

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791859

研究課題名(和文) 哺乳類 ES 細胞からの半数体生殖細胞の誘導

研究課題名(英文) Induction of haploid germ cell from mammalian embryonic stem cell

研究代表者

竹原 俊幸 (TAKEHARA, Toshiyuki)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60580561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：ストレス因子に着目し、生体内の環境を模した培養環境を作り出し、ES細胞から半数体生殖細胞の誘導とその評価を試みた。本研究では体内における生殖細胞の発生過程を模範するため、ES細胞からエピプラスト幹細胞(EpiSC)の誘導、始原生殖細胞の誘導という2段階の誘導方法の検討を行った。得られた誘導細胞は、始原生殖細胞特異的なマーカーを発現していた。さらに、始原生殖細胞で特徴的に生じるインプリンティング遺伝子の脱メチル化も認められた。また、これらの誘導細胞を不妊雄マウス精巣内に移植すると精子様細胞の出現が認められた。以上より、ES細胞から生殖細胞の誘導が可能であるという結論が得られた。

研究成果の概要(英文)：Although several researches for mechanism of germ cell development in mammal are proceeding to date, it almost remains unclear. Recently, it is attempted to get the germ cell or to elucidate the molecular mechanism of gametogenesis by the differentiation induction to germ cell from embryonic stem cell (ESC) in vitro. However, it is still difficult to obtain normal germ cell because almost reports showed that inducing cells were abnormal meiosis and low efficiency. In this study, we aimed to obtain primordial germ cell under in vitro culture condition, we induce to primordial germ cell from ESC. To visualize the germ cell marker, we used Oct4-dePE GFP marker. We tried to induce by consideration of in vivo environment of embryogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：生殖細胞誘導 ES細胞 低酸素培養 再生医療 始原生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

不妊治療の対象患者数は年々増加する傾向にあり、それに伴って現在の医療技術では対応できない症例も増加している。例えば、早発卵巣不全や非閉塞性無精子症など、配偶子形成に異常が認められた場合の根本的な治療も、現行の不妊治療では難しいのが現状である。少子化の進行を考えると、有効な不妊治療技術の開発は要求性の高い課題の一つであるといえる。しかし、前述したように哺乳類における生殖細胞の発生機構は不明な点が多く残っている。

生殖細胞の運命決定機構やその固有の機能をもたらす分化機構は、体内における観察が困難など方法論的にアプローチが難しく、長い間未解明であった。現在、体外培養環境下で生殖細胞の形成を観察するツールとして、胚性幹細胞(Embryonic stem cells;ES 細胞)を用いた生殖細胞の獲得が試みられている。ところが、ES 細胞からの生殖細胞の誘導効率は非常に低く、体外培養環境下での正常な半数体生殖細胞の作製は未だに成されていない。そこで、安定的にかつ汎用的に ES 細胞から生殖細胞誘導モデルの作製が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、多能性幹細胞である ES 細胞から生殖細胞を誘導する際に、生体内の環境を体外で作りに出すことで、生殖細胞を誘導すること目的とした。特に、安定的且つ汎用性の高い生殖細胞の誘導方法の開発を実施するため、外来因子である成長因子を使用しない培養環境、及びマウスだけでなくヒト前臨床モデルとして使用されているカニクイザルを由来とした ES 細胞を実験材料に、生殖細胞の誘導方法の開発を計画した。

大きく3つの研究段階：生殖細胞関連遺伝子を指標としたレポーター遺伝子を導入した細胞株を樹立し、生殖細胞の分化誘導法を構築する。低温度培養環境における最適な誘導条件の検討し、ストレス応答における生殖細胞誘導への影響を明らかとす

る。核相の変化などを観察することで正常に減数分裂を完了した半数体細胞であるかを観察し、また、受精能及び発生能についても検討を実施した。

3. 研究の方法

まず本研究を進めるにあたり、研究材料としてマウス及びカニクイザルを選択した。マウスは実験動物として確立されており、遺伝情報などが豊富である。また飼育コストなどの観点から扱いが比較的容易であるため、これをモデルした実験が多く行われている。しかし、ヒトモデルとして考慮した場合、マウスは霊長類と比較して生理的に異なる点が多いため、直接得られた研究が反映できない可能性がある。そこで、ヒトと同じ霊長類であるカニクイザルをモデルとしたシステムを構築することは、霊長類の生殖細胞の発生機構の解明にとって有用であり、新しい概念に基づいた創薬、治療法の開発に直結すると考えられる。

