

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24651223

研究課題名(和文) Cadm1 マーカーを利用したホモ接合生殖幹細胞の作製法の確立

研究課題名(英文) Preparation of the stem cells from homofused spermatids by monitoring Cadm1 marker

研究代表者

桃井 隆 (MOMOI, TAKASHI)

東京医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：40143507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：精祖細胞を(GDNF, LIF, FGF, EGFを含む)培地で培養することで生殖幹細胞を作製可能である。精祖細胞や卵母細胞をヒトから分離することは倫理的に問題があることから、半数体の精子細胞を分離し、ヘテロ生殖幹細胞を作製することを目的とした。精祖細胞に局在するCadm1のプロモーターに蛍光蛋白を発現させてTgマウスから精子細胞を分離し、融合させ、精粗細胞培地にて培養した。蛍光陽性細胞は得られたが、持続培養可能な細胞株として分離できなかった。分離の間にインテグリンの生存シグナル、RA70/Scap2, が減少した結果によると思われる。今後は精子細胞の細胞死を抑制させることが不可欠である。

研究成果の概要(英文)：It is possible to establish the pluripotent germinal stem cells by incubating the spermatogonia cells in the medium containing GDNF, LIF, FGF and EGF etc. To overcome the ethical problems to the human germ cells, we tried to prepare the germinal stem cells by the method of electronic fusion of spermatids. We prepared the Tg mouse expressing Cadm1 promoter-fluorescent proteins, which specifically express them in the spermatogonia. We isolated spermatids from testis of Tg mouse, fused them and incubated for about 1 to 2 month. However, they could not permanently live under the condition because of the lack of integrin survival signals, RA70/Scap-2, during isolation of spermatids from testis.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：spermatogonia Cadm1 stem cells integrin survival signal

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞、iPS 細胞、生殖幹細胞などさまざまな幹細胞が報告されているが、移植にマッチする HLA は 1/10000 であることから、幹細胞治療が広く社会的に利用されるためには、幹細胞バンクの設立が必要である。iPS 細胞も倫理、拒絶反応を回避することが可能であるが、自己に限定され、遺伝性疾患の治療には応用できない。幹細胞バンクの問題点は、HLA のマッチングする膨大な幹細胞の維持管理にある。

1-1)着想に至った経緯:

Spermatogonia(精祖細胞)を(GDNF, LIF, FGF, EGF を含む培地)培養維持し、多分化能をもつヘテロ生殖幹細胞を作製すること可能である。減数分裂後の 2 次精母(卵母)細胞をホモ接合し、安定したホモ接合精祖細胞を効率よく分離維持できれば、ホモ接合生殖幹細胞の作製が可能であると着想した。Cadm1 は申請者が発見したシナプス接着蛋白(RA175/SynCAM1)であるが、精巣では精祖細胞と一次精母細胞に局在し(Fujita et al., 2006)、欠損マウスは精子形成不全をもたらす(Fujita et al., 2008、図 1)。

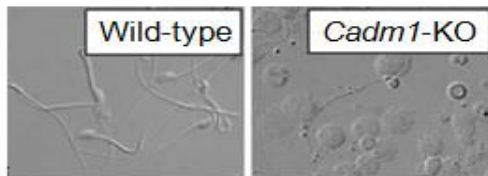


図 1. Cadm1-KO マウスの精子形成不全

1-2)国内・国外の研究動向及び位置づけ; Spermatogonia からのヘテロ生殖幹細胞作成は篠原(京大)、Bristner(Max-Plank)らにより報告されている。また、ホモ接合生殖幹細胞は 2003 年に報告があるが、作製の再現性に問題があり、現在に至るまでその詳細は報告されていない。本研究では、Cadm1 プロモーターを用いて、蛍光蛋白を発現させた Tg マウスの減数分裂後の 2nd 精母細胞を融合し、FACS を併用することで、ホモ(接合)生殖幹細胞を作製し、ホモ接合生殖幹細胞からの神経筋分化の条件を確立することを着想した。

2. 研究の目的

本研究は減数分裂後の 2 次精母(卵母)細胞を融合し、ホモ接合した生殖細胞(Spermatogonia)の作製とホモ接合生殖細胞の簡易作製方法の確立を目的とした。

Cadm1 プロモーターの下流に蛍光タンパク RFP(red)をつなげた Bac-Cadm1-RFP-Tg セミノックインマウスを作製した(図 2)。

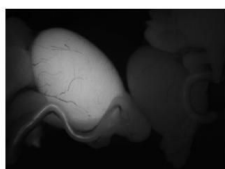


図 2 . Bac-Cadm1-RFP マウス精巣(左)と WT(右)

