

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19689007

研究課題名（和文）

精子幹細胞の自己複製機構の解明

研究課題名（英文）

Self-renewal mechanism of spermatogonial stem cells

研究代表者

篠原 美都（ SHINOHARA MITO ）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10372591

研究成果の概要（和文）：

本研究は精子幹細胞の安定性制御機構の解明を目的に行った。本研究では精子幹細胞が試験管内で5年以上にわたり核型を維持したまま増殖するが、幹細胞活性や分化能は低下することを明らかにした。また自己複製因 GDNF からの刺激が Akt/PI3K シグナルを介して伝達されることや、Ras/Cyclin D2 や CDK inhibitor の p27 の自己複製制御への関与を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Spermatogonial stem cells (SSCs) in testes are the foundation of spermatogenesis throughout adult life. In 2003, we established a long-term in vitro culture system of mouse SSCs, and designated the cultured cells as Germline stem (GS) cells. GS cells constantly proliferate for a long-term period and expand for 10^{85} -fold (139 passages) during 2 years culture, without losing stem cell activity, normal imprinting patterns, and normal karyotype. Current research was oriented to elucidate the limitation of SSC stability, and the mechanism underlying a stability self-renewal system of SSCs, and how the breakdown of safety mechanism occurs.

First, we continued to culture GS cells beyond 2 years, and examined their life-span, and observed the effects of a long-term culture. We found that GS cells continue to proliferate for >5 years, without losing normal karyotype, but their stem cell activity and differentiation potential became gradually limited by a long-term culture.

Second, we investigated the signaling pathways regulating SSC self-renewal, and found that the signal from Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF), the self-renewal factor of SSCs, is transduced through Akt/PI3K pathway, and that Ras/Cyclin D2 pathway is also involved in self-renewal of SSCs. In addition, we found that p21 and p27, Cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) are involved in self-renewal and differentiation of SSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
20年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
21年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
22年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：幹細胞・生殖・遺伝学

1. 研究開始当初の背景

成体には、血液幹細胞や神経幹細胞など様々な組織幹細胞が存在し、自己複製によって組織の再生を司る。幹細胞の自己複製能力は無限に近いと考えられてきたが、実際に幹細胞が何回分裂することができるかを調べた報告はない。これは幹細胞を機能的に同定する方法がなかったこと、in vitro で幹細胞の自己複製を支持し、長期的に増幅させる系がこれまで無かったことが原因であると考えられる。移植法の確立している血液幹細胞などでは継代移植により in vivo で幹細胞の自己複製能が証明され、継代すると造血能が低下していくことから幹細胞の増殖能は有限であると推察されるが、具体的にそれを定量化した報告はない。

精子幹細胞は成体の精巣にあり、一生にわたって精子形成の源となる細胞である。研究代表者らはこれまで精子幹細胞の機能的解析を行ってきたが、2003年にマウスの精子幹細胞の長期培養系を独自に確立し、これを Germline stem (GS) 細胞と命名した。この細胞は in vitro では精子幹細胞の自己複製因子である Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) の存在下で幹細胞として増殖し、in vivo では精細管内に移植することにより精子形成をし、ホストを雌と交配させると正常な子孫を作成することができる。この細胞の特徴は非常な長期にわたり安定的に増殖することであり、2年間で 10^{85} 倍 (139 passages) に増え、その間増殖速度や幹細胞としての活性・インプリンティングや核型などに全く変化を示さず、2年の培養後も正常な子孫を作った。有名な Hayflick の法則で知られている通り、通常の細胞は有限回数分裂後に増殖を停止するか、一部 crisis という現象を起こした細胞が癌化することにより増殖を続ける。GS 細胞のように癌化を伴わずに正常な状態のまま増殖が続くことは生後の細胞としては例外的であり、幹細胞の安定した自己複製能を反映したものであると考えられる。しかしながら、このような幹細胞の安定した自己複製能を支持する分子メカニズムや、安定性の限界点はどこにあるのか、などに関しては明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は幹細胞の安定した自己複製機構がどのようなメカニズムで成り立っているのか、そしてその破綻がどのよう

に起こるのかを精子幹細胞を使って明らかにすることである。GS 細胞の2年以降の増殖を追跡し、寿命の測定とともに、どのように終焉を迎えるかを観察した。また GS 細胞の自己複製を司るシグナル伝達経路の解明と、寿命と自己複製活性の関連について調べた。

