一方で、DBA は、Gonocyte とともに混在する精巣由来の体細胞に対しては、ディッシュへの接着と増殖への抑制効果を示した。また、種々の ECM で培養した Gonocyte において、多能性に関連するリプログラミング遺伝子 (NANOG、POU5F1、SOX2、c-MYC および REX1) と生殖細胞特異的な遺伝子 (UCHL-1) の発現パターンを調べた。その結果、DBA あるいは他の ECM を基質として培養した場合と比較すると、DBA でコートしたディッシュで培養した細胞は、POU5F1 と UCHL-1 の発現が強く、SOX2、c-MYC および *REX1* などのリプログラミング遺伝子の発現も増加した。以上のように、前精原幹細胞の細胞表面で特異的に発現している糖鎖は、精原幹細胞の細胞分化の過程と密接に関わるとともに、体外での精原幹細胞の自己複製能力、細胞表面の接着分子間の相互作用を調節し、細胞の運命を決定づける重要な分子であることを示した。

ついで、ウシ前精原幹細胞の体外での長期培養と細胞分化誘導に関して検討した。出生直後のウシ精巣から疎精製した前精原幹細胞を Poly-L-Lysin をコートした培養皿で培

養すると、前精原幹細胞が選択的に培養皿上に接着し、増殖とマウス ES 細胞様のコロニー形成が認められた。一方、幹細胞の精製時に混入する精巣由来の体細胞の増殖は抑制された。前精原幹細胞の培養液として、iPS 細胞や ES 細胞などの多能性細胞の培養に多用されている Knock out serum replacement (KSR) を添加した DMEM/F12 培養液に添加して用いたところ、血清を添加した従来の培養液に比べて有意な細胞増殖が認められた。長期的な細胞培養系を確立するために、培養液中に添加する成長因子 (GDNF, FGF, EGF) の影響について検討した。これらの成長因子はいずれも前精原幹細胞の生存性と増殖に有効に作用するが、その中でも GDNF は必須の因子であった。その結果、15% KSR, GDNF および 1% 牛胎児血清を含む DMEM/F12 培養液中で培養することにより、前精原幹細胞から生じたコロニーを 2 カ月以上にわたって継代・培養することが可能になった。このような長期培養は家畜では初めての成果である。得られた細胞株は、遺伝子発現およびタンパク質発現レベルで、多能性幹細胞としての性質を持つだけではなく (OCT3 および c-Myc の発現)、生殖幹細胞としての性質 (UCHL1 および c-KIT の発現) も共有していた。また、体外で胚様体を形成すると同時に、三胚様性の細胞系列に分化することが可能であり、染色体の安定性も保たれていた。一方、得られたコロニーを GDNF, bFGF, EGF を含む DMEM/F12 培地で培養すると、前精原幹細胞は精原幹細胞あるいは減数分裂期にある精母細胞への分化を観察することができ、体外で前精原幹細胞の細胞分化を誘導が可能な培養条件の一部が明らかとなった。

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 8 件)

① Kim SM, Fujihara M, Sahare M, Minami N, Yamada M and Imai H. Effects of extracellular matrices and lectin Dolichos biflorus agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, 査読有、印刷中、2013/06/06 DOI: 10.1071/RD12214

② Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Takahashi A, Hara E, Imai H, Shinkai Y, and Yamashita JK. Protein Kinase A Determines Timing of Early Differentiation through Epigenetic Regulation with G9a. *Cell Stem Cell*, 査読有、10、2012、759-770 DOI: 10.1016/j.stem.2012.02.022.

③ Tsukiyama T., Asano R., Kawaguchi T., Kim N., Yamada M., Minami N., Ohinata Y. and Imai H. Simple and efficient method for generation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible factors and an EOS reporter system. *Genes to Cells*, 査読有、16、2011、815-825 doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01528.x.

④ Fujihara M, Kim SM, Minami N, Yamada M and Imai H. Characterization and in vitro culture of male germ cells from developing bovine testes. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、57、2011、355-364 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21289464>

⑤ Kim SM, Fujihara M, Goel S, Sahare M, Minami N, Yamada M and Imai H. Identification of reprogramming factors associated with a pluripotent potential of porcine and bovine spermatogenic stem cells in culture. *The Proceedings for 16th World Congress on In Vitro Fertilization*, 査読有、2011、41-48 <http://isivf2011.org/jp/>

⑥ Goel S, Mahla RS, Suman SK, Reddy N and Imai H. UCHL-1 protein expression specifically marks spermatogonia in wild bovid testis. *European Journal of Wildlife Research*, 57:, 2011、663-667 DOI 10.1007/s10344-010-0454-1

⑦ Miyamoto K, Nagai K, Kitamura N, Nishikawa T, Ikegami H, Binh NT, Tsukamoto

S, Matsumoto M, Tsukiyama T, Minami N, Yamada M, Ariga H, Miyake M, Kawarasaki T, Matsumoto K, Imai H. Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. The Proceedings of the National Academy of Science USA、査読有、108、2011、7040-7045
DOI: 10.1073/pnas.1013634108.

⑧ Goel S, Reddy N, Mandal S, Fujihara M, Kim SM and Imai H. Spermatogonia-specific proteins expressed in prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia. *Theriogenology*、査読有、74、2010、1221-1232
DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.05.025.

[学会発表] (計9件)

① Sahare M, Kim SM, Otomo A, Komatsu K, Minami N, Yamada M and Imai H. Long term self-renewal and proliferation of bovine male germ stem cells in vitro. *CiRA International Symposium 2013 ~Raising the next generation of stem cell research~*, 11 March- 12 March, Kyoto,, Japan (2013)

② Kim SM, Fujihara M, Goel S, Minami N, Yamada M and Imai H. Glycan epitopes involve in germ cell differentiation during early development of neonatal mice testis. The 4th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction、31 August-2 September、Osaka, Japan (2012)

③ Kim SM, Fujihara M, Sahare M, Minami N, Yamada M and Imai H. The role of GalNAc glycan residues associated adhesion and self-renewal in cultured bovine gonocytes. The 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). 29 July-02 August, Vancouver, Canada, (2012)

④ Kim SM, Fujihara M, Goel S, Minami N, Yamada M and Imai H. Determination of distinct germ cell commitment by the specific affinity of the lectin DBA during early development of gonocytes in neonatal mice testis. *Symposium on Functional Genomics of Early Livestock Development*, 24-26 July, Banff, Canada (2012)

⑤ Fujihara M, Kim SM, Minami N, Yamada M and Imai H. Comparative Changes on Stem

Cell Potential of Bovine Male Germ Cells During Testicular Development from Neonatal to Adult. The 43rd Annual Meeting of the Study of the Society for Reproduction (SSR), 30 July - 3 August, Milwaukee USA, (2010)

⑥ Goel S, Mandal S, Reddy N, Mahara R, Suman S, Raj TA, Fujihara M, Kim SM and Imai H. Stem cells of the male germline: an aid to conservation of endangered species. The 11th International Symposium on Spermatology (ISS), 24-29 June, Okinawa, Japan (2010)

⑦ Kim SM, Fujihara M, Goel S, Minami N, Yamada M and Imai H. Lectin DBA specifically recognizes glycan cell surface epitope of gonocytes in developing mouse testis. The 11th International Symposium on Spermatology (ISS), 24-29 June, Okinawa, Japan (2010)

⑧ Tsukiyama T, Asano R, Minami N, Yamada M and Imai H. Analysis of culture conditions for generation of germ-line competent induced pluripotent stem (iPS) cells in various mammalian species. The 8th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research , San Francisco USA, 16-19 June, (2010)

⑨ 築山智之・今井 裕、家畜ならびに大型実験動物における多能性幹細胞株の樹立と応用、日本生化学会九州支部例会シンポジウム (招待講演)、5月23日、鹿児島市 (2010)

[図書] (計1件)

Goel S. and Imai H. Pluripotent stem cells from testis. "Embryonic Stem Cells - Differentiation and Pluripotent Alternatives"、ed. Michael S. Kallos、InTech Publisher、Rijeka、2011、473-492

[その他]

ホームページ等

<http://www.reprod.kais.kyoto-u.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 裕 (IMAI HIROSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10303869