このマウス精巣(あるいは卵巣)から Cadm1 陰性の Spermatocytes や spermatid を、電気パルス融合でホモ接合させ、FACS を用いて RFP 陽性細胞(精祖細胞)を得ることができる。さらにこのマウスと Oct4-GFP-Tg マウス(Jackson Lab)とを交配したマウスから、ホモ接合生殖細胞(RFP+精祖先細胞)を得たのち、培養後、FACS を用いて、Cadm1(RFP-)Oct4(GFP+)細胞としてホモ接合生殖幹細胞の分離が可能となると考えた(図 3)。

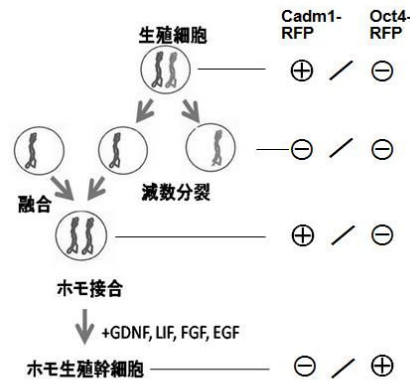


図 3 . ホモ接合生殖幹細胞の作製

3. 研究の方法

Spermatogonia(精祖細胞)を培地(GDNF, LIF, FGF, EGF を含む培地)で培養することが可能であり、多分化能をもつ生殖幹細胞を作製することが可能である。精祖細胞や卵母細胞をヒトから分離することは倫理的に問題があることから、半数体の精子細胞を分離し、ヘテロ生殖幹細胞の作製を目的とし、今回はまずマウスでの実験を行った。申請者が発見したシナプス接着蛋白 Cadm1 (RA175/SynCAM1)が、精巣では精祖細胞と一次精母細胞や精子細胞に局在して(Fujita et al., 2006)することから、Cadm1 プロモーターに蛍光蛋白を発現させて Tg マウスを作製した(図 2)。

4. 研究成果

半数体の精子細胞を分離するには十分でないことから、精子細胞のマーカーを探索したところ、申請者が発見したレチノイン酸に誘導される RA70/Scap2 はそのマーカーとして使えることが明らかとなった(図 4)。これらのマーカーを用いて、精子細胞を分離し、電気パルスを用いて精子細胞を融合させ、精祖細胞培地にて培養したが、GFP が弱いながら陽性の細胞を得ることができたが、培養可能な細胞株として分離することができなかった。

LacZ を RA70/Scap2 の第一エクソンに導入することで欠損マウスを作製したところ、欠損マウスは致死であった。

解析の結果、RA70Scap2 は生存シグナルで

あるインテグリンの下流に位置し、RA70/Scap2 は発生初期では神経管形成過程に発現している(図 6)ことから、RA70Scap2KO マウスでは、マトリクスからの生存インテグリンのシグナルが断たれたため、アノキスによる細胞死が働き、胎生致死にいたったと結論した。どのように、精巣から精子細胞を分離することで、マトリクスからの分離はインテグリン生存シグナルを断つことを意味しおり、精子細胞はアノキスによる細胞死が誘導された可能性が高いと結論した。

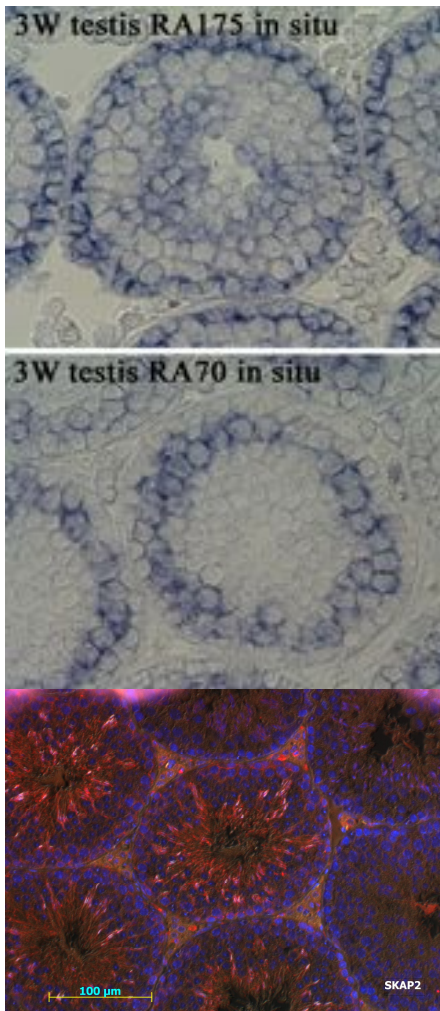


図 4 RA70/Scap2 の精巣での局在上 ; In Situ ハイブリダイゼーション、下 ; 免疫染色 (赤、RA70/Scap2 ; 青、核)