3. 研究の方法

1) 長期培養が精子幹細胞の性質にもたらす影響の解析

研究代表者らは2005年にGS細胞が2年間の培養で 10^{85} 倍 (139 passages) まで、増殖速度や核型、ゲノムインプリント、精子形成能に変化なく増殖し続けることを報告したが、その後も細胞は増殖を続けた。2年間までの段階で測定したテロメア長から推定すると 10^{120} 倍まで増殖し、約34ヶ月でテロメアは完全に消失する見込みであったが、34ヶ月を超過した後も増殖を続けた。本研究では培養を継続し、細胞に起こる変化を以下の点に着目し、経時的に解析した。

a) 増殖曲線の記録

生直後の Green マウス精巣より樹立し、2年間以上培養した GS 細胞株をさらに同じ培養条件で培養し続けた。このマウスでは全身で EGFP の発現があるため、このマウスから樹立した GS 細胞は UV 照射により蛍光を発する。具体的にはマウス胎児由来繊維芽細胞上で GDNF, FGF2, EGF の存在下で培養した。細胞の形態に変化がないかを観察しつつ増殖率を記録し、約3ヶ月ごとに凍結ストックを採るとともに解析を行った。

b) ゲノムインプリンティングの解析

GS 細胞のゲノム DNA を採取し、COBRA (Combined bisulfite restriction analysis) によって母親性 (Igf2r, Peg10) および父親性インプリンティング遺伝子 (H19, Meg3IG, Rasgrf1) のメチル化領域についてメチル化の状態が培養の経過に伴って変化するかを調べた。

c) 遺伝子発現パターンの変化の解析

フローサイトメトリーと RT-PCR 法により精子幹細胞のマーカー (例えば EPCAM, ITGA6, ITGB1 など) や、分化型精原細胞マーカー (KIT)、多能性幹細胞マーカー (FUT-1, Nanog など) の発現を調べた。

d) 精子形成能の判定

培養細胞をトリプシン処理にてバラバラにし、4-8週齢の W/Wv マウスの精細管内に移植した。このマウスでは Kit の発現の欠損により内因性の精子形成がないため、こ

こで得られた精子形成はドナー細胞由来である。3-4ヶ月後にホストの精巣を摘出し、UV照射で蛍光を発するコロニーの数から、幹細胞としての活性を判定するとともに HE 染色により組織像を観察した。2年間の段階での GS 細胞では完全に正常な形態の精子形成の像が観察されたが、その後の培養で分化の停止や癌化などの異常が起こらないかを観察した。同時に移植精巣を用いて RT-PCR 法により精子形成に関与する分子群の発現を調べた。

2) 精子幹細胞の自己複製を司るシグナル伝達経路の解明

GS 細胞は FGF2 や GDNF の存在下で増殖する。GDNF のシグナル分子としては、そのレセプターである Ret と GFRa-1、そしてその下流分子である PI3K, Akt, およびそのシグナルを制御する癌抑制遺伝子である PTEN が知られている。このシグナル伝達経路は体細胞で同定されたが、実際に精子幹細胞の自己複製に関与しているか否かは不明であった。また、血液系においては Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor が幹細胞の自己複製や分化の制御に重要な役割を果たすことが報告されている。例えば p21 が血液幹細胞の quiescence の制御を行なうことがノックアウトマウスの解析から明らかになっている。一方、p27 の方は血液幹細胞のニッシュへのホーミングの効率の決定に重要だと報告されている。また神経幹細胞などで G1 期における細胞の自己複製と分化の選択に、G1 サイクリンの関与が示唆されている。そこで、本研究ではこれらの分子に着目して精子幹細胞の自己複製のメカニズムを解析した。具体的には、a) PI3K および Akt など、特異的阻害剤 (LY139200 と SH5) による GS 細胞の増殖への影響の解析、 b) PI3K, Akt, PTEN, Cyclin など候補となる分子の発現ベクターを GS 細胞にレンチウイルスにより導入し、GDNF が無くても増殖する分子をスクリーニング、 c) b) にてサイトカイン非依存性に増殖した細胞が実際に精子幹細胞活性を持つか否かを精子幹細胞移植法により不妊マウスの精巣内へ移植を行い、精子形成・子孫作成能をもって判定、 d) p21・p27 ノックアウトマウスの精子幹細胞を精巣内に移植し、コロニー形成能や子孫作成能を解析、などの方法により自己複製シグナルの解析を行った。

