

分担研究報告書

霊長類の各種臓器細胞の培養/ex vivo 系を用いた 遺伝子ベクターの安全性に関する研究

分担研究者 加藤賢三 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨：霊長類を用いた遺伝子治療の評価システムの確立の一環として ex vivo 系の立ち上げを行っている。カニクイザルの各種臓器の凍結保存、初代細胞培養技術を確立中である。数多くのベクターの安全性の評価を可能にするため、以下の臓器・組織の細胞培養を行った。(1) 肝臓、(2) 腎臓、(3) 肺臓、(4) 筋肉、(5) 心臓、(6) 胃、(7) 皮膚、(8) 小腸、(9) 膵臓、(10) 膀胱、(11) 尾、(12) 骨髄、(13) 胸腺、(14) 脾臓。これらの中で最も増殖性が優れているのは、肺臓であることがわかった。各種細胞の機能性を長期にわたり保持させるため、SV40 遺伝子による細胞の不死化が肝臓、腎臓、肺臓、筋肉、心臓、胃の細胞を用いて行われている。現状において、ベクターの安全性の ex vivo 系テストの準備を整えた。

A. 研究目的 ex vivo 系を用いた遺伝子ベクターの安全性に関する研究として、霊長類の各種臓器細胞の培養を試みた。

B. 研究方法

[カニクイザル胎児各種臓器細胞凍結保存および培養]

帝王切開で得たカニクイザル胎児の各種臓器(小腸、大腸、肺、腎、肝、膵、筋肉など)を無菌的に、ハサミで細かく刻み、それを細胞保存液とともに直接組織凍結を試みた。一方、それらの組織をトリプシン液で処理した後に FCS 10%—RPMI 1640 あるいは 10% FBS—MEM 培地を用いて初代培養を行った。(1) 妊娠後 80 日のものから肝臓、腎臓、肺臓、小腸を培養した。(2) 妊娠後 90 日のものから小腸と腎臓を細胞培養用に組織凍結を行った。(3) 妊娠後 150 日のものから、以下の臓器組織(肝臓、腎臓、肺臓、膀胱、胃、十二指腸、脳)を採取し、組織凍結とともに初代培養を行った(図 1)。

[染色体標本の作製]

対数増殖期の細胞の培地中に蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤であるカリクリン A (最終濃度 50 nM) を添加し、30 分作用させ未成熟染色体凝縮 (Premature Chromosome Condensation; PCC) を誘発させた後、75 mM KCl にて低張処理を 37 度 20 分行い、カルノー固定液(メタノール：酢酸、3:1) で固定を行いスライドガラス上に展開して 5% ギムザ液で染色し顕鏡した。対照として細胞をコルセミド処理 (0.1 ug/ml, 3 時間) し、低張処理・固定を行い分裂中期染色体を得た(図 2)。

C. 研究結果

【カニクイザル胎児（妊娠後80日齢）の各種臓器・組織の保存と初代細胞培養】

以下の臓器・組織の細胞培養を行った。（1）肝臓、（2）腎臓、（3）肺臓、（4）筋肉、（5）心臓、（6）胃、（7）皮膚、（8）小腸、（9）膵臓、（10）膀胱、（11）尾、（12）骨髄、（13）胸腺、（14）脾臓。

肺臓、腎臓、小腸の培養は3代まで継代し、各代で凍結保存を行った。この中で特に、肺臓の細胞 Cynomolgus Monkey Fetal Lung Cell (CMFL) について長期継代を行い、細胞の保存と性格づけを行った。トリプシン処理にて細胞を分離して、37℃、炭酸ガスフラン器で静置培養した。培養液は10% FBS-MEMを使用。5-6日毎の継代(1:4)を10ヶ月間行い、継代数は現在、44代である。

【CMFL細胞の保存】

CMFL細胞は各継代時(2代、3代、15代、40代)で、4~10本のアンプルの保存した。

【CMFL細胞の染色体】

この細胞株の2倍体性の検索のため染色体を検索したところ、継代20代までは2倍体(42本)を維持していたが、それ以降染色体数はほぼ4倍体(~80本)になっている事が分かった。

【初代細胞の不死化】

各種臓器(肝臓、腎臓、肺臓、筋肉、心臓、胃)からの初代細胞に、SV40のT抗原遺伝子DNA 2μgをリポフェクチン法を用いてトランスフェクションを行った。上記の細胞を3φcm dishにFCS 10%-RPMI 1640培地を用いて増殖させ、不死化を試みている。