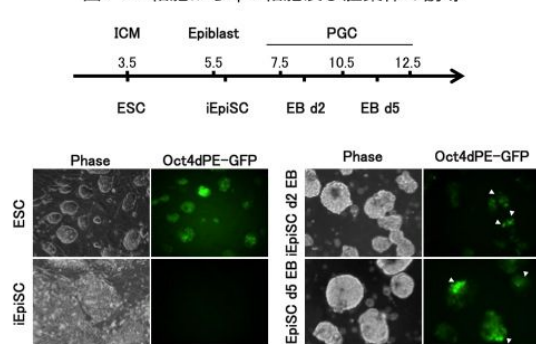
そこで、研究を進めるため、生殖細胞の誘導を行なうにあたり、誘導の際に、生殖細胞の出現を可視化できるようにすることを目的に、Oct4-dePE GFP をレポーター遺伝子として導入した細胞を作製した。その後、体外受精あるいは卵子細胞質内注入法を用いて受精能及び発生能(産子作出)の観察を行い、生殖細胞としての能力を検討する。さらに誘導方法として2段階培養を構築した。通常生体内の発生では、着床前及び着床後、そしてその後の発生に伴って酸素濃度が変化することに注目し、酸素濃度を变化させた培養環境を利用し、ES 細胞から EpiS 細胞そして、その後の始原生殖細胞への誘導及び不妊雄マウス精巣への移植を実施した。発生してきた細胞を評価するための生殖細胞関連遺伝子マーカーは、PGCs 以降の生殖細胞で特異的に発現する Vasa 遺伝子、及び減数分裂を完了した半数体精子細胞において発現が認められる Protamine 遺伝子を指標とした。また同時に、始原生殖細胞及び生殖細胞で特異的に機能する遺伝子を Realtime-PCR、Westernblot、蛍光免疫染色、フローサイト

メトリーなどを使用し、生殖細胞が発生していることを多方面から評価した。

4. 研究成果

本実験で実施した方法は、体内における生殖細胞の発生過程を模範するため、ES細胞からエピプラスト幹細胞(EpiSC)の誘導 始原生殖細胞の誘導という2段階の誘導方法の検討を行った。まず、この誘導方法は、胚発生時の着床前後において酸素濃度の低下が起こることを考慮し、同様に分化誘導環境の酸素濃度を低くしES細胞からEpiSCへの誘導を試みた。すると、ES細胞から効率よくEpiSCへと誘導が行うことができ、その性質を維持したまま培養することが可能であった(図1)。

図1: ES細胞からEpiSC細胞及び胚葉体の誘導

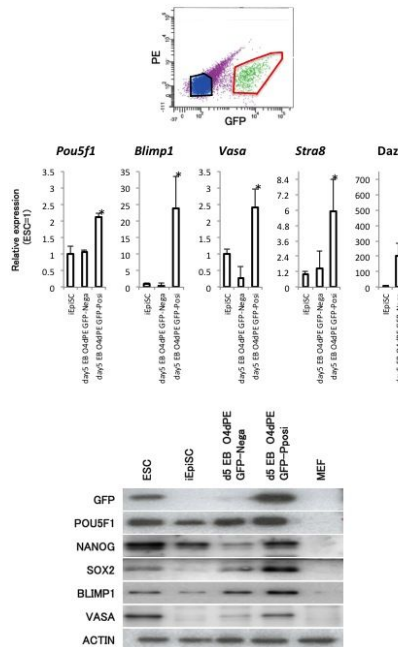


次に、この得られた細胞から、始原生殖細胞を誘導できるか検討を行った。誘導法には Oct4-dePE GFP をレポーター遺伝子として導入し、胚葉体を介した分化誘導を行った。その結果、GFP 陽性細胞が培養5日目において出現し、それらは始原生殖細胞の性質を有していた(図1)。

