

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24年2月29日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590076

研究課題名（和文）精子幹細胞のゲノム安定性におけるポリ(ADP-リボシル)化反応の役割

研究課題名（英文）Role of poly(ADP-ribosyl)ation in spermatogonial stem cells

研究代表者

竹橋 正則 (TAKEHASHI MASANORI)

大阪大谷大学・薬学部・専任講師

研究者番号：10378862

研究成果の概要（和文）：

精子幹細胞の長期培養系は、Germline stem cells (GS 細胞) と呼ばれている。GS 細胞は2年間培養し続けても、増殖速度、形態、核型、DNA メチル化パターン、精子形成能が維持された安定な細胞である。本研究では、GS 細胞におけるポリ(ADP-リボシル)化反応の役割を解析した。ポリ(ADP-リボシル)化反応を阻害したGS細胞は、DNA メチル基転移酵素の発現低下がみられ、細胞死が誘導された。この結果から、GS細胞の安定なDNA メチル化維持に、ポリ(ADP-リボシル)化反応が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Spermatogonial stem cells (SSCs) can proliferate in vitro in the presence of glial cell line-derived neurotrophic factor, a self-renewal factor for SSCs. These cultured SSCs are called germline stem (GS) cells. Growth rate, morphology, karyotype, DNA methylation profile and fertility of GS cells appear to be unaltered during a 2-year culture, revealing remarkable stability of GS cells. In this study, we investigated the role of poly(ADP-ribosyl)ation in GS cells. Poly(ADP-ribosyl)ation is a posttranslational modification of proteins mediated by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) which is involved in genomic stability. We examined the effect of PARP inhibitor on GS cells. PARP inhibition reduced growth rate of GS cells, and induced cell death. Analyses of gene expression patterns showed that PARP inhibition reduced DNA methyltransferase genes expression. These results suggest that poly(ADP-ribosyl)ation contribute to maintenance of DNA methylation in GS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：精子幹細胞、ポリ(ADP-リボシル)化、PARP、発生・分化、再生医療

1. 研究開始当初の背景

生後の精巣に存在する精子幹細胞は、ほぼ一生にわたり増殖し続け、精子形成の源になる細胞である。生後組織にある他の幹細胞と比べて、遺伝情報を次世代に受け継ぐことができるという点が特徴である。2003年にはマウスでその長期培養系（Germline stem cells: GS 細胞）が確立され、その後、2年間培養し続けても増殖速度、形態、核型、DNAメチル化パターン、精子形成能が維持された非常に安定な細胞であることを明らかにした。この実験結果と、遺伝情報を次世代に受け継ぐという性質から、GS細胞には厳密なゲノム安定化機構が備わっている可能性が示唆された。

その一方、精子形成という本来単能性のGS細胞は、培養中に稀に多能性を獲得し、mGS細胞（multipotent germline stem cells）と呼ばれるES様の細胞に変化する性質も合わせもつ。mGS細胞はES細胞同様、培養中、容易に染色体異常が生じ、GS細胞のようなゲノム安定性が維持されていない。この多能性獲得機構は明らかにされていないが、ゲノムの監視役として働くp53欠損マウス由来のGS細胞から、mGS細胞が高い頻度で発生するという事実から、厳密なゲノム安定化機構の破綻が多能性獲得に繋がると考えられた。また、iPS細胞樹立には癌遺伝子が必要なことから、癌化と多能性獲得の密接な関連性も示唆されていた。

2. 研究の目的

精子幹細胞の長期培養系、GS細胞について、その増殖およびゲノム安定化機構に関わる因子を明らかにすることが目的である。生体内においてDNA修復、染色体の安定性、発癌などとの関連が注目されている、タンパク質翻訳後修飾の1つ、ポリ(ADP-リボシル)化反応に着目し、精子幹細胞における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GS細胞の樹立

生後1~2日目のDBA/2マウスの精巣を採取し、コラゲナーゼとトリプシンによる2段階の酵素処理によって分離した細胞を、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)存在下で培養し、約2ヶ月後、安定に増殖するGS細胞を得た。

(2) 神経幹細胞の樹立

比較実験として、組織幹細胞の1つ、神経幹細胞の培養系を用いた。胎児(胎生14~15日)ICRマウスの脳からNeurosphere法により神経幹細胞を分離・培養した。

(3) ポリ(ADP-リボシル)化反応の制御

ポリ(ADP-リボシル)化反応を触媒する酵素、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)活性を、各種の酵素阻害剤を用い、GS細胞および神経幹細胞に作用させ、細胞の変化を以下(4)~(7)の方法で解析した。

(4) 細胞増殖および細胞死の解析

形態的变化の観察、細胞数の変化、BrdUの取り込み、細胞死判定などの解析を行った。

(5) 遺伝子およびタンパク質の発現解析

GS細胞、多能性幹細胞および神経幹細胞の特異的発現マーカー、細胞周期制御因子、DNAメチル基転移酵素(Dnmt)の発現をRT-PCR法、ウエスタンブロット法および免疫染色法を用いて解析した。細胞周期制御因子については、ダブルチミジンプロック法によって細胞周期を同調させた条件でも解析した。

