

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062006

研究課題名（和文） 精子幹細胞における品質管理機構の解析

研究課題名（英文） Analyses on the quality control mechanism of mouse spermatogonial stem cells

研究代表者

篠原 隆司 (TAKASHI SHINOHARA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322770

研究分野：幹細胞

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：幹細胞、精子形成、移植、自己複製

1. 研究計画の概要

本研究の目的は精子幹細胞の品質管理機構を解明することである。前回の特定領域研究の期間中、申請者はマウス精子幹細胞の長期培養に成功し、これを Germline Stem (GS) 細胞と名付けた。精子幹細胞の長期培養は世界に先駆け申請者のグループで初めて報告され、申請者はこの GS 細胞を用い ES 細胞に依存しない新規のノックアウト動物作成法を完成した。

この研究の過程で分かったことは、GS 細胞は胎生期由来の ES 細胞とは異なり、非常に安定した細胞であるということである。GS 細胞においては染色体数やインプリンティングのパターンは安定しており、2 年間の長期培養後も精子形成を起し、子孫を得ることができる。一方、ES 細胞は 2, 3 ヶ月の連続培養により染色体やインプリンティングパターンの異常を起し、生殖細胞形成能を失う。この GS 細胞の極めて高い安定性から、申請者は精子幹細胞には前の世代に被った genetic・epigenetic な損傷を子孫には伝わらないようにするための何らかの品質管理機構が存在することを予想するに至り、この機構の破綻がおこると多能性をもつ幹細胞へと変換したり、精子形成や子孫の異常が起こるといふ仮説をたてている。

本特定領域では、申請者は胎児期の生殖細胞から GS 細胞を樹立することにより、ヒストン修飾異常をもつ GS 細胞を樹立しており、実際この細胞から生まれた子孫はインプリント遺伝子の DNA メチル化異常が数代に渡り継続して発生した。本研究では、さらに GS 細胞の安定性を崩すために遺伝子導入および培養条件を変更することにより GS 細胞の genetic, epigenetic な安定性がどのように

獲得され、維持されているかを解析する。

2. 研究の進捗状況

1) embryonic germline stem (eGS) 細胞の樹立

我々は胎生期の生殖細胞から精子幹細胞活性を持つ細胞の樹立に成功し、この細胞を eGS 細胞と名付けた。eGS 細胞は GS 細胞と同様に GDNF の存在下で増殖し、外見上は GS 細胞と区別することができない。この細胞は正常な DNA メチル化パターンを持つが、ヒストン修飾パターンが生後の精巣由来の GS 細胞と異なっているという特徴を持つ。この細胞を精巣内に移植すると精子形成を行なうことができるが、インプリンティング遺伝子における異常な DNA メチル化を持つ個体が作成されることが分かった。また、この DNA メチル化の異常は子孫にも代々伝達されていく（現在までに 8 代）。これは通常のエピジェネティックな異常が胎児期の生殖細胞の発生時に消失するのとは対照的な結果であり、DNA メチル化異常が子孫に伝達された最初の例である。

2) DNA メチル化酵素の役割

DNA methyltransferase (DNMT)1 レベルは GS 細胞の生存に重要であり、DNMT1 のノックダウンを行った GS 細胞は p53 依存性の細胞死を起こすことが分かった。これはすべての DNMT をノックアウトされても増殖を続ける ES 細胞とは異なった性質である。一方、DNMT3 をノックアウトされた GS 細胞は SineB にメチル化異常を持つことが明らかとなった。また、通常 GS 細胞には発現されていない DNMT3L を GS 細胞で強制発現を行った場合は major および minor サテライト DNA のメチル化が亢進することが明らかになった。

3) cyclin dependent kinase inhibitor (cdki) による精子幹細胞からの子孫作成効率の制御

精子幹細胞の自己複製を制御する候補分子として p21, p27 cdki の機能解析を行った。p21 遺伝子が欠損した精子幹細胞は野生型の幹細胞よりも子孫作成を効率に行うが、p27 遺伝子が欠損した場合には逆に野生型の精子幹細胞の方が効率よく子孫作成を行うことを明らかにした。特に p27 遺伝子については継代移植により精子幹細胞の自己複製分裂を直接制御している可能性が示唆された。

3. 現在までの達成度

おおむね、順調に進展している。

特に、eGS 細胞の樹立、および活性化型 Ras による外来性サイトカインフリーの精子幹細胞培養法の開発を含め、ほぼ順調に課題について成果をおさめている。

4. 今後の研究の推進方策

現在我々は、この活性化型 H-Ras による GS 細胞の樹立、および新規自己複製誘導分子の同定による GS 細胞の樹立を鋭意取り組んでいる。

5. 代表的な研究成果

(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 4 件) すべて査読あり。

1. Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S. and *Shinohara T. 2010. Regulation of germline transmission in the male mice by p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 6210-6215.
2. Takehashi, M., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara T. 2010. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. Dev. Growth Differ. 52, 303-310.
3. Kanatsu-Shinohara, M. and *Shinohara T. 2010. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. J. Reprod. Dev. 56, 145-153.
4. Morimoto, H. and * Shinohara T. spermatogonial stem cells. Plos One 4, e7909.

[学会発表] (計 4 件)

1. Takashi Shinohara (Kyoto University), "Derivation of embryonic germline stem cells" The 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 8/1/09
2. The 11th Kyoto University

International Symposium. "Culture of Spermatogonial stem cells" 2008 年 10 月 9-11 日 中国上海

3. Cold Spring Harbor 73rd Symposium: Control and Regulation of Stem Cells "Culture of Spermatogonial stem cells" 2008 年 5 月 28 日-6 月 2 日 米国 New York
4. Society for the Study of Reproduction, Annual meeting "Culture of Spermatogonial stem cells" 2008 年 5 月 25-30 日 米国 Hawaii

[その他]

新聞報道

1. "精子幹細胞の必須物質確認" 京大グループ読売新聞 2008 年 12 月 1 日
2. "京大グループ「接着分子」発見" 京都新聞 2008 年 11 月 6 日
3. "男性不妊治療に道、特殊タンパク質が精子形成に関与" 産経新聞 2008 年 11 月 6 日 産経新聞
4. "精子幹細胞からの生殖細胞腫瘍モデルの作成に成功" 京都新聞 2009 年 7 月 2 日、日刊工業新聞 2009 年 7 月 2 日