

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660255

研究課題名(和文)ダイレクト・リプログラミングによる人工精原幹細胞の作製

研究課題名(英文)Generation of induced spermatogonial stem cells by direct reprogramming

研究代表者

久保田 浩司(Kubota, Hiroshi)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：80263094

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):山中因子を分化した体細胞へ導入することにより細胞が初期化され人工多能性幹細胞(iPSC)が樹立される。山中因子によって初期化した体細胞を精原幹細胞(SSC)培養系におき、その培養選択圧下においてSSCへのリプログラミングがおこるか検討した。雄胎子線維芽細胞へ山中因子発現プラスミドを導入後、胚性幹細胞(ESC)培養条件下もしくはSSC培養条件下で培養したところ、ESC培養条件下では細胞が初期化されiPSCが誘導されたが、SSC培養条件下ではSSC様細胞もiPSCも誘導されなかった。一方、ESC培養条件下で初期化した後、SSC培養条件下におくことにより人工SSCが誘導できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子の源となる精原幹細胞を人工多能性幹細胞(iPS細胞)のように体細胞から得ることができれば、優良個体や稀少動物種の繁殖に有用である。山中因子を導入して初期化した細胞を直接精原幹細胞の培養条件下で培養することにより精原幹細胞への分化誘導を試みたところ(ダイレクト・リプログラミング)、初期化の培養条件を検討することにより人工精原幹細胞の樹立の可能性が示唆された。本研究は新たな精子産生細胞の樹立に向けて重要な知見を示すものである。

研究成果の概要(英文):Ectopic expression of Yamanaka factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) in somatic cells has been shown to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs), which are very similar to embryonic stem cells (ESCs), under ESC culture conditions. This study investigated whether somatic cells that were introduced Yamanaka factors can be reprogrammed into spermatogonial stem cells (SSCs) under SSC culture conditions. After introduction of expression plasmids for Yamanaka factors into male mouse embryonic fibroblasts (MEFs), they were cultured under ESC conditions or SSC conditions. Although iPSCs were generated in the ESC condition, neither SSC-like cells nor iPSCs were generated in SSC conditions. However, MEFs reprogrammed under the ESC condition followed by cultivation under the SSC condition generated undifferentiated cells with SSC characteristics, indicating the feasibility of generating induced SSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 分化・発生 生殖 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

山中因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) をマウス線維芽細胞へ導入後、Embryonic Stem Cell (ESC) の培養条件下で培養することにより ESC と同等の人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell; iPSC) が樹立される。一方で、山中因子を導入した線維芽細胞を Fibroblast growth factor (FGF2) と Activin A 存在下で培養すると、人工エピブラスト幹細胞 (induced epiblast stem cell; iEpiSC) が誘導されることが報告された。この実験結果は、山中因子の強制発現により線維芽細胞の分化状態を規定する転写因子ネットワークが未分化状態にリセットされるが、そのリセットされた細胞のなかから、置かれた培養条件下において増殖できる細胞が選択されることが示唆された。

2. 研究の目的

山中因子にてリセットした線維芽細胞を雄の生殖幹細胞である精原幹細胞培養条件下におくことにより、人工精原幹細胞 (induced Spermatogonial Stem Cell; iSSC) が誘導される可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリン (Tet) 応答性転写因子を恒常的には発現するトランスジェニックマウスの雄胎子より線維芽細胞を調製し、Tet 誘導プロモーター制御下にある山中因子発現プラスミドを電気穿孔法にて導入後、マウス ESC ならびにマウス SSC の培養に用いられる SNL76/7 フィーダー細胞とウサギ SSC の培養に用いられる C166 フィーダー細胞上に播種した。培養液は ESC 培地と SSC 培地を用い、Tet 誘導体 (Dox) による誘導を1週間もしくは2週間行った後、iPSC もしくは iSSC へリプログラミングされた細胞を選択的に増殖させるため Dox 非存在下で培養を続けた。継時的に多能性幹細胞に特徴的に発現するアルカリフォスファターゼ (AP) 染色を行い、AP 陽性コロニー数を計数することにより、細胞のリセットと iPSC 誘導の評価を行った。iSSC の出現は AP 発現と SSC マーカーを用いた免疫染色法により評価した。

(2) SSC 培養条件下で細胞がリセットされるか否かを検討するため、山中因子発現プラスミドを導入後、SSC 培養条件下で1週間行った後、ESC 培養条件にて培養を続け、継時的に増殖してくる細胞の性状を AP 染色ならびに免疫染色により解析した。

(3) ESC 培養条件下でリセットした細胞が SSC 培養条件下に置かれることにより iSSC が誘導されるか検討するため、山中因子発現プラスミドを線維芽細胞へ導入後、ESC 培養条件下で1週間行った後、SSC 培養条件にて培養を続け、継時的に増殖してくる細胞の性状を AP 染色ならびに免疫染色により解析した。

