

平成30年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712026

研究課題名(和文) 幅広い動物種に有効な高効率精子幹細胞維持増幅法の開発

研究課題名(英文) Establishment of an efficient maintenance and expansion system for spermatogonial stem cells from wide variety of animals.

研究代表者

岩森 巨樹 (IWAMORI, Naoki)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：70647362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞の培養法が開発されて約15年が経過したが、齧歯類以外の動物に対してはいまだに効率が悪い。そこで、本研究では進化的に高度に保存されている細胞間架橋の切断による連結精原細胞の断片化を利用して、幅広い動物種に有効な精子幹細胞維持増幅法の開発を目指した。その過程で、細胞間架橋構成因子の解析を進め、連結精原細胞断片化可視化精子幹細胞を作製した。また、連結精原細胞断片化の頻発する生殖細胞特異的ヒストン脱メチル化酵素JMJD3欠損マウスの解析を行い、細胞間架橋切断に関わる分子機構の解析を進めた。その結果、有望な候補となりうる分子機構の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：An efficient culture system for spermatogonial stem cells of animals except for rodent has not been developed, although it is about fifteen years from first establishment of culture system for mouse spermatogonial stem cells. In this study, we have tried to develop an efficient maintenance and expansion for wide variety of animals using fragmentation of spermatogonial cysts by abscission of intercellular bridges which is evolutionarily well conserved from invertebrate to vertebrate. We have generated a spermatogonial stem cells in which fragmentation of spermatogonial cysts is visualized. In addition, molecular mechanisms which could be responsible for abscission of intercellular bridges were analyzed using germ cell specific JMJD3 deficient mice in which fragmentation of spermatogonial cysts was frequently occurred. A prospective molecular mechanisms which could regulate fragmentation of spermatogonial cysts has been identified.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子幹細胞 細胞間架橋 エピジェネティクス JMJD3

1. 研究開始当初の背景

(1) 精子形成は個体のはぼ一生を通じて行われ、その継続性は精子幹細胞の自己複製能力によると考えられる。精子幹細胞は移植先精巣において精子形成を再構築できるだけでなく、マウスでは体外培養法も開発されており、幅広い分野での応用が期待されている。齧歯類以外の動物での効率の良い精子幹細胞培養・増幅法は報告されておらず、齧歯類精子幹細胞の培養においてもごく一部の細胞のみしか精子形成再構築能を保持していないため、さらなる効率のよい培養法開発が待たれている。これまでに精子幹細胞の未分化性維持に関わる様々な因子が明らかにされているにも関わらず、大きな進展は得られていない。

(2) 精子形成過程において、生殖細胞は細胞分裂後、完全に分裂せず、娘細胞同士が細胞間架橋 (Intercellular Bridge: IB) によって繋がれた状態で増殖し、分化を進行させる。これは精子幹細胞を含む精原細胞でも同様であり、種を超えて保存されている。近年の解析から、精子幹細胞は個々の幹細胞が持つ自己複製能だけでなく、IBの切断による連結精原細胞の断片化によっても供給され、集団として維持されることが明らかにされた。

(3) 申請者らはエピジェネティック制御因子 JMJD3 を雄生殖細胞で欠損させると、未分化精原細胞が増加し、成体雄の生殖能力が長期に渡って維持されることを見出した。さらに、JMJD3 欠損生殖細胞では連結精原細胞の断片化が頻繁に見られることから、幹細胞の自己複製よりもむしろ分化精原細胞からの供給が増加することにより、未分化精原細胞が増加したことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では齧歯類以外の幅広い動物種にも適応できる精子幹細胞培養法の基盤となる技術の確立を目的とする。

鍵となるのは精子幹細胞個々の未分化性維持機構の増強と連結精原細胞断片化促進である。IBは精子形成に必須の構造体であり、完全に欠損させると幹細胞以降の増殖が阻害されるため、精子幹細胞の増幅にはIBを維持しつつ、断片化の頻度を上げる必要がある。そこで、連結精原細胞の断片化制御に関わると考えられる。JMJD3を中心としたエピジェネティックネットワークの分子基盤を解明し、断片化の頻度を人為的に操作する技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 連結精原細胞断片化を可視化できるマウスおよび培養精子幹細胞の作製