4. 研究成果

1) 長期培養が精子幹細胞の性質にもたらす影響の解析

a) 増殖曲線の記録

生直後の Green マウス精巣より樹立し、2年間以上培養した GS 細胞株をさらに同じ培養条件で培養し続けた。GS 細胞は 66 ヶ月以上増殖を持続した。その間、細胞の形態に

特に変化は無かった。また GS 細胞は FGF2 や GDNF などのサイトカインに依存して増殖するが、長期培養にてこれらのサイトカインへの依存性は変化しなかった。

b) 核型の解析

培養期間 27 ヶ月、32 ヶ月、36 ヶ月、40 ヶ月において核型を解析した。どの時点においても 80-90% が正常な核型を維持していた。

c) 遺伝子発現パターンの変化の解析

5 ヶ月培養した GS 細胞と 66 ヶ月培養した GS 細胞について、RT-PCR 法にてマーカーの発現を調べた。Taf4b, Stra8, Zbtb16, Ret, Neurogenin3, Pou5f1 などは両方にて発現していた。またフローサイトメトリーにより EPCAM, ITGA6, ITGB1 など精子幹細胞のマーカーや、分化型精原細胞マーカー (KIT)、多能性幹細胞マーカー (FUT-1, Nanog など) の発現に差はなかった。

d) 精子形成能の判定

培養期間 2 年までの細胞は精巣内移植にて、コロニー形成能が低下せず、分化して子孫作性能のある精子を作ることがこれまでの研究で分かっていた。しかし培養期間 36 ヶ月の細胞を精巣に移植したところ、コロニー形成は認められるものの、分化の低下が見られた。移植精巣における遺伝子発現を RT-PCR 法により調べたところ、Prm1 や Sycp1, Sycp3, Stra8, Dmcl1 などのマーカーの発現は認められたが、Clgn や Crem などの発現は 5 ヶ月培養した細胞の移植精巣に比し、著しく低下していた。

2) 精子幹細胞の自己複製を司るシグナル伝達経路の解明

a) GDNF/Akt/PI3K シグナルによる精子幹細胞の自己複製制御

GDNF で活性化されることが知られている PI3K および MAPK 経路についてどちらが自己複製に関与しているか阻害実験により検討したところ、LY294002 (PI3K 阻害剤) により GS 細胞の増殖が 20-30% へと低下した。また GDNF 刺激により Akt がリン酸化されていることが分かった。次に Akt が tamoxifen により発現誘導されるコンストラクトを GS 細胞に導入し、GDNF の非存在下で Akt により増殖するかを検討したところ、GDNF 存在下で増殖速度は低下するが、Akt のみで GS 細胞が GDNF 非依存的に自己複製増殖をすることが分かった。この細胞を W マウス精巣内に移植を行い約 3 ヶ月後に観察したところ、精子形成を伴うコロニー形成が認められた。一方、奇形腫や seminoma などの腫瘍形成は見られなかった。

b) Ras/Cyclin D2 による精子幹細胞の自己複製制御

GS 細胞へレンチウイルスによる発現ベクターを用いて Ras の dominant negative

体を GS 細胞に導入したところ、GS 細胞の自己複製増殖が著しく阻害された。また Ras の強制発現により GS 細胞は GDNF 非依存性に長期にわたって増殖することが分かった。4 ヶ月以上培養した細胞は野生型 GS 細胞と同様精子幹細胞マーカーの発現を維持し、精巣内に移植すると精子形成像が見られたことから、精子幹細胞としての活性を維持していることが示唆された。さらに、試験管内においては 4 ヶ月の培養期間中特に GS 細胞の形態等に変化は見られなかったが、移植後の精巣においては精子形成像の他に、一部で seminoma の形成が認められた。これらのことから、Ras 分子が Akt と同様に精子幹細胞の自己複製制御に関わっていること、しかし Akt の overexpression の場合とは異なり、Ras には精子幹細胞の腫瘍化を促す作用があることが明らかになった。しかしここで形成される腫瘍像は seminoma であり、奇形腫は認められなかった

c) CDK inhibitor による精子幹細胞の自己複製制御

細胞周期調節因子の Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) の p21 と p27 が精子幹細胞や前駆細胞の増殖・分化に関わっていることを明らかにした。p21 や p27 を培養精子幹細胞 (Germline Stem; GS 細胞) に高発現させると増殖の抑制が起こること、また GS 細胞は自己複製因子 GDNF により p21 や p27 遺伝子の発現レベルが低下することから、これらのシグナルが精子幹細胞や前駆細胞の増殖制御に関わっているのではないかと考えられた。そこで、精子幹細胞移植法により p21 KO、p27 KO マウスの精巣における幹細胞の機能的活性を調べたところ、幹細胞活性と分化能は保たれており、幹細胞数も野生型と差が見られなかった。