D. 考察

カニクイザルの各種臓器の凍結保存、初代細胞培養技術を確立中である。数多くのベクターの安全性の評価を可能にするため、多くの臓器・組織の細胞培養を行った。これらの中で最も増殖性が優れているのは、肺臓であることがわかった。しかし、20代以降に染色体数の変化が認められている。安全性試験のための細胞は、染色体レベルが2nであることが望ましいので、この目的には20代以前の細胞が適しているものと思われる。一方、機能性細胞では、その機能性を長期にわたり保持させるため、細胞の不死化が必要である。このためには、SV40 T抗原遺伝子による細胞の不死化が肝臓、腎臓、肺臓、筋肉、心臓、胃の細胞を用いて行われている。現状において、ベクターの安全性のex vivo系テストの準備が整ったといえる段階であり、平成11年度は、ベクターの発現効率や安全性に関する評価法の開発を行う予定である。

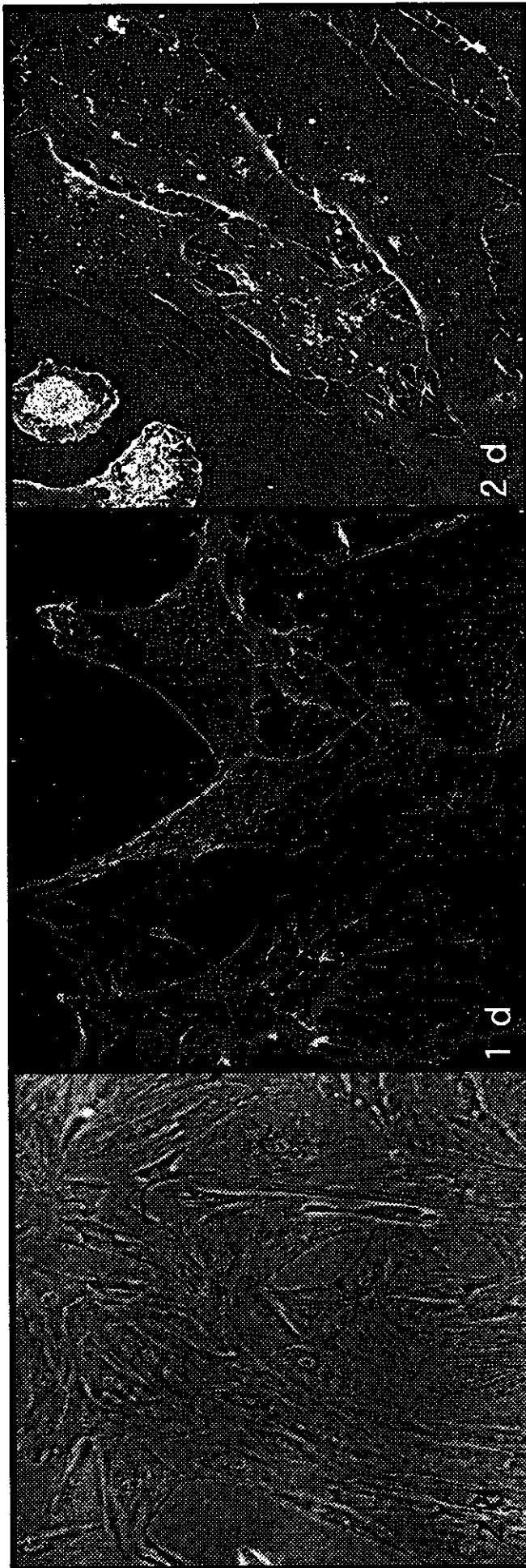
E. 結論

今年度は、以下の三つの結果を得た。

1. カニクイザルの各種臓器の凍結保存と初代細胞培養技術の確立した。
2. カニクイザルの各種初代細胞を用いた不死化の試みた。
3. 染色体標本の簡便な作製法の確立した。