最新ゲノム編集法 CRISPR/Cas9 システムを用いて受精卵内でゲノム二本鎖に同時に相同組換えを誘導し、未分化精原細胞および

IBを可視化するための遺伝子改変マウスを作成する。具体的には未分化精原細胞のマーカである PLZF および NANOS2 のプロモーター制御下でそれぞれ CFP (青) および GFP (緑) を発現するレポーター、そして IB 形成に必須の TEX14 と mCherry (赤) の融合タンパク質を発現するノックインを作製する。

(2) (1)で作製した PLZF-CFP マウスおよび NANOS2-GFP マウスを生殖細胞特異的 JMJD3 欠損マウスと交配し、可視化された JMJD3 欠損および野生型未分化精子幹細胞を FACS を用いて回収する。回収した精子幹細胞を用いて RNA-seq により、発現遺伝子プロファイルを取得する。

(3) 上記(2)で回収した精子幹細胞について JMJD3 あるいは JMJD3 の標的であるメチル化ヒストン H3 リジン 27 抗体を用いたクロマチン免疫沈降-シークエンス (ChIP-seq) を行い、JMJD3 によりエピジェネティックに制御されている遺伝子群を同定する。

(4) PLZF-CFP:TEX14-mCherry 二重遺伝子改変精子幹細胞を樹立し、連結精原細胞断片化に関わる遺伝子群のスクリーニングの準備を行う。

(5) JMJD3 の下流候補遺伝子のうち、連結精原細胞断片化を促進する遺伝子をスクリーニングし、実際に断片化促進により精子幹細胞集団の維持増幅ができていないか否か、精細管内移植法を用いて精子形成再構築能を調べ、移植細胞中の精子幹細胞の割合を評価する。

4. 研究成果

(1) まず、ゲノム編集法 CRISPR/Cas9 システムを用いて ES 細胞内で PLZF-CFP、NANOS2-GFP、TEX14-mCherry のノックインを行う条件の検討を行った。ゲノム DNA 切断酵素 Cas9 および標的領域 gRNA を発現させることのできるプラスミド pX330 と相同組換えの鋳型となるターゲティングベクターをリポフェクション法により ES 細胞に導入し、ノックインの効率を検討した結果、300bp 程度の相同配列で効率よくノックインできることが確認された。また、さらに短い配列 60bp 程度でもノックインできることが確認できた。

(2) (1)で得られた結果を踏まえて、受精卵に pX330 およびターゲティングベクターを共顕微注入し、受精卵内での直接的ノックインを試みた。しかし、得られた産仔にはノックインされた個体は一匹もなく、受精卵へのプラスミド顕微注入ではノックインが難しいことが明らかとなった。また、得られた産仔におけるゲノム編集効率を確認したところ、モザイクでゲノム編集が生じる確率が高

いことが明らかとなった。

(3) 受精卵へのプラスミド顕微注入ではノックイン個体を得るのが難しいことが明らかとなったため、Cas9 および gRNA の RNA を試験管内で合成し、RNA およびターゲティングベクターの顕微注入を試みたところ、ゲノム編集がモザイクで生じる確率は減少したが、ノックイン個体はやはり得られなかった。

(4) 研究期間の大半に渡り、受精卵内でゲノム編集技術を用いて直接ノックイン動物を作製することを試みたが、非常に難しいことが判明したため、ES 細胞内でゲノム編集を行い、キメラ動物作製を介してノックインマウスを作製する方針に切り替えた。ES 細胞内でのゲノム編集は効率よく成功し、当初の予定とは異なるが、TEX14-Venus、c-KIT-mTurquoise、NANOS2-Neptune の三重遺伝子改変を持つ ES 細胞を作製した。この ES 細胞を用いてキメラマウスの作製を試みていたが、後述の新規受精卵内ノックイン法を確立できたため、キメラマウスの作製は中止し、受精卵内ゲノム編集による直接ノックインを試みている。また、試験管内で ES 細胞から精子幹細胞を誘導する方法が報告されたため、作製した三重遺伝子改変 ES 細胞を用いて直接精子幹細胞の誘導を試みている。

(5) 研究期間後半に Cas9 タンパク質、合成 gRNA および一本鎖ターゲティング DNA を受精卵に導入することでノックインマウスが作製できることが報告された¹。本研究への応用するため、上記ゲノム編集ツールをエレクトロポレーション法により受精卵に導入し、検討を行ったところ、効率よくゲノム編集およびノックインができることが確認できたため、現在、受精卵に直接ゲノム編集し、ノックインマウスを作製している。

(6) 当初の予定ではノックインマウスを作製し、その蛍光を利用して精子幹細胞を回収する予定であったが、マウスの作製が困難であったため、表面抗原および DNA 染色色素を用いた未分化精原細胞および各種雄生殖細胞を回収する方法の検討を行った。Hoechst33342 および CD9、c-KIT 染色を組み合わせることで未分化精原細胞、精母細胞、円形精細胞を純度よく分取する方法を開発した。この方法を用いて円形精細胞を回収し、クロマチン制御因子 MRG15 がヒストン修飾 (H3K36 メチル化) を認識し、その領域にスプライシング制御因子を呼び込むことによって pre-mRNA スプライシング制御が行われていること、さらにヒストン修飾によるスプライシング制御が精子形成に必須のエピジェネティック制御であることを明らかにした (雑誌論文)

(7) 上記で開発した方法を用いて野生型および JMJD3 欠損マウスから未分化精原細胞を回収し、RNA-seq および ChIP-seq を行った。現在データ収集および解析を行っている。

(8) カリフォルニア大学サンフランシスコ校の Dr. Lim との共同研究により、JMJD3 が Dlx2 を含む神経分化関連遺伝子のプロモーター領域およびエンハンサー領域のメチル化を制御することによって神経分化に関わることを明らかにした (雑誌論文)

(9) イリノイ大学アーバナシャンペーン校の Dr. Kim Kemper との共同研究により、飢餓ストレス下における JMJD3 の遺伝子発現制御を明らかにした。すなわち、飢餓ストレスに応じて肝臓内に JMJD3 の発現が誘導され、発現誘導された JMJD3 は SIRT1 および PPAR α と複合体を形成し、脂肪酸酸化経路の一部であるミトコンドリア β 酸化経路に関わる遺伝子群の発現を活性化し、飢餓ストレス下におけるエネルギー代謝を制御していることを明らかにした (雑誌論文)

(10) 野生型未分化精原細胞では発現していないもう一つの H3K27 脱メチル化酵素 UTX が JMJD3 欠損マウスの未分化精原細胞で異所的に発現しており、JMJD3 欠損マウスで見られた生殖機能の長期維持が JMJD3 欠損による影響だけでなく、UTX の異所的に発現による影響も考慮する必要があることが判明した。

(11) 野生型および JMJD3 欠損未分化精原細胞における遺伝子発現を解析したところ、ミトコンドリア β 酸化経路の活性化が見られたほか、やはりエネルギー代謝に関わる LKB1 の発現増加が見出され、JMJD3 欠損精子幹細胞ではエネルギー代謝が活性化していることが明らかとなった。また、これら遺伝子の発現が上昇していることから JMJD3 の欠損よりも異所的に発現した UTX の影響が強く示唆された。

また、エネルギー代謝以外にもオートファジー経路も活性化されており、これらの活性化経路が精子幹細胞の維持増幅に関わっていることが示唆された。

<引用文献>

1. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun*. Vol.7, 2016, pp.10431. DOI: 10.1038/ncomms10431.

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)

Seok S, Kim YC, Byun S, Choi S, Xiao Z, Iwamori N, Zhang Y, Wang C, Ma J, Ge K, Kemper B, Kemper JK. Fasting-induced JMJD3 histone demethylase epigenetically activates mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Clin Invest*, 査読有、2018、in press.

Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Ono E, Matzuk MM. Identification of KIAA1210 as a novel X-chromosome-linked protein that localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes. *Biol Reprod*, 査読有、vol.96、No.2、2017、pp.469-477. DOI: 10.1095/biolreprod.116.145458.

Iwamori N, Tominaga K, Sato T, Riehle K, Iwamori T, Ohkawa Y, Coarfa C, Ono E, Matzuk MM. MRG15 is required for pre-mRNA splicing and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有、vol.113、No.37、2016、pp.E5408-5415. DOI: 10.1073/pnas.1611995113.

Heredi J, Berko AM, Jankovics F, Iwamori T, Iwamori N, Ono E, Horvath S, Kis Z, Toldi J, Vecsei L, Gellert L. Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain. *Brain Struct Funct*, 査読有、vol.222、No.4、2017、pp.1663-1672. DOI: 10.1007/s00429-016-1299-5.