しかしながら、通常の精子幹細胞移植法では検出できない差異があるのではないかと考え、更に Competitive transplantation assay (競合的移植アッセイ) を行った。この方法は野生型の幹細胞と 1 : 1 でミックスして移植を行うというもので、競合させた場合の幹細胞の優位性を判定できるものである。この方法で移植したレシピエントから生まれた仔のゲノタイプを長期にわたり調査したところ、野生型に比し p21 KO 由来の仔が優勢に生まれるのに対し、p27 KO 由来の仔は殆ど生まれなかった。

さらに継代移植にて幹細胞の自己複製活性を調べたところ、p27 KO 由来の幹細胞では有意に低下していることが分かった。これらのことから、p21, p27 などの CDKI は精子幹細胞からの Germline transmission 効率に影響すること、p27 遺伝子の発現が精子幹細胞の自己複製制御に関わっていることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Kanatsu-Shinohara M., Kato-Itoh M., Ikawa M., Takehashi M., Sanbo M., Morioka Y., Tanaka T., Morimoto H., Hirabayashi M., Shinohara T. Homologous recombination in rat germline stem cells. *Biol. Reprod.* In press
- ② Shinohara T., Ishii K., Kanatsu-Shinohara M. Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *J. Reprod. Dev.* In press. 2011 Jan 6. PMID:21224526
- ③ Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Morimoto H., Ogura A., Shinohara T. Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol. Reprod.* 84(1):97-105 (2010).
- ④ Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Germline modification using mouse spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol.* 477:17-36 (2010).
- ⑤ Iwasa T., Baba S., Doi H., Kaichi S., Yokoo N., Miwa T., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T., Nakahata T., Heike T. Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400(1):27-33 (2010).
- ⑥ Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Shinohara T. Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(14):6210-5 (2010).
- ⑦ Morimoto H., Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Chuma S., Nakatsuji N., Shinohara T. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One.* 4(11):e7909, p1-9 (2009).
- ⑧ Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Takashima S., Ogura A., Shinohara T. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *J. Reprod. Dev.* 56(1):145-53 (2010).
- ⑨ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Kazuki Y., Takashima S., Oshimura

- M., Toyokuni S., Shinohara T. Genetic reconstitution of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras/cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell* 5(1):76-86 (2009).
- ⑩ Takashima S., Takehashi M., Lee J., Chuma S., Okano M., Hata K., Suetake I., Nakatsuji N., Miyoshi H., Tajima S., Tanaka Y., Toyokuni S., Sasaki H., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol. Reprod.* 81(1):155-64 (2009).
- ⑪ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Ogura A., Shinohara T. Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 80(3):518-27 (2009).
- ⑫ Kanatsu-Shinohara M., Takehashi M., Shinohara T. Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73:17-23 (2008).
- ⑬ Kanatsu-Shinohara M., Takehashi M., Takashima S., Lee J., Morimoto H., Chuma S., Raducanu A., Nakatsuji N., Fässler R., and Shinohara T. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on $\beta 1$ -integrin. *Cell Stem Cell* 3(5):533-42 (2008).
- ⑭ Kanatsu-Shinohara M., Kato M., Takehashi M., Hirabayashi M., and Shinohara T. Production of transgenic rats following lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 79(6):1121-8 (2008).
- ⑮ Kanatsu-Shinohara M., Muneto T., Lee J., Takenaka., Chuma S., Nakatsuji N., Horiuchi T., Shinohara T. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol. Reprod.* 78(4):611-7 (2008).
- ⑯ Kanatsu-Shinohara M., Lee J., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ikawa M., Nakamura T., Ogura A., Shinohara T. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol. Reprod.* 78(4):681-7 (2008).
- ⑰ Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M., Miki H., Lee J., Kazuki Y., Inoue K., Ogonuki N., Toyokuni S., Oshimura M., Ogura A., Shinohara, T. Production of knockout mice by gene targeting in multipotent germline stem cells. *Dev. Biol.* 312, 344-52 (2007).
- ⑱ Kanatsu-Shinohara M. and Shinohara T. Culture and genetic modification of mouse germline stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 312(1):344-52 (2007).
- ⑲ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Kimura T., Nakano T., Ogura A., Shinohara T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* 134(10):1853-9 (2007).
- ⑳ Takehashi M., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ogura A., Shinohara T. Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(8), 2596-601 (2007).

