

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670087

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞Muse細胞からの精子細胞系樹立の試み

研究課題名(英文) Approach for establishment of spermatogenic cells from Muse cells

研究代表者

年森 清隆 (Toshimori, Kiyotaka)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20094097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Muse細胞を長距離輸送してその日のうちに移植することは時間的に制約が大きかったため、その解消方法を模索した。研究期間途中で発表されたSTAP細胞誘導方式の酸処理からの誘導を試みたが、移植した細胞は自家蛍光を持つ細胞が若干生存しただけであった。GFP-Muse細胞は移植前の移植用培地に入れる時間を可能な限り短時間する方法が良かったが、現時点では移植3ヶ月後にはGFPシグナルが認められない。Muse細胞は、精細胞系列の細胞が持っている遺伝子を数種類もっているが、精細胞系列方向への誘導にはさらに中間的な遺伝子の発現が必要であった。さらなる遺伝子あるいは外来性補助因子の併用を考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：To reduce the stress of Muse cells caused by long time transportation, we tried the newly reported method such as STAP cell induction (acid treatment) during the middle stage of this project. The result was that the Muse cells were not induced toward the germ cell line after the acid treatment, and showed only the cell debris/vestage. Although the Muse cells could tolerate the long time transportation, albumin-lacked medium and shorter time incubation before injection was required for injection of survived enough numbers of Muse cells without the cell aggregation. Muse cells have originally some genes that spermatogenic cells have, but these genes only are not enough for Muse cells to initiate the differentiation toward the spermatogenic cell line. It is supposed that some additional genes or supplements such as hormones and vitamins will be required in some period to initiate the differentiation of the Muse cells toward the spermatogenic cell line.

研究分野：Reproductive Medicine

キーワード：Muse細胞 精巣移植 精子形成 精子

1. 研究開始当初の背景

ヒト生殖細胞の樹立はまだ誰も成功していない。精細胞系列を誘導するために必要な遺伝子群が次第に判明してきたが、これらの成果はマウス細胞を用いたものであり、ヒトに関してはまだ不明なことばかりであるため、ヒトへの応用を念頭においた情報の蓄積が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「ヒト多能性幹細胞 Muse 細胞からの精子細胞系樹立の試み」であり、この目的のために有用な情報を蓄積する。

3. 研究の方法

ヒト多能性幹細胞 Muse 細胞がヒト精子細胞系列に分化誘導するために条件や遺伝子導入が必要であるかないかを確認し、必要ならばどの遺伝子が特定する。特定した遺伝子を培養細胞系に導入し、Muse 細胞系使用条件を確立する。最終的に、精細胞系細胞として分化誘導方法を確立する。

4. 研究成果

これまでに分かっていた移植用培地にアルブミンを入れずに微小注入(移植)することが良いことの再現はとれた。しかし、Muse 細胞を調整後長距離運搬してその日のうちに W/Wv ミュータント雄マウスの精巣内(セルトリ細胞はいるが精細胞幹細胞がない精巣内)に微小注入することは時間的にかなり無理があり、効率的でなかった。その解消のため、研究期間の途中で発表された STAP 細胞方法(酸処理を主体とした)を用いて検討したが、酸処理後に短期培養して移植した細胞は自家蛍光を持つ細胞が若干生存しただけで長期生存に至らなかった。GFP-Muse 細胞は移植前の移植用培地内での保存処理を可能な限り短時間にして移植する方法が良かったが、現時点では移植 3 ヶ月後に GFP シグナルが認められなくなる。遺伝子導入の検討を開始するため、始原生殖細胞から精原細胞や精子幹細胞で発現する段階的な遺伝子発現のなかで可能な遺伝子を検討し、その絞り込みを行った。ヒトにおける情報が無かったため、マウスの情報をもとにカスケード的に発現する順番とその組み合わせを最初に検討した。その結果、Muse 細胞は精細胞系列が発現している遺伝子のうち、Cd9 等の数種類の遺伝子を既存のものとして持っていた。この情報をもとに遺伝子の種類と組み合わせを検討することから始めたが、結果的には现阶段では本来持っている遺伝子だけでは精細胞系列の初期段階への分化誘導には不十分であるとの結論に達している。外来性補助因子(ホルモン等)の併用については、遺伝子導入との関係でどの時点で併用するかについても検討事項として残った。

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 10 件)

1. Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. Analysis of the complexity of the sperm acrosomal membrane by super-resolution stimulated emission depletion microscopy compared with transmission electron microscopy. *Microscopy*. 2014. In press.(doi: 10.1093/jmicro/dfu101) 査読有
2. Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, Tanaka A, Ito C, Toshimori K, Ogawa N, Terashima T, Maegawa H, Yanagisawa D, Tooyama I, Tada M, Onodera O, Hayasaka K. A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet*. 95(3): 294-300. 2014. (doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.013) 査読有
3. Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, Matsuzaki H, Hagiuda J, Ishikawa H, Mochida K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Noce T, Ito C, Toshimori K, Narimatsu H. A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(3):1120-1125. 2014. (doi: 10.1073/pnas.1310777111) 査読有
4. Udagawa O, Ito C, Ogonuki N, Sato H, Lee S, Tripvanuntakul P, Ichi I, Uchida Y, Nishimura T, Murakami M, Ogura A, Inoue T, Toshimori K, Araki H. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking ORP4, a sterol-binding protein in the OSBP-related protein family. *Genes Cells*. 19(1):13-27. 2014. (doi: 10.1111/gtc.12105) 査読有
5. **年森清隆** 伊藤千鶴 精子の質評価-精子の構造と精能の評価 Evaluation of sperm quality **医学のあゆみ** 生殖医学・医療の最前線 249 (1): 31-37. 2014. (2014 年 4 月 5 日発行) 査読無
6. Toyama Y, Chen C, Yamatoya K, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Unique structures of organelles observed in primary spermatocytes after micro-injection of protein solutions such as immunoglobulin into the lumen of the seminiferous tubules in mice and rats. *Andrologia*. 45(6):402-408. 2013. (doi: 10.1111/and.12030) 査読有
7. Funaki T, Kon S, Tanabe K, Natsume W, Sato S, Shimizu T, Yoshida N, Wong WF, Ogura A, Ogawa T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Mochida K, Endoh K, Yomogida K, Fukumoto M, Horai R, Iwakura Y, Ito C, Toshimori K, Watanabe T, Satake M. The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. *Mol Biol Cell*. 24(17):2633-2644. 2013. (doi: 10.1091/mbc.E13-05-0234) 査読有

8. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, **Toshimori K**. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.* 352(3):739-750. 2013.(doi: 10.1007/s00441-013-1650-y) 査読有
 9. Mizuno Y, Ninomiya y, Nakachi Y, Iseki M, Iwasa H, Akita M, Tsukui T, Shimozawa N, Ito C, **Toshimori K**, Nishimukai M, Hara H, Maeba R, Okazaki T, Alodaib AN, Al Amoudi MA, Jacob M, Alkuraya FS, Horai Y, Watanabe M, Motegi H, Wakana S, Noda T, Kurochkin IV, Mizuno Y, Schönbach C, Okazaki Y. Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal location of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. *PLoS genet.* 9(2): e1003286. 2013. (doi: 10.1371/journal.pgen.1003286) 査読有
 10. Miyazaki T, Mori M, Yoshida CA, Ito C, Yamatoya K, Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Kawane T, Izumi S, **Toshimori K**, Komori T. Galnt3 deficiency disrupts acrosome formation and leads to oligoasthenoteratozoospermia. *Histochem and Cell Biol.* 139(2): 339-354. 2013. (doi: 10.1007/s00418-012-1031-3) 査読有
- [学会発表](計 29 件)
1. **Toshimori K**, Ito C, Yamatoya K. S44 Equatorin-mediated sperm-egg interaction. Proceedings of the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Symposium). Kobe Convention Center (兵庫県、神戸市). March 21-23, 2015.
 2. Ito C, Yamatoya K, Maekawa M, **Toshimori K**. S221 Sperm acrosomal membrane complex analyzed by STED using Equatorin-EGFP transgenic mice. Proceedings of the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Poster). Kobe Convention Center (兵庫県、神戸市). March 21-23, 2015.
 3. Yamatoya K, Ito C, Maekawa M, Hatano M, **Toshimori K**. S219 Searching the enzyme responsible for molecular weight reduction of sperm acrosomal protein Equatorin during acrosome reaction. Proceedings of the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Poster). Kobe Convention Center (兵庫県、神戸市). March 21-23, 2015.
 4. Maekawa M, Cheng C, Yamatoya K, Ito C, **Toshimori K**. S219 Basigin interacts with monocarboxylate transporter 2 in the mouse testes and sperm. Proceedings of the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Poster). Kobe Convention Center (兵庫県、神戸市). March 21-23, 2015.
 5. **年森清隆**, 伊藤千鶴, 大和屋健二 ヒト精子ミトコンドリアの形態異常と不妊症 第 59 回日本生殖医学会学術講演会(口演) 京王プラザホテル(東京都、新宿区) 2014 年 12 月 4 日
 6. 伊藤千鶴, 大和屋健二, **年森清隆** P-170. ODF2 isoform c の発現と運命 第 59 回日本生殖医学会学術講演会(ポスター) 京王プラザホテル(東京都、新宿区) 2014 年 12 月 4-5 日
 7. 大和屋健二, 伊藤千鶴, **年森清隆** P-176. SPESP1 ノックアウトマウスの先体反応に伴う先体タンパク質の局在と分子量変化 第 59 回日本生殖医学会学術講演会(ポスター) 京王プラザホテル(東京都、新宿区) 2014 年 12 月 4-5 日
 8. Yamatoya K, Ito C, Hatano M, **Toshimori K**. Analyses of sialylation status of sperm acrosomal protein Equatorin and enzyme responsible for molecular weight shift during acrosome reaction. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Poster) Pacifico Yokohama (神奈川県、横浜市). 2014.11.27.
 9. **Toshimori K**, Ito C, Yamatoya K. Sperm ODF2: analysis using ODF2-EGFP transgenic mice. 18th International Microscopy Congress (IMC 2014). (Poster) Prague Congress Center, Prague (Czech Republic) 2014.9.7-12.
 10. **年森清隆** 伊藤千鶴 大和屋健二 精子頭部のキャパシテーションと先体反応 日本アンドロロジー学会第 33 回学術大会 第 20 回精子形成・精巣毒性研究会(シンポジウム) 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県、北佐久郡) 2014 年 6 月 12 日
 11. **年森清隆** 雄生殖細胞の機能形態的解析; 精子卵子膜融合関連タンパク質 Equatorin を中心として 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会(学術教育講演) 自治医科大学キャンパス(栃木県、下野市) 2014 年 3 月 28 日
 12. 伊藤千鶴, 大和屋健二, 吉田恵一, 宮戸健二, 陳城, 前川眞見子, **年森清隆** トランスジェニックマウスを用いた精子 ODF2 の解析 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会(ポスター) 自治医科大学キャンパス(栃木県、下野市) 2014 年 3 月 27 日