Fujimoto Y, Ozaki K, Iwamori N, Takakuwa H, Ono E. Accumulation of a soluble form of human nectin-2 is required for exerting the resistance against herpes simplex virus type 2 infection in transfected cells. *Acta Virol*, 査読有、vol.60、No.1、2016、pp.41-48.

Varga D, Heredi J, Kanvasi Z, Ruzska M, Kis Z, Ono E, Iwamori N, Iwamori T, Takakuwa H, Vecsei L, Toldi J, Gellert L. Systemic L-Kynurenine sulfate administration disrupts object recognition memory, alters open field behavior and decreases c-Fos immunopositivity in C57Bl/6 mice. *Front Behav Neurosci*, 査読有、vol.16、No.9、2015、pp.157. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00157.

Park DH, Hong SJ, Salinas RD, Liu SJ, Sun SW, Sgualdino J, Testa G, Matzuk MM, Iwamori N, Lim DA.

Activation of neuronal gene expression by the JMJD3 demethylase is required for postnatal and adult brain neurogenesis. *Cell Rep*, 査読有、vol.8、No.5、2014、pp.1290-1299. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.060.

Kocsis K, Knapp L, Gellert L, Olah G, Kis Z, Takakuwa H, Iwamori N, Ono E, Toldi J, Farkas T. Acetyl-L-carnitine normalizes the impaired long-term potential and spine density in a rat model of global ischemia. *Neuroscience*, 査読有、Vol.269、2014、pp.265-272. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.055.

〔学会発表〕(計 12 件)

岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎. 精巣特異的細胞間結合 ICB、ES、BTB の連携作用に機能するタンパク質. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会大会)、2017年12月、神戸.

Iwamori N, Iwamori T, Shima S, Iida H. The role of JMJD3 in the regulation of intercellular bridges during the fragmentation of spermatogonial cysts. The 4th WCRB, Sep 2017, Okinawa, JAPAN.

Iwamori T, Kato Y, Iwamori N, Matsumoto M, Saga Y, Ono E, Matzuk MM. A novel X-chromosome-linked protein, KIAA1210, localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes. The 4th WCRB, Sep 2017, Okinawa, JAPAN.

岩森巨樹、富永薫、岩森督子、大川恭行、小野悦郎、Matzuk MM、飯田弘. 精子形成に必須のエピジェネティックスプライシング制御機構. 第88回日本動物学会大会、2017年9月、富山.

Iwamori N, Iwamori T, Iida H. The role of JMJD3 in the regulation of spermatogonial stem cells. ISSCR, June 2017, Boston, MA.

岩森巨樹、富永薫、佐藤哲也、岩森督子、大川恭行、小野悦郎、Matzuk MM. 精子形成過程に必須のヒストン修飾によるスプライシング制御機構. 第39回日本分子生物学会年会、2016年12月、横浜.

岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎. 新規精巣特異的 Ectoplasmic Specialization 構成タンパク質である KIAA1210 の機能解析. 第39回日本分子生物学会大会、2016年12月、横浜.

岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Matzuk MM. 精巢特異的アクチン関連細胞間結合 Ectoplasmic Specialization とアクロソームに局在する新規タンパク質同定および機能解析. 第 38 回日本分子生物学会大会、2015 年 9 月、神戸.

岩森巨樹、富永薫、岩森督子、佐藤哲也、大川恭行、小野悦郎、Matzuk MM. ヒストン修飾によるスプライシング制御が精子形成過程を制御する. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会、2015 年 5 月、大阪.

Iwamori N. The role of H3K27 demethylase, JMJD3, in the regulation of spermatogonial stem cells. The 3rd SKLRB Symposium on Reproductive Biology, Oct 2014, Beijing, CHINA.

11 岩森巨樹、岩森督子、富永薫、小野悦郎、Matzuk MM. クロマチン制御因子 MRG15 によるスプライシング制御は精子形成に必要である. 第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月、帯広、北海道.

12 岩森督子、岩森巨樹、小野悦郎、Matzuk MM. 精巢特異的アクチン関連細胞間結合 ES (Ectoplasmic Specialization) に局在する新規タンパク質の同定. 第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月、帯広、北海道.

〔図書〕(計 0 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

岩森 巨樹 (IWAMORI, Naoki)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：70647362

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岩森 督子 (IWAMORI, Tokuko)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：10711509

島 桜子 (SHIMA, Sakurako)
山村 祐記 (YAMAMURA, Yuki)