[学会発表] (計 17 件)

1) 平成 19 年 2 月 19 日～20 日

特定領域研究「幹細胞の可塑性と未分化性維持機構」公開班会議 東京大学医科学研究所 講堂
篠原美都「精子幹細胞の機能とその技術開発」

2) 平成 19 年 6 月 24 日～26 日

特定領域研究「遺伝情報発現における DECODE システムの解明」合同班会議 箱根湯本温泉 ホテルおかだ
篠原美都「精子幹細胞の多分化能制御に関わる遺伝子デコードプログラムの解明」

3) 平成 19 年 7 月 26 日

特定領域研究「細胞の運命と挙動を支配する細胞外環境のダイナミズム」班会議 京都国際会議場
篠原美都「精子幹細胞のニッチへのホーミングに関与する分子機構の解明」

4) 平成 19 年 10 月 22 日

日本繁殖生物学会 第 100 回記念シンポジウム 東京大学弥生講堂
篠原美都「精子幹細胞による遺伝子改変動物の作成」生殖科学奨励賞受賞

5) 平成 20 年 8 月 7-10 日

特定領域研究「統合脳」5 領域合同班会議 北海道厚生年金会館 (ウエルシティ札幌)

篠原美都「精子幹細胞を用いた神経疾患モデルラット作成技術の開発」

6) 平成 20 年 9 月 2-3 日
特定領域研究「細胞の運命と挙動を支配する細胞外環境のダイナミズム」班会議 国立京都国際会館
篠原美都「精子幹細胞のニッシュの構成分子の解明」

7) 平成 20 年 9 月 8-10 日
特定領域研究「細胞増殖制御」班会議 御殿場高原ホテル
篠原美都「精子幹細胞の細胞周期の調節機構の解明」

8) 平成 21 年 2 月 17-18 日
特定領域「細胞外領域」第二回班会議京都大学 芝蘭会館
篠原美都「試験管内で発生した精子幹細胞がもたらす世代を超えて伝達するエピジェネティック異常」

9) 平成 21 年 9 月 1-3 日
特定領域「細胞増殖制御」班会議 ホテルアンビエント安曇野
篠原美都「精子幹細胞の細胞周期の調節機構の解明」

10) 平成 21 年 9 月 15-16 日
特定領域「細胞外環境」班会議 京都国際会議場
篠原美都「精子幹細胞の癌化における細胞外環境の関わり」

11) 平成 21 年 10 月 13-14 日
新学術領域研究「配偶子制御」第 2 回領域会議 総合研究大学
篠原美都「精子幹細胞の自己複製制御機構」

12) 平成 21 年 12 月 18-19 日
特定領域「統合脳」班会議東京・学士会館
篠原美都「精子幹細胞を用いた神経疾患モデルラット作成技術の開発」

13) 平成 22 年 6 月 3-4 日
新学術領域 第三回領域会議 筑波大学附属下田臨海実験センター
篠原美都「CDK インヒビター p21 と p27 による精子幹細胞の制御」

14) 平成 22 年 6 月 26 日
11th International Symposium on Spermatology 沖縄コンベンションセンター
Takashi Shinohara, Seiji Takashima, Mito Kanatsu-Shinohara

“Positive and negative regulators of mouse spermatogonial stem cell self-renewal”

15) 平成 22 年 7 月 26-28 日
特定領域研究 班会議 門司港ホテル

篠原美都「精子幹細胞の制御における CDK インヒビター p21 と p27 の関与」

16) 平成 22 年 10 月 16 日
アステラス病態代謝研究会 第 41 回研究報告会 東京・経団連会館
篠原美都「生殖細胞特異的な遺伝情報場の継承のメカニズムの解明」

17) 平成 22 年 11 月 8-9 日
新学術領域研究「配偶子制御」第 4 回領域会議 葉山・IPC 生産性国際交流センター
篠原美都「マウス精子幹細胞ニッシュ制御における G 蛋白質分子の役割の解明」

6. 研究組織

(1) 研究代表者
篠原美都 (SHINOHARA MITO)
京都大学大学院・医学研究科・助教
研究者番号：10372591

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし