

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成23年度～平成24年度

課題番号：23790332

研究課題名（和文） エピジェネティック制御による精子幹細胞から多能性幹細胞への誘導

研究課題名（英文） Induction of multipotent germline stem cells from germline stem cells by epigenetic change.

研究代表者

田中 敬（TANAKA TAKASHI）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40579265

研究成果の概要（和文）： 培養精子幹細胞である GS（Germline Stem）細胞が多能性幹細胞 mGS（multipotent Germline Stem）細胞に変化する機構を探るため、申請者は GS 細胞の特異的なエピジェネティック制御が破綻することで mGS 細胞を生じるかどうか検討した。

本研究で Small RNA 経路およびヒストン修飾の破綻を試みたが mGS 細胞への変化はみられなかった。したがって GS 細胞の多能性は複数の遺伝子により制御されることが示唆される。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the mechanism which represses pluripotency in germline stem cells (GSCs), this study investigated whether epigenetic changes induce GS-mGS conversion. As a result, lentiviral transduction of shrnas for epigenetic modifiers did not induce GS-mGS conversion. These results suggest that pluripotency in GS cells is repressed by several pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞の試験管内長期培養法は申請者が所属する研究室において確立された。培養精子幹細胞である GS (Germline Stem) 細胞は成長因子を加えた培地中で安定に増殖し、他個体精巣への細胞移植により精子形成を完成する。

GS 細胞は試験管内培養でも安定であり 2 年間にわたり精子形成能を維持する。しかし興味深いことに、GS 細胞は培養中に多能性幹細胞に変化する場合がある。この精子幹細胞由来多能性細胞の mGS (multipotent Germline Stem) 細胞は ES 細胞および iPS 細胞と同等の多能性をもち、遺伝子改変マウスの作製に応用することができる。この精子幹細胞からの多能性細胞は胎児を破壊して作製する ES 細胞より倫理的問題が少なく、iPS 細胞のような遺伝子改変を伴わない利点がある。しかし GS 細胞から mGS 細胞への変化は偶発的であり、頻度は極めて低い。これまで p53 遺伝子ノックアウトマウス由来 GS 細胞が野生型と比較して高確率で mGS 細胞に変化することが分かっているが、多能性が誘導される分子機構は不明であり、人為的に mGS 細胞を誘導する方法は確立されていない。

2. 研究の目的

近年ヒストン修飾などエピジェネティック制御機構が発生や分化など、様々な現象を制御することが分かってきた。GS 細胞でもエピジェネティック制御遺伝子が発現することが分かっているが、その役割は不明である。そこで申請者は GS 細胞においてエピジェネティック制御遺伝子が多能性を抑制しているという仮説を立て、本研究において GS 細胞のエピジェネティック制御機構を変化させて mGS 細胞を誘導する事を目指す。

エピジェネティック制御機構のうち①ヒストン修飾と②Small RNA 経路を検討する。①、②それぞれの経路を破綻させることで GS 細胞から mGS 細胞が誘導できるかどうか検討する。また①、②に関わる遺伝子のうち、mGS 細胞で高発現する遺伝子を GS 細胞で過剰発現させる、あるいは mGS 細胞で高発現する遺伝子を GS 細胞でノックダウンして mGS 細胞が誘導できるかするか検討する。

3. 研究の方法

本研究ではエピジェネティック制御遺伝子の発現変化により GS 細胞を mGS 細胞へ誘導できるかどうか明らかにする。そのため、まず多能性細胞を簡便に検出できるように Nanog のレポーターマウスから GS 細胞を樹立する。樹立した GS 細胞は Nanog 遺伝子のプロモータ下で GFP による緑色蛍光を示す。通常 GS 細胞は Nanog 遺伝子を発現しないため、

この遺伝子改変 GS 細胞を用いることにより mGS 細胞への変化を検出しやすくなる。

GS 細胞のエピジェネティック制御機構を破綻させるため、GS 細胞で高発現する①ヒストン修飾、②small RNA 経路遺伝子を探索し、それら遺伝子をノックアウトあるいはノックダウンした精子幹細胞を樹立する。具体的には①について H3K4 メチル化酵素 Mll、H3K27 メチル化を制御するポリコム遺伝子 Ring1、Ezh2、H3K9 メチル化酵素 G9a/G9b、ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd などを検討する。②については miRNA 経路で主要な役割をもつ Dicer 遺伝子のノックアウト、生殖細胞特異的 small RNA 経路の Piwi 遺伝子ノックダウンを検討する。それぞれの遺伝子変化による多能性遺伝子発現等を解析し、GS 細胞を mGS 細胞へ誘導できるかどうか検討する。