Bac-Cadm1-RFP/Oct4-GFP-Tg マウスの 2 nd 精母細胞を融合し、GFP と RFP の蛍光標識と FACS を用いて、容易かつ再現性の高い方法論でホモ(接合)生殖幹細胞の分離することが可能となった。また、ホモ(接合)生殖幹細胞により HLA の制約を大幅に減少させた多分化能をもつ幹細胞が可能となり、幹細胞の保存維持管理が容易で、幹細胞バンクの設立により、遺伝性疾患への幹細胞治療など幹細胞を広く治療に用いてもらう可能性がひろがった。

しかし、RA70/Scap2 はインテグリンの生存シグナルとして組織形成に参与していることから、精子細胞を分離している間に、生存シグナルが減少したために、精子細胞の生存が難しかったと考えられる。今後は精子細胞の生存シグナルを増強させるか細胞死を抑制させる条件を確立することが、ホモヘテロ精子細胞融合による生殖幹細胞の樹立には不可欠である。

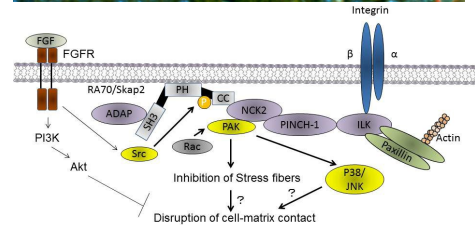
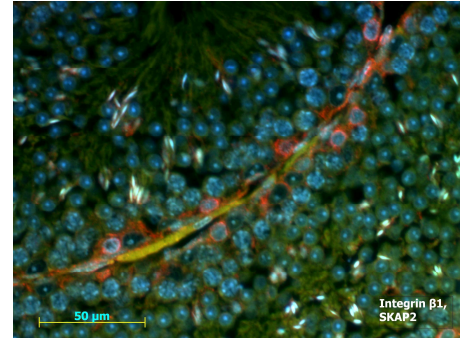


図 5 精巣内インテグリンの局在と生存シグナル。上 ; 精巣内でのインテグリン (赤) の局在。下 ; インテグリン生存シグナルと細胞死アノキス



図 6 RA70/Scap2 の LacZ 染色。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1 . Tanabe Y, Shiota A, Kouroku-Murakami Y,

- Fujita-Jimbo E, Urase K, Takahashi K, Mezaki Y, Senoo H, Momoi T. Spatial and temporal expression of RA70/Scap2 in the developing neural tube. *Neurosci Lett*. 2014;576:1-5. doi: 10.1016/j.neulet.2014.05.013. 査読有
2. Golan N, Kartvelishvily E, Spiegel I, Salomon D, Sabanay H, Rechav K, Vainshtein A, Frechter S, Maik-Rachline G, Eshed-Eisenbach Y, Momoi T, Peles E. Genetic deletion of *Cadm4* results in myelin abnormalities resembling Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Neurosci*. 2013;33(27):10950-10961. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0571-13.2013. 査読有
3. Tanabe Y, Fujita E, Hayashi YK, Zhu X, Lubbert H, Mezaki Y, Senoo H, Momoi T. Synaptic adhesion molecules in *Cadm* family at the neuromuscular junction. *Cell Biol Int*. 2013;37(7):731-736. doi: 10.1002/cbin.10092. 査読有
4. Tashiro E, Zako T, Muto H, Ito Y, Sörgjerd K, Terada N, Abe A, Miyazawa M, Kitamura A, Kitaura H, Kubota H, Maeda M, Momoi T, Iguchi-Arigo SM, Kinjo M, Ariga H. Prefoldin protects neuronal cells from polyglutamine toxicity by preventing aggregation formation. *J Biol Chem*. 2013;288(27):19958-10972. doi: 10.1074/jbc.M113.477984. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 楊志亮、小島華林、神保恵理子、山形崇倫、桃井隆、桃井真里子 . 自閉性障害原因遺伝子 *CADM1* に結合する足場タンパク *MUPP1* の遺伝子変異解析 . 第 57 回日本小児神経学会学術集会 . 2015 年 5 月 28 日、大阪
2. Jimbo E, Tanabe Y, Momoi T. *Trappc5*, a constituent of TRAPP complex, is up-regulated in cerebellum expressing *FOXP2* and involved in synaptogenesis. 第 37 回日本神経科学大会 . 2014 年 9 月 13 日、横浜
3. 田辺祐子、高鹿一村上依子、藤田一神保恵理子、浦瀬香子、高橋佳奈、妹尾春樹、桃井隆 . 第 36 回日本分子生物学会年会 . 2013 年 12 月 3 日、神戸
4. 田辺裕子、藤田恵理子、桃井隆 . マウス脳における自閉性障害に関係する *Cadm1* と *Cntnap2* 分子複合体の解析 . 第 36 回日本神経科学大会 . 2013 年 6 月 21 日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

桃井 隆 (MOMOI Takashi)

東京医科大学・医学部・客員教授

研究者番号 : 40143507

(2)研究分担者

なし