13. **大和屋健二、伊藤千鶴、陳城、前川眞見子、幡野雅彦、年森清隆** 精子先体赤道部糖タンパク質 equatorin の糖鎖修飾変化に関わる酵素の探索 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (ポスター) 自治医科大学キャンパス (栃木県、下野市) 2014 年 3 月 27 日
14. 前川眞見子、陳城、**大和屋健二、野崎正美、伊藤千鶴、年森清隆** マウス精子における膜タンパク質ベシジン分子の特性 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (ポスター) 自治医科大学キャンパス (栃木県、下野市) 2014 年 3 月 27 日
15. 陳城、**大和屋健二、前川眞見子、柳田光昭、荒木慶彦、伊藤千鶴、年森清隆** モノクローナル抗体 MC101 が認識する精子タンパク質の解析 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (ポスター) 自治医科大学キャンパス (栃木県、下野市) 2014 年 3 月 27 日
16. **年森清隆** 受精障害の原因と検出 第 19 回日本臨床エンブリオロジスト学会 ワークショップ・学術講演会 (特別講演) 千里ライフサイエンスセンター (大阪府、大阪市) 2014 年 1 月 12 日
17. **年森清隆、大和屋健二、伊藤千鶴** Equatorin ノックアウト雄マウスの受精現象新学術領域研究 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第 8 回領域会議 (講演) 名古屋大学東山キャンパス 野依記念学術交流会館 (愛知県、名古屋市) 2014 年 1 月 10 日
18. **大和屋健二、伊藤千鶴、陳城、前川眞見子、幡野雅彦、年森清隆** 精子先体赤道部糖タンパク質 equatorin の分子量低下に関わる酵素の探索 新学術領域研究 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第 8 回領域会議 (ポスター) 名古屋大学東山キャンパス 野依記念学術交流会館 (愛知県、名古屋市) 2014 年 1 月 9 日
19. **年森清隆、伊藤千鶴** 精子の核 DNA 断片化と頭部空胞を指標にした精子の質の評価 第 58 回日本生殖医学会 学術講演会・総会 (口演) 神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル (兵庫県、神戸市) 2013 年 11 月 15 日-16 日
20. **伊藤千鶴、大和屋健二、年森清隆** 抗 equatorin 抗体を用いた精子の質の評価法の検討 第 58 回日本生殖医学会 学術講演会・総会 (ポスター) 神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル (兵庫県、神戸市) 2013 年 11 月 15 日-16 日
21. **大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆** 精子先体赤道部タンパク質 Equatorin の先体反応に伴う翻訳後修飾変化 第 58 回日本生殖医学会 学術講演会・総会 (ポスター) 神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル (兵庫県、神戸市) 2013 年 11 月 15 日-16 日
22. 水野由美、二宮裕一、仲地豊、伊関美緒子、岩佐泰靖、穂田真澄、津久井通、**伊藤千鶴、年森清隆**、下澤伸行、西向めぐみ、原博、前場良太、岡崎具樹、洞井康、渡辺光博、茂木浩未、若菜茂晴、野田哲生、Kurochkin Igor V、水野洋介、Schenbach Christian、岡崎康司 Tysnd1 欠損によるペルオキシソーム脂質代謝異常の病態と分子メカニズムの解析 第 86 回生化学会大会 (ポスター) パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市) 2013 年 9 月 12 日
23. **Toshimori K.** Visualization of spermatogenesis and sperm function. XXIII International Symposium on Morphological Sciences (ISMS) (Symposium) Toki Messe Niigata Convention Center, Niigata (新潟県、新潟市) 2013.9.11.
24. 前川眞見子、**大和屋健二、陳城、野崎正美、伊藤千鶴、年森清隆** マウス精巣および精子における basigin およびその結合分子の解析 日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会ならびに総会 および第 19 回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会 (口演) グランキューブ大阪 (大阪国際会議場) (大阪府、大阪市) 2013 年 7 月 26 日
25. **年森清隆** 新しい検査法に基づく精子の機能診断法および選別保存法の開発と生殖医療応用 公益財団法人双葉電子記念財団 自然科学研究助成成果発表会および研究助成・奨学金贈呈式 (ポスター) ホテルスプリングス幕張 (千葉県、千葉市) 2013 年 7 月 5 日
26. **伊藤千鶴、大和屋健二、年森清隆** シンポジウム 6 本当は怖い配偶子の老化-精子と卵子のアンチエイジング- 精子の老化について 第 13 回日本抗加齢医学会総会 (依頼講演) パシフィコ横浜 会議センター503 第 4 会場 (神奈川県、横浜市) 2013 年 6 月 28 日
27. **年森清隆** 精子膜に起こる配偶子認識と融合に関する超微形態および分子レベルの解明 新学術領域研究 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第 7 回領域会議 くにびきメッセ (島根県、松江市) 2013 年 6 月 2 日
28. **伊藤千鶴、大和屋健二、吉田恵一、藤村理紗、幡野雅彦、宮戸健二、年森清隆**、高解像顕微鏡および STED を用いた受精関連タンパク質 Equatorin の解析 日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会 (ポスター)

