

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15690

研究課題名(和文) シングルセル解析による精巢性テラトーマへの分化運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of differentiation fate determination to testicular teratoma by single cell analysis.

研究代表者

宮崎 岳大 (Miyazaki, Takahieo)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40826591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：所属先の先行研究から、p53などをノックダウンさせることでGS細胞から多分化能をもつmGS細胞の樹立に成功している。そこで、精子幹細胞からmGSへの変化を誘導させる遺伝子をスクリーニングすることによりテラトーマ形成の誘導メカニズムの解明を目指した。その結果、精子幹細胞からmGSへの誘導はある遺伝子の発現量を抑制すると有意に増加した。さらにその遺伝子を欠損したGS細胞のRNAシーケンス解析により、野生型と比較して発現量が大きく変動している遺伝子をテラトーマ形成に関わる遺伝子候補とした。以前同定した実験的精巢性テラトーマ形成の原因遺伝子であるett1遺伝子との関連を見出すことは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの精巢性テラトーマの原因遺伝子の1つであるTer変異の存在を明らかにしたことにより解析が新たな段階に入った。そして2005年にテラトーマ形成の原因遺伝子として考えられていたTer遺伝子座がdead end 1のナンセンス変異として同定されてから数多くのテラトーマ形成に関連する遺伝子が報告され始めた。しかし実験的精巢性テラトーマに関する研究は進んでおらず、本研究は新たな視点からテラトーマ形成の分子メカニズムを目指すものである。さらに、生殖幹細胞が正常な配偶子形成・分化制御過程から逸脱して、3胚葉性の組織に分化するかの研究は行われておらず、あらたな知見を与えることができる。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we succeeded in establishing mGS cells with multipotency derived from GS cells by knock down several genes. I aimed to elucidate the induction mechanism of teratoma formation by screening for genes that induce the change from GS cells to mGS. The results showed that mGS was significantly formed when several genes were knocked down. However, no relationship was found with the previously identified ett1 gene

研究分野：実験動物

キーワード：精巢性テラトーマ 精子幹細胞

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞や幹細胞は異常分化や腫瘍形成の可能性を有しながら、どのようにして特異的な分化運命を経るのか明らかにすることは生物の個体発生を理解する上でとても重要である。

そこで申請者はマウスの精巣に形成されるテラトーマに着目した。テラトーマとは正常な発生過程から逸脱した生殖細胞が 3 胚葉性の組織に分化した腫瘍である。生殖細胞から異常分化するテラトーマの形成機構を解明することにより生殖細胞の分化制御機構を明らかにすることができると考えている。

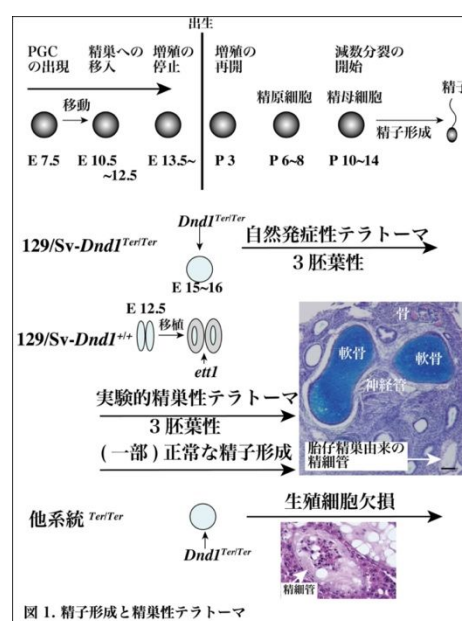
マウスのテラトーマに関する研究は、129 系統を遺伝背景とするマウスに自然発症の精巣性テラトーマと生殖細胞の欠損を呈する系統が同定され (Noguchi et al., 1985) 2005 年に *dead end 1 (Dnd1)* 遺伝子のナンセンス変異 (*Dnd1^{Ter}*) が原因として同定されてから急速に発展した (Youngren et al., Nature, 2005)。 *Dnd1^{Ter}* 変異によって 129 系統はテラトーマを形成するのに対し、 *Dnd1^{Ter}* 変異を他系統に交配導入したコンジェニック系統では異常な生殖細胞がアポトーシスによって排除されテラトーマは形成されない。 DND1 は RNA 結合ドメインをもち細胞周期抑制因子や多分化能のマーカー遺伝子等と結合し miRNA による分解から保護し、生殖細胞の分化に重要な働きをすることが報告されている。 DND1 は様々なシグナル系を制御していることや、 *Dnd1^{Ter}* コンジェニック系統ではテラトーマを形成しないことから、 *Ter* 変異を介したテラトーマ形成のメカニズムを解明するのは困難である。

そこで、申請者は 129 系統特異的な事象である実験的精巣性テラトーマに着目した。実験的精巣性テラトーマとは、129 系統の 12.5 日胚の胎仔精巣を成体精巣に移植することによりテラトーマの形成を実験的に誘発させるものである (Stevens PNAS, 1964)。胎仔精巣の移植を行わない限りテラトーマを形成しないが、胎仔精巣を移植することにより生殖細胞の精子形成過程から逸脱しテラトーマを形成する。しかし、不思議なことに全ての生殖細胞が異常分化しテラトーマを形成する訳ではなく、一部の生殖細胞は正常な精子形成過程を経る。さらに、全ての移植で 3 胚葉性の組織を形成するわけではなく、時には 2 胚葉性や単胚葉性の組織しか形成しない場合もある。申請者はすでにこの実験的精巣性テラトーマ形成に關与する 3 領域を遺伝学的手法で同定している (Miyazaki et al., Mamm Genome, 2014, Miyazaki et al., Zool Sci, 2018)。さらにこの 1 領域 (*ett1*) について 129 系統以外の系統に交配導入したコンジェニック系統を作出し、胎仔精巣の移植によってテラトーマを形成することを確認した。このことから、 *ett1* 領域には生殖細胞の異常分化を制御するような遺伝子が存在していることが明らかになった。 *ett1* 遺伝子の候補遺伝子として 129 系統の遺伝子背景に *melanocortin 4 receptor (Mc4r)* のミスセンス変異を同定している。この遺伝子は促進型 G タンパク質共役型の受容体であり、受容体にリガンドが結合することにより、cAMP の量が上昇し PKA の活性化、CREB の活性化により遺伝子の転写を促進し細胞増殖等に関与することが示唆されているが、テラトーマ形成にどの様に關与しているかは謎である。