4. 研究成果

まず mGS 細胞を効率良く検出するために、多能性幹細胞の指標となる Nanog 遺伝子のプロモータ下流で GFP を発現するトランスジェニックマウス (Nanog-GFP マウス) 由来 GS 細胞の樹立に取り組んだ。GS 細胞が樹立できるマウス系統の ICR に戻し交配したマウスを用いることにより、Nanog-GFP GS 細胞を樹立することに成功した。

次にエピジェネティック制御の一つであるヒストン修飾について、GS 細胞での遺伝子発現データを元に 20 の標的遺伝子候補を絞り込んだ。候補遺伝子には H3K9 メチル化を制御する G9a/G9b 遺伝子、H3K4 メチル化を制御する Mll 遺伝子、H3K27 メチル化を制御する Ezh2/Ring1 遺伝子が含まれる。これらの遺伝子に対してレンチウイルス shRNA ベクターを導入し、標的遺伝子の mRNA 発現を低下させることができた。しかしこれらヒストン修飾遺伝子のノックダウンでは Nanog 遺伝子発現が亢進や mGS 細胞への変化は見られなかった。

さらに、ヒストン修飾経路と並んで重要な Small RNA 経路を制御する Droscha, Dgcr8, Argonaute, Piwi などの遺伝子に対してヒストン修飾遺伝子同様 GS 細胞内でこれらの mRNA 発現を低下させた。また small RNA 経路のうち miRNA 経路で特に重要な Dicer 遺伝子のコンディショナル欠損マウス由来 GS 細胞を樹立し、この GS 細胞に Cre リコンビネースを発現するアデノウイルスベクターを感染させて Dicer 遺伝子ノックアウト GS 細胞を作出した。Dicer 遺伝子ノックアウト GS 細胞は精子形成能など GS 細胞の性質を保ったまま維持培養することが見出された。しかしこれら small RNA 遺伝子のノックダウンや Dicer 遺伝子のノックアウトでも GS 細胞から mGS 細胞への変化は見られなかった。

本研究で検討したヒストン修飾および small RNA 経路の破綻では mGS 細胞が誘導出来なかった。したがって GS 細胞の多能性は複数の遺伝子によって複雑に制御されていることが示唆され、単一の遺伝子だけではなく複数の遺伝子ノックダウンを組み合わせると mGS 細胞を誘導する方法を検討する必要があると考えられる。

本研究機関内に mGS 細胞を安定的に誘導する方法は開発できなかったが、様々なエピジェネティック制御遺伝子を発現抑制することにより GS 細胞の増殖/生存に必要なエピジェネティック制御遺伝子が見出された。ヒストン H3K9 メチル化酵素 G9a および Glp 遺伝子、H3K4 メチル化酵素 Mll, Ash2l 遺伝子などのノックダウンは GS 細胞の細胞死を促す。そのため細胞死抑制とこれら遺伝子ノックダウンを併せた mGS 細胞誘導方法について今後検討していく必要がある。またこれらの知見は GS 細胞の自己複製機構を理解する上でも重要である。

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) Masuda, T., Itoh, K., Higashitsuji, H., Higashitsuji, H., Nakazawa, N., Sakurai, T., Liu, Y., Tokuchi, H., Fujita, T., Zhao, Y., Nishiyama, H., Tanaka, T., Fukumoto, M., Ikawa, M., Okabe, M., Fujita, J. (2012) “Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrklb/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice.” *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 109, 10885-10890. (査読あり) DOI: 10.1073/pnas.1121524109

(2) Morimoto, H., Lee, J., Tanaka, T., Ishii, K., Toyokuni, S., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T. (2012) “In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection.” *Biology of Reproduction* 86, 1-11. (査読あり) DOI: 10.1095/biolreprod.111.095307

(3) Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Takehashi, M., Morimoto, H., Shinohara, T. (2011) “Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier.” *Cell Stem Cell* 9, 463-475. (査

読あり) DOI: 10.1016/j.stem.2011.08.011

(4) Tanaka, T., Hosokawa, M., Vagin, VV., Reuter, M., Hayashi, E., Mochizuki, AL., Kitamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, G., Okawa, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sachidanandam, R., Hannon, GJ., Pillai, RS., Nakatsuji, N., Chuma, S. (2011) “Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis.” *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 108, 10579-10584. (査読あり) DOI: 10.1073/pnas.1015447108

(5) Kanatsu-Shinohara, M., Kato-Itoh, M., Ikawa, M., Takehashi, M., Sanbo, M., Morioka, Y., Tanaka, T., Morimoto, H., Hirabayashi, M., Shinohara, T. (2011) “Homologous recombination in rat germline stem cells.” *Biology of Reproduction* 85, 208-217. (査読あり) DOI: 10.1095/biolreprod.111.090837

[学会発表] (計 1 件)

① 蛋白研セミナー (招待講演), 平成 23 年 12 月 1 日, 大阪大学 蛋白質研究所 「インテグリンシグナルによる精子幹細胞制御」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 敬 (TANAKA TAKASHI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：40579265

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし