

平成22年 4 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19201040

研究課題名 (和文) 精子幹細胞の遺伝子改変によるノックアウト動物の作成

研究課題名 (英文) Production of knockout animals using spermatogonial stem cell

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：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

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

従来の生殖工学の中心はメスであり、1960年代からの卵子・初期胚の培養・操作技術の確立と共に、雌性生殖細胞の研究は発展した。特にマウスにおいてはES細胞が広く個体レベルでの遺伝子破壊に利用されている。しかしながら、生殖細胞になることができるES細胞はマウスのみであり、卵の数がすくなくなったり、脆弱な動物ではこのES細胞を用いた従来法を適用するのは困難であることから、個体の遺伝子破壊はマウスにおいてのみ行われている。唯一別の方法として考案された核移植法による遺伝子破壊は相同組換えの効率と核移植自体の成功率が極めて低いことから、現在はほとんど行われるに至っておらず、多くの動物では個体の遺伝子操作が不可能である。この問題点を克服するために、我々はオスの精子幹細胞の持つ可能性に注目し、これまで研究を進めてきた。我々はこれまでに glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), basic fibroblast growth factor (bFGF) を用いることで、マウス精子幹細胞を試験管内で長期培養することに成功し、これを Germline Stem (GS) cell と名付けた。またこの細胞に遺伝子ノックアウト用のベクターを導入し、2006年にノックアウトマウスの作製に成功した。本研究においては、これまで遺伝子破壊の困難であった、3つの代表的な実験動物種 (ハムスター、ウサギ、ミニブタ) のGS細胞株の樹立と、その遺伝子操作法の確立を目的とする。最終的には、その技術を発展させ、トランスジェニック・ノックアウト動物を作成する技術を確立する。

2. 研究の進捗状況

我々は2008年にハムスターのGS細胞の樹立を行った。ハムスター由来GS細胞はマウスGS細胞と同様にGDNFとbFGFに依存して増殖するが、一方で mouse embryonic fibroblast 上よりも laminin コートされたプレートにおいて増殖が活発におこる点でマウスとは異なっている。この細胞にレンチウイルスベクターを導入し、免疫不全マウスの精巣内において精子形成を起こすことが確認された。

しかしながら、ウサギなどの他の動物については、まだ増殖要求性が明らかになっていない。この問題を解決するために我々はマウスGS細胞の自己複製メカニズムを明らかにし、これらの分子を利用することにより、増殖を誘導することができないかと考えた。本年度の研究で我々は培養されたマウス精子幹細胞に活性化型H-Rasを導入し、精子幹細胞の自己複製分裂を外来のサイトカインがない状態で試験管内で誘導することに成功した。RasV12遺伝子を導入された細胞は精原細胞の分化マーカーを保持し、精子型のゲノムインプリンティングを保持したまま4ヶ月の間増殖し、正常な精原細胞の表現型を示す。H-RasV12を導入された精子幹細胞を精巣内に移植すると、セミナーマとともに、完全な精子形成を完成させることができた。現在我々はこのH-RasV12の遺伝子導入を行い、ウサギおよびブタ精子幹細胞の培養を行っている。

3. 現在までの達成度

おおむね、順調に進展している。

これまでにハムスターGS細胞の樹立、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 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

[雑誌論文] (計 7 件) すべて査読あり。

1. Takehashi, M., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Ogura, A. and Shinohara, T. 2007. Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 2596-2601.
2. Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., Takashima, S., Lee, J., Chuma, S., Nakatsuji, N., Fässler R. and Shinohara, T. 2008. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on β 1-integrin. Cell Stem Cell 3, 533-542.
3. Kanatsu-Shinohara, M., Muneto, T., Lee, J., Takenaka, M., Chuma, S., Nakatsuji, N., Horiuchi, T. and Shinohara, T. 2008. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. Biol. Reprod. 78, 611-617.
4. Kanatsu-Shinohara, M., Kato, M., Takehashi, M., Morimoto, H., Takashima, S., Chuma, S., Nakatsuji, N., Hirabayashi, M. and Shinohara, T. 2008. Production of transgenic rats via lentiviral and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. Biol. Reprod. 79, 1122-1128.
5. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Morimoto, T., Ogura, A. and Shinohara, T. 2009. Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in spermatogonial stem cells. Biol. Reprod. 80, 518-527.
6. Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. 2009. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. Biol. Reprod. 81, 155-164.

7. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Takashima, S., Mitsuo Oshimura, Toyokuni, S. and Shinohara, T. 2009. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation. Cell Stem Cell 5, 76-86.

[学会発表] (計 6 件)

1. 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
2. Society for the Study of Reproduction, Annual meeting “Culture of Spermatogonial stem cells” 2008 年 5 月 25-30 日 米国 Hawaii
3. Cornell University Stem Cell Lecture “Culture of Spermatogonial stem cells” 2008 年 6 月 3 日 米国 New York
4. The 11th Kyoto University International Symposium. “Culture of Spermatogonial stem cells” 2008 年 10 月 9-11 日 中国上海
5. Takashi Shinohara (Kyoto University), “Derivation of embryonic germline stem cells” The 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 8/1/09
6. Takashi Shinohara (Kyoto University), “Positive and negative regulators of mouse spermatogonial stem cell self-renewal” Keystone Meeting, Keystone, Colorado, 2/17/10

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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