さらに、なぜ生殖細胞が 3 胚葉性の組織に分化するか、何が移植胎仔精巣中で正常発生する生殖細胞とテラトーマを形成する生殖細胞の分化運命を決定するかは明らかになっていない。生殖細胞の分化制御機構を明らかにするためにはこれらの謎を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究で用いる胎仔精巣移植片移植を行わない限り生殖細胞は正常な発生過程を経て精子を形成するが、移植することによって生殖細胞の分化運命が変わり正常発生過程から逸脱し 3 胚葉



性のテラトーマを形成する。また、不思議なことに全ての生殖細胞がテラトーマを形成するわけではなく一部の生殖細胞は正常に精子形成を経る。そこで、実験的精巣性テラトーマ形成系を用いて精子幹細胞が正常な配偶子形成・分化制御過程から逸脱してなぜテラトーマに分化するかを分子レベルで明らかにし、生殖細胞の分化制御機構の解明を目標としている。

3. 研究の方法

なぜ正常な配偶子形成過程から逸脱し、3胚葉性の組織が分化するかはわかっていない。そこで、新たな視点から解析する必要がある。本来の計画では移植した胎仔精巣の生殖細胞が正常発生過程からテラトーマ形成へと分化運命を切り替えるスイッチ遺伝子探索のため移植後1~2日後、3胚葉性への分化誘導遺伝子探索のため3~4日後に移植組織片を回収し、シングルセル解析を行い、テラトーマ形成の関連遺伝子のリストアップを行う予定であった。しかしコロナ禍の影響や、解析に耐えうるサンプルの確保が困難であったため、別の視点から研究を進め、テラトーマ形成の関連遺伝子のリストアップを行った。

所属研究室では、精子幹細胞の長期間の培養に成功しておりこの精子幹細胞を用い解析を行った。先行研究から、がん抑制遺伝子である *p53* や *Dmrt1* をノックダウンさせることで、精子幹細胞から多分化能をもちES細胞に似た細胞 (mGS細胞) の樹立に成功している。そこで、精子幹細胞から mGS への変化を誘導させる遺伝子をスクリーニングすることによりテラトーマ形成の誘導メカニズムの解明を目指した。

精子幹細胞を用いたテラトーマ形成関連遺伝子のスクリーニング

上記で明らかとなった mGS 化に関与していると考えられる遺伝子のノックダウンや過剰発現を行い mGS の出現率を検証した。

遺伝子のノックダウン、過剰発現にはそれぞれのベクターを導入したレンチウイルスを精子幹細胞に感染させ行った。

ett1 遺伝子と mGS 化への関与

ett1 遺伝子のである *Mc4r* と上記研究で明らかとなった遺伝子を精子幹細胞で遺伝子の発現を抑制または過剰発現させることによって *ett1* 遺伝子が mGS 化に関与しているか検証を行った。

4. 研究成果

精子幹細胞を用いたテラトーマ形成関連遺伝子のスクリーニング

いくつかの遺伝子を組合せて遺伝子をノックダウンさせることにより、正常な精子幹細胞が mGS 細胞へと有意に誘導させた。その中でも、ある piRNA 関連遺伝子の関与が強く示唆された。

その piRNA 関連遺伝子を欠損したマウスから作製した精子幹細胞で mGS 化への誘導が確かに増加した。

ett1 遺伝子と mGS 化への関与

精子幹細胞の RNA シークエンスの結果、*Mc4r* はほとんど発現していないことがわかった。さらに *Mc4r* のノックダウンを行ったが、mGS 化することはなかった。これは *in vivo*, *in vitro* の違いや、実際の変異である一塩基置換が重要であることが考えられる。

< 引用文献 >

Noguchi T, Noguchi M, J Natl Cancer Inst 75:385-392, (1985)

Youngren KK, et al., Nature 435:360-364, (2005)

Stevens LC, Proc Natl Acad Sci USA 52:654-661, (1967)

Miyazaki, T. et al., Mamm Genome 25, 317-326, (2014)

Miyazaki, T. et al., Zool. Sci. 35, 172-178, (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyazaki Takehiro, Kanatsu-Shinohara Mito, Ema Masatsugu, Shinohara Takashi	4. 巻 108
2. 論文標題 Signal regulatory protein alpha is a conserved marker for mouse and rat spermatogonial stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 682 ~ 693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioad006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Takehiro, Kanatsu-Shinohara Mito, Ogonuki Narumi, Matoba Shogo, Ogura Atsuo, Yabe-Nishimura Chihiro, Zhang Hongliang, Pommier Yves, Trumpp Andreas, Shinohara Takashi	4. 巻 150
2. 論文標題 Glutamine protects mouse spermatogonial stem cells against NOX1-derived ROS for sustaining self-renewal division <i>in vitro</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.201157	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------