4. 研究成果

(1) Tet 応答性転写因子を発現する雄胎子線維芽細胞へ山中因子発現プラスミドを導入後、SNL76/7 フィーダー細胞上へ播種し、Dox 存在下で1週間培養した。ESC 培養条件では牛胎児血清 (FBS) 培地と血清代替物 (KSR) 培地を使用した。SSC 培養培地には GDNF と FGF2 を添加した無血清培地 (SFM) を用いた。1週間後、いずれの条件でも AP 陽性コロニーが誘導されることを確認した (図1)。AP 陽性コロニー数は SSC 培養条件で低下した。培養8日目に継代し、その後 Dox を除去して培養を続けたところ、KSR 培地でのみ AP 強陽性の iPSC の継続的増殖を認めた。Dox 存在下で出現した AP 陽性細胞は、いずれも iPSC マーカーである NANOG を発現していたが、SSC マーカーである ZBTB16 は発現していなかった。また、C166 フィーダー上に播種した場合、Dox 存在下では KSR 培地ならびに SFM 培地において AP 陽性コロニーの出現が認められたが、Dox を除去すると SFM 培地では、SNL フィーダー細胞と同様に AP 陽性細胞の持続的増殖は認められなかった (図2)。

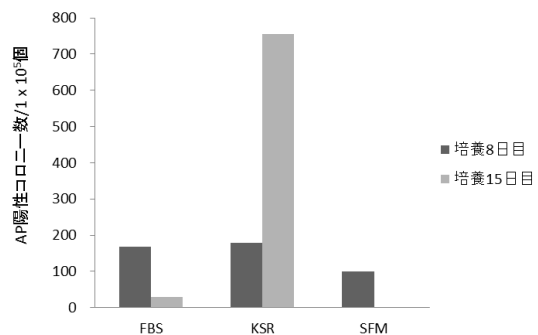


図1 SNL76/7 フィーダー細胞上に形成された AP 陽性コロニー数 (遺伝子導入細胞 1×10^5 個当たり)。培養8日目までは Dox を添加し、その後 Dox 不含培地で培養した。KSR 培地では Dox 除去後も AP 陽性細胞の増殖が観察されたが、FBS 培地と SFM 培地では AP 陽性細胞の継続的増殖は認められなかった。

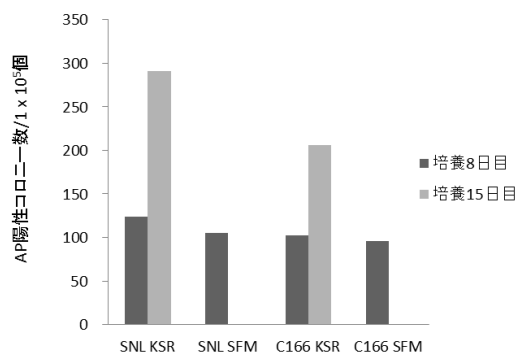


図2 C166 フィーダー細胞上に形成された AP 陽性コロニー数 (遺伝子導入細胞 1×10^5 個当たり)。培養8日目までは Dox を添加し、その後 Dox 不含培地で培養した。

以上の結果は、1 週間の山中因子の強制発現では、SNL76/7 フィーダー細胞と C166 フィーダー細胞のいずれの培養条件においても SSC へのリプログラミングは起こらないことが示唆された。Dox による山中因子の発現を 2 週間に延長した場合でも、同様に SSC 培養条件下にて AP 陽性細胞の継続的な増殖は認められなかった。Dox 存在下では、2 週目においても AP 陽性細胞の増殖がみられたが、その増殖は Dox 依存性で Dox を除去すると AP 陽性細胞の増殖は認められなかった。以上の結果より、SSC 培養条件下における山中因子の発現では、SSC へのリプログラミングが起こらないことが示された。

(2) SSC 培養条件下における山中因子の発現では、線維芽細胞が十分にリセットされていない可能性が考えられた。そこで SSC 培養条件下で山中因子を導入後 1 週間もしくは 2 週間 Dox 存在下で培養したのち、ESC 培養条件へ移行して iPSC が誘導されるか検討した。しかしこの場合も、AP 陽性細胞の増殖は認められず iPSC は誘導されなかった。このことから SSC 培養条件下における山中因子発現では、細胞のリセットが不完全であることが示唆され、胎子線維芽細胞から iPSC を誘導可能程度にまでリセットするには ES 細胞培養条件が必要であることが明らかとなった。

(3) これまでの結果から、胎子線維芽細胞を完全にリセットさせるためには ESC 培養条件が必要であることが示されたため、山中因子発現プラスミド導入後、ESC 培養条件下にて Dox による誘導を 1 週間行った細胞を SSC 培養条件に置くことにより、iSSC の誘導を試みた。遺伝子導入後、ESC 培養条件下で培養した後に SSC 培地を用いて培養を続けたところ、AP 陽性細胞の持続的増殖を認めた。この細胞の解析を免疫染色法にて行ったところ、生殖細胞マーカーである DDX4 の弱い発現を認めた(図 3、4)。一部の細胞は精原幹細胞マーカーの ZBTB16 も発現していることが明らかとなった(図 4)。この精原幹細胞培養系において増殖する細胞が精原幹細胞活性を有するかは現在不明であり、検討を進めている。

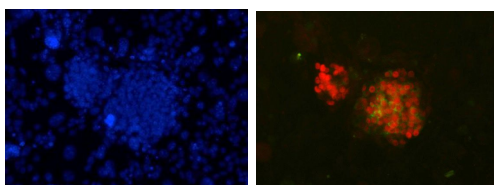


図 3 SSC 培養条件下で増殖する AP 陽性細胞における NANOG と DDX4 の発現解析。
左図：DAPI 染色による核の対比染色像
右図：抗 NANOG 抗体と抗 DDX4 抗体を反応させたのち蛍光色素 Alexa568(赤色)もしくは Alexa488(緑色)で標識した 2 次試薬により抗 NANOG 抗体と抗 DDX4 抗体を検出し

た染色像(右図と左図は同視野)。

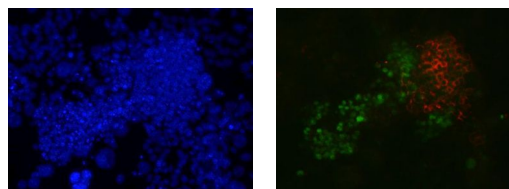


図 4 SSC 培養条件下で増殖する AP 陽性細胞における DDX4 と ZBTB16 の発現解析。
左図：DAPI 染色による核の対比染色像
右図：抗 DDX4 抗体と抗 ZBTB16 抗体を反応させたのち蛍光色素 Alexa568(赤色)もしくは Alexa488(緑色)で標識した 2 次試薬により抗 DDX4 抗体と抗 ZBTB16 抗体を検出した染色像(右図と左図は同視野)。

以上の結果から、精原幹細胞培養条件は山中因子による胎子線維芽細胞の初期化には不十分であること、ES 細胞培養条件下にて初期化され誘導された未分化生殖細胞様細胞は精原幹細胞培養条件下においても自己複製可能であることが示唆された。ほとんどの細胞は精原幹細胞マーカーを発現していなかったが、一部の細胞は生殖細胞マーカーと精原幹細胞マーカーを弱く発現していたことから、今後培養条件等を検討することにより精原幹細胞へ移行する可能性が示唆された。

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 3 件)

Kazue Kakiuchi, Ayaka Tsuda, Yuki Goto, Takanori Shimada, Kazumi Taniguchi, Kiyohiko Takagishi, Hiroshi Kubota, (2014): Cell-Surface DEAD-Box Polypeptide 4-Immunoreactive Cells and Gonocytes Are Two Distinct Populations in Postnatal Porcine Testes. *Biology of Reproduction*, 査読有、90:82.

Kazue Kakiuchi, Kazumi Taniguchi, Hiroshi Kubota, (2018): Conserved and non-conserved characteristics of porcine glial cell line-derived neurotrophic factor expressed in the testis. *Scientific Reports*, 査読有、8: 7656.

Hiroshi Kubota, Ralph L. Brinster, (2018): Spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction*, 査読有、99: 52.

〔学会発表〕(計 4 件)

垣内 一恵、久保田 浩司、「精巣にお

ける細胞表面 DDX4 陽性細胞は生殖幹細胞か」第 37 回 日本分子生物学会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川）

久保田 浩司、「哺乳動物精原幹細胞の共通性と多様性」、京都大学霊長類研究所共同利用研究会「霊長類への展開に向けた幹細胞・生殖細胞・エピゲノム研究」、2014 年 8 月 26 日、京都大学霊長類研究所（愛知）

Kazue Kakiuchi、Kiyohiko Takagishi、Hiroshi Kubota、「Proteomic profiling of nuclear proteins in mouse spermatogonial stem cells undergoing differentiation」、第 36 回 日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド（兵庫）

Kazue Kakiuchi、Kiyohiko Takagishi、Hiroshi Kubota、「Comparative nuclear proteomic analysis of stem spermatogonia and differentiating spermatogonia induced by retinoic acid」、12th Human Proteome Organization World Congress (HUP02013)、2013 年 9 月 16 日、パシフィコ横浜（神奈川）

〔その他〕

北里大学獣医学部ホームページ
<http://www.kitasato-u.ac.jp/vmas/faculty/as/news/n20140422.html>
Global Medical Discovery Key
Scientific Article
<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/cell-surface-dead-box-polypeptide-4-immunoreactive-cells-gonocytes-two-distinct-populations-inpostnatal-porcine-testes/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 浩司 (Kubota Hiroshi)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号：80263094

(2) 連携研究者

垣内 一恵 (Kakiuchi Kazue)
北里大学・獣医学部・助教
研究者番号：90509184