(6) 細胞周期の解析

フローサイトメーターを用いて、細胞周期の変化を解析した。

(7) DNAメチル化パターンの解析

GS細胞は父方インプリンティング遺伝子が完全にメチル化され、一方、母方インプリンティング遺伝子が非メチル化状態に維持されている。父方インプリンティング遺伝子として、*H19*、*Meg3*、母方インプリンティング遺伝子として *Igf2r*、*Peg10* のDNAメチル化パターンを解析した。また、未分化制御に重要な遺伝子 *Pou5f1* の発現調節領域のメチル化パターンも解析した。メチル化解析には、COBRA法(combined bisulfite restriction analysis)を用いた。

4. 研究成果

(1) PARP活性阻害がGS細胞に与える影響

精子幹細胞の培養系、GS細胞にPARP阻害剤を添加すると、細胞増殖が抑制され、細胞死が誘導された。PARP活性阻害によるGS細胞の遺伝子発現変化を解析した結果、特異的マーカーの発現や、多能性獲得を示すような

発現変化は見られなかった。しかし、DNA メチル基転移酵素のうちの数種で、その発現が抑制されていた。この結果をふまえ、DNA メチル化パターンに変化があるかどうかを、COBRA 法で解析したところ、コントロールの GS 細胞同様、精子型のインプリンティングパターンを示し、変化は見られなかった。これらの結果から、PARP 阻害剤によりポリ(ADP-リボシル)化反応を阻害することによって、直接的あるいは間接的に DNA メチル基転移酵素の発現が低下し、GS 細胞のメチル化維持に異常が生じ、細胞死が誘導された可能性が考えられた。

(2) PARP 活性阻害が神経幹細胞に与える影響
神経幹細胞の培養系に PARP 阻害剤を添加すると、細胞増殖が抑制された。その抑制に関わる因子を解析するために、ダブルチミジンブロック法によって S 期初期に同調させた細胞に PARP 阻害剤を添加して、それぞれの細胞周期のピークを比較した。コントロールでは S 期から G2/M 期に移行するまでの時間が 6 時間であったのに対して、PARP 阻害剤を添加した細胞では 8 時間であった。また、G2/M 期から G1 期への移行は、コントロールでは 4 時間であったのに対して、PARP 阻害剤を添加した細胞では 7 時間であった。したがって、PARP の阻害によって S 期から G2/M 期への移行が 2 時間、また G2/M 期から G1 期への移行が 3 時間遅延したことになる。一方、PARP 阻害剤添加から 6 時間経過後、各種サイクリンとプレーキ因子について発現解析を行った。コントロールと比較すると、細胞周期を停止させるプレーキ因子に変化はみられなかったが、種々のサイクリンが顕著に減少していた。これらの結果から、神経幹細胞の培養系において、PARP 活性を阻害することにより細胞内で細胞周期の移行に必要なサイクリンの転写が抑制され、移行が遅延した可能性が考えられた。

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 5 件)

① Banasik M, Stedeford T, Strosznajder RP, Takehashi M, Tanaka S, Ueda K. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 attenuates the toxicity of carbon tetrachloride. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 26, 883-889 (2011) (査読有)

② Kurokawa S, Takehashi M, Tanaka H, Mihara H, Kurihara T, Tanaka S, Hill K, Burk R, Esaki N. Mammalian selenocysteine lyase is involved in selenoprotein biosynthesis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 57, 298-305 (2011) (査読有)

③ Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. *Dev Growth Differ*, 52, 303-10 (2010) (査読有)

④ 竹橋正則, 篠原美都, 篠原隆司. 精子幹細胞と再生医療. *産科と婦人科*, 76, 1250-1254 (2009) (査読無)

⑤ 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, 155-64 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 前田藍佳, 他. PARP-1 阻害剤が神経幹細胞の細胞周期に与える影響について. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日 (札幌)

② Tanaka S, et al. Pathological role of cytochrome P450 2D6 in dementia with Lewy bodies. *Alzheimer's Association International Conference*, July 20, 2011 (Paris)

③ Tanaka S, et al. Microarray analysis of gene expression profile in astrocytes after exposure to amyloid β protein. *Alzheimer's Association International Conference*, July 18, 2011 (Paris)

④ 奥田明子, 他. 神経幹細胞の細胞周期に PARP 阻害剤が与える影響. 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 30 日 (誌上発表)

⑤ 奥田明子, 他. 神経幹細胞における PARP 阻害剤の影響. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 30 日 (岡山)

〔図書〕（計1件）

- ① 竹橋正則, 篠原美都, 篠原隆司. エヌ・
ティー・エス. 幹細胞の分化誘導と応用 -
ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線 -.
2009, pp 35-44

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹橋 正則 (TAKEHASHI MASANORI)
大阪大谷大学・薬学部・専任講師
研究者番号：10378862

(2) 研究分担者

田中 静吾 (TANAKA SEIGO)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号：70263150