GFP 陽性細胞は、生殖細胞のマーカでもある Oct4 を発現していることになるため、GFP 陽性細胞のみをセルソーターを利用し、単離した後に、始原生殖細胞として機能があるかどうか Realtime-PCR や Westernblot を使用し解析を行なったところ、GFP 陽性細胞において始原生殖細胞特異的に発現している遺伝子: Blimp1, Vasa, Stra8, DazL の発現が上昇していることが明らかとなった。これによって始原生殖細胞

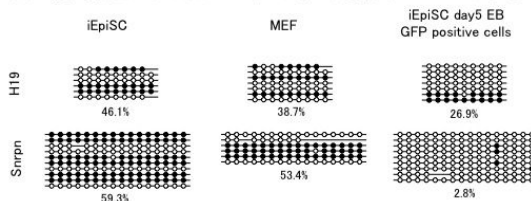
へと誘導されている可能性が示唆された(図2)。

図2: GFP陽性細胞における始原生殖細胞マーカーの発現解析



また、始原生殖細胞の大きな特徴でもあるインプリンティング遺伝子の脱メチル化についても解析を行なった。Bisulfite-Sequencing 法を用いて移動後期始原生殖細胞で脱メチル化する遺伝子: Snrpn 及び H19 について、誘導細胞においてメチル化の変化が生じているか観察したところ、Snrpn、H19 共に顕著に脱メチル化が誘導されていたことから、移動後期始原生殖細胞へと誘導されていると考えられる(図3)。

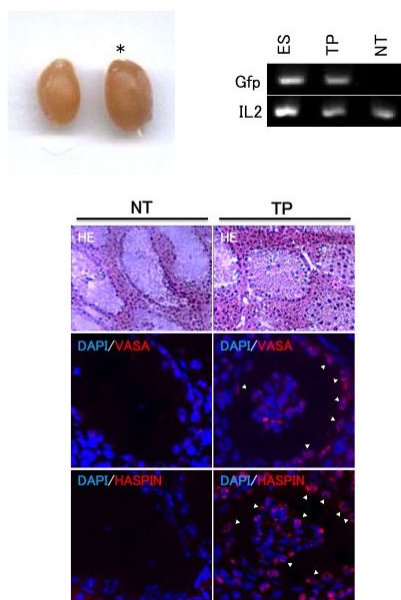
図3 誘導細胞におけるインプリンティング遺伝子のメチル化状態



次に、得られた始原生殖細胞であると考えられる細胞を、不妊雄マウス精巣内へ移植した。移植一ヶ月後に精巣を回収し、DNAを抽出し移植細胞が実際に存在するのかを検討したところ、移植細胞由来の GFP 遺伝子の増幅が認められたことから精巣内に移植細胞が存在することがわかった。また、

回収した精巣から組織切片を作製し、HE染色及び生殖細胞特異的に発現している VASA 及び HASPIN タンパク質が存在するか免疫染色を用いて解析を行なったところ、非移植細胞では細胞の存在が認められないが、細胞移植細胞では精子様の細胞が存在し、また VASA 及び HASPIN タンパク質を発現する細胞の存在が観察された(図4)。

図4: 精巣移植による生殖細胞発生能の検討



次の段階としてこれまでに得られた知見を利用し、ヒトモデルとしてカニクイザル ES 細胞からも同様に分化誘導が可能かどうか検討を行った。始原生殖細胞マーカーである Blimp1 遺伝子の発現が促進されていたことから、生殖細胞が誘導されていると考えられる。

以上のことから、当初はストレス環境として低温度を目的としていたが、同様に生体内において生殖細胞の発生に関するストレス因子である酸素濃度に注目し、本研究では実際にマウス及びカニクイザル ES 細胞から「低酸素培養による始原生殖細胞の誘導」が可能となった。特に、得られたマウス細胞では実際に「精細管内に生着し、精子様細胞へと分化する」ことが明らかとなった。また、本研究では、マウスだけでなく、ヒト前臨床モデルとしてカニクイザ

ル ES 細胞を用いても同様に誘導が可能であったことから、汎用的な誘導技術を構築できたと考えられる。以上のことから、半数体精子細胞を得る方法として、低酸素環境を利用した誘導方法はマウスだけでなく、その他の動物種においても有効であると考えられる。

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 6 件)

Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Fukuda K. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates Rho/ROCK induced Sox9 diminution in chondrocytes. Acta Medica Kinki University 巻 38 No.2 2013 □ 査読：有り

Teramura T, Sugimoto H, Frampton J, Kida Y, Nakano M, Kawakami M, Izumi H, Fukunaga N, Onodera Y, Takehara T, Fukuda K, Hosoi Y. Generation of Embryonic Stem Cell Lines from Immature Rabbit Ovarian Follicles. Stem Cells Dev. 2013 Mar 15;22(6):928-38. 査読：有り

Teramura T, Onodera Y, Takehara T, Frampton J, Matsuoka T, Ito S, Nakagawa K, Miki Y, Hosoi Y, Hamanishi C, and Fukuda K. Induction of Functional Mesenchymal Stem Cells in Severe Hypoxic Condition from Rabbit Embryonic Stem Cells. Cell Transplantation. 2013;22(2):309-29.. 査読：有り

Nakagawa K, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Hamanishi C, Akagi M, Fukuda K. Cyclic compression-induced p38 activation and subsequent MMP13 expression requires Rho/ROCK activity in bovine cartilage explants. Inflamm Res. 2012 Oct;61(10):1093-100. 査読：有り

Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Nakagawa K, Hamanishi C, Fukuda K. Mechanical stimulation of cyclic tensile strain induces reduction of pluripotent related gene expressions via activation of Rho/ROCK and subsequent decreasing of AKT phosphorylation in human induced pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan13;417(2):836-41. 査読：有り

Takehara T, Teramura T, Onodera Y, Hamanishi C, Fukuda K. Reduced oxygen concentration enhances conversion of embryonic stem cells to epiblast stem cells. Stem Cells Dev. 2012 May 20;21(8):1239-49. 査読：有り

[学会発表](計 5件)

第 13 回日本再生医療学会総会、「ウサギ体外成熟卵子をレシピエント卵子とした核移植胚由来 ES 細胞の樹立」竹原俊幸、木田雄太、中野美穂、杉本浩伸、寺村岳土、小野寺勇太、細井美彦、福田寛二. 2014 年 3 月 4 日、京都国際会議場、京都

11th International Society for Stem Cell Research, Annual Meeting、
「INDUCTION OF DIFFERENTIATION INTO PRIMORDIAL GERM CELL FROM EPIBLAST STEM CELL DERIVED FROM MOUSE EMBRYONIC STEM CELL」Toshiyuki Takehara, Takeshi Teramura, Yuta Onodera, Kanji Fukuda. 2013 年 6 月 13 日、ボストン、アメリカ

第 12 回日本再生医療学会、「CBP/catenin シグナル経路の活性化がマウス多能性幹細胞の形質転換に及ぼす影響」竹原俊幸、寺村岳土、小野寺勇太、福田寛二. 2013 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜、横浜

10th International Society for Stem Cell Research, Annual Meeting

「Differentiation reversibility between mouse embryonic stem cells and epiblast stem cells」Toshiyuki Takehara, Takeshi Teramura, Yuta Onodera, Chiaki Hamanishi, Kanji Fukuda. 2012 年 6 月 12-16 日、パシフィコ横浜、横浜

第 11 回日本再生医療学会、「マウス ES 細胞からの生殖細胞誘導の試み」竹原俊幸、寺村岳土、小野寺勇太、浜西千秋、福田寛二. 2012 年 6 月 12 日、パシフィコ横浜、横浜

[その他]

ホームページ等

近畿大学 高度先端総合医療センター 再生医療部

<http://www.med.kindai.ac.jp/stemcell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原 俊幸 (TAKEHARA, Toshiyuki)

近畿大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60580561