- ー) ホテル阪急エキスポパーク(大阪府、大阪市) 2013年5月20日-22日
29. **年森清隆** 新しい検査法に基づく精子の機能診断法および選別保存法の開発と生殖医療応用 **なのはなコンペ 2013 表彰式** および **なのはなコンペ** 昨年度受賞者成果発表会(講演) 千葉大学けやき会館 3F レセプションホール(千葉県、千葉市) 2013年4月23日

[図書](計3件)

1. **Toshimori K.**, and Eddy EM. The Spermatozoon. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (TM. Plant and A. Zeleznik, Eds), 4th ed. Academic Press, New York. Pp 99-148. 2014. ISBN: 978-0-12-397175-3.
2. 宮戸健二、井上直和、伊藤昌彦、**伊藤千鶴**、**年森清隆** 動植物の受精学 共通機構と多様性、澤田均編、総ページ数: 340 ページ、2014年4月20日出版、化学同人 DOJIN BIOSCIENCE SERIES、京都 ISBN: 978-4-75-981514-6
3. **Ito C.**, **Yamatoya K.**, **Toshimori K.** Equatorin-Related Subcellular and Molecular Events during Sperm Priming for Fertilization in Mice. (Chapter 7) *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. 85-95. 2014. (Sawada H, Inoue N, Iwano M Eds) (doi: 10.1007/978-4-431-54589-7_7)

[その他]

ホームページ等

生殖生物医学ホームページ

URL: <http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devbiol/>

受賞歴

伊藤千鶴、**大和屋健二**、吉田恵一、藤村理紗、幡野雅彦、宮戸健二、**年森清隆**、日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会 優秀ポスター賞(医学・生物科学)受賞 2013年5月21日

6. 研究組織

(1)研究代表者

年森 清隆 (TOSHIMORI, Kiyotaka)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 20094097

(2)研究分担者

伊藤 千鶴 (ITO, Chizuru)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 80347054

(3)連携研究者

大和屋 健二 (YAMATOYA Kenji)

千葉大学・大学院医学研究院・日本学術振興会特別研究員(PD)

研究者番号: 80447309

武藤 透 (MUTOH Tohru)

千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員

研究者番号: 30422265