F. 研究発表 なし

Cynomolgus fetal muscle cells



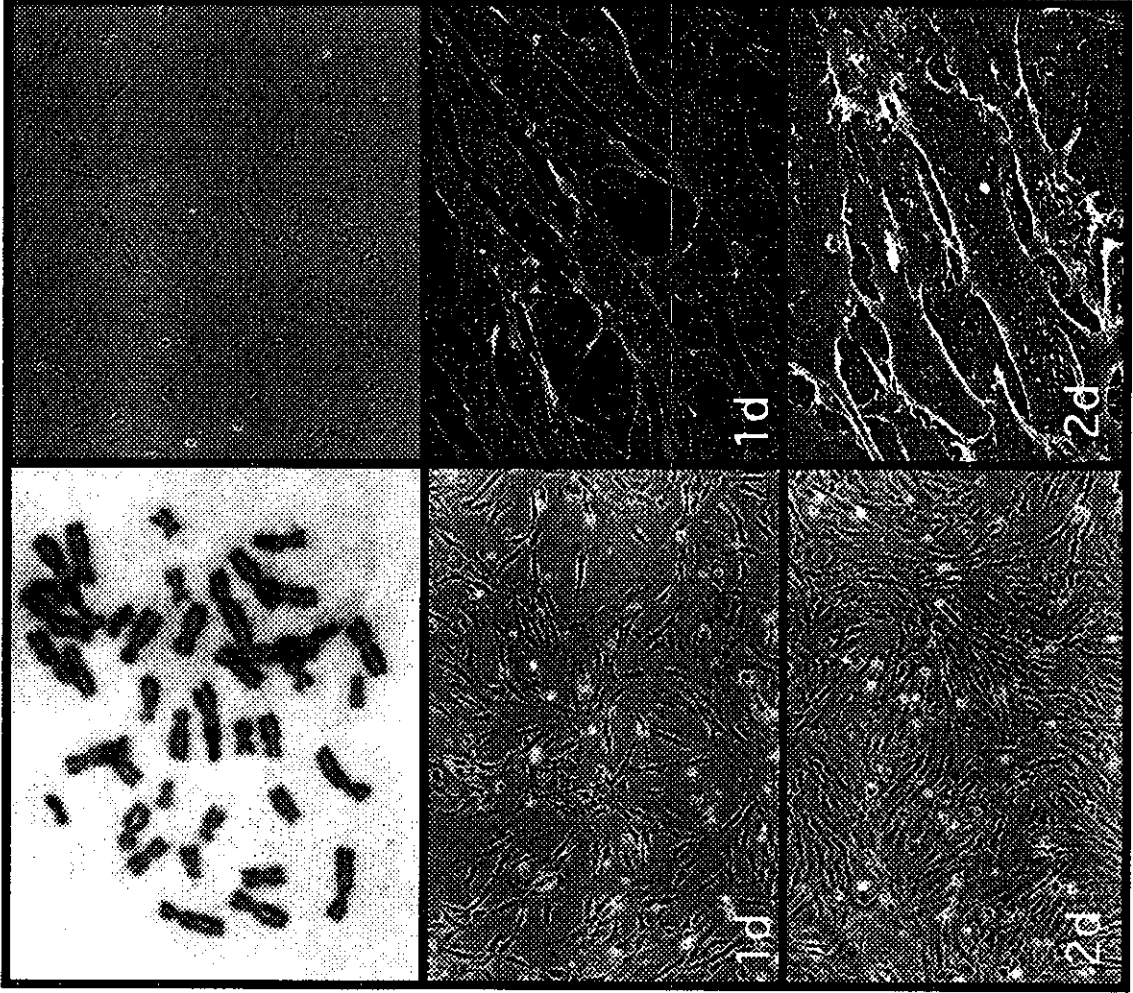
phase contrast 200X

SEM

SEM

Fetal lung cells of cynomolgus monkey

2n=42



phase contrast 200X

phase contrast 200X

phase contrast 200X

SEM

SEM

分担研究報告書

カニクイザル胎児大脳神経細胞の初代培養系の確立

分担研究者 黒田 洋一郎（東京都神経科学総合研究所・神経生化学研究部門）

河村 晴次（東京大学大学院・農学生命科学研究科）

協力研究者 根岸 隆之・中村 紳一郎・吉川 泰弘（東京大学大学院・農学生命科学研究科）

開地 泰介（東京都神経科学総合研究所・神経生化学研究部門）

研究要旨

昨年度に予備研究として行ったラット胎児における凍結保存条件の検討結果をふまえ、凍結保存したカニクイザル胎児大脳組織を用いた神経細胞の初代培養を試みた。胎齢 80 日、90 日、102 日のカニクイザル胎児を選択し、各大脳組織を凍結保存後、同一条件で初代培養を行うことにより最適胎齢を検索した結果、神経細胞の生存率に有意な差はみられなかったものの、形態学的には胎齢 80 日から得られた神経細胞がもっとも突起に富んでいた。また、DNA 合成阻害剤である Cytosine arabinoside (Ara-C) を培養液に添加することによりアストログリアの増殖を抑えることが可能となり、神経細胞の純培養に成功した。

A. 研究目的

繁殖、飼育に特殊な技術を要する霊長類の胎児は稀少性の高い研究材料であり、新鮮な大脳組織を頻繁に入手することは非常に困難である。従ってカニクイザル胎児大脳神経細胞初代培養を安定して作出、供給するには脳組織を液体窒素中で長期保存し、必要に応じて初代培養を行うことが有効である。そこで本研究では、昨年度に行ったラット胎児における凍結保存条件の検討結果をふまえ、カニクイザル胎児の脳組織を液体窒素中で長期保存後、初代培養を試みた。同時に胎齢の異なるカニクイザル胎児 3 体（80 日、90 日、102 日）より得られた大脳神経細胞初代培養を形態学的に比較し、最適胎齢を決定した。また、胎齢 80 日の初代培養に DNA 合成阻害剤 Cytosine arabinoside (Ara-C) を添加することにより神経細胞の純培養を試みた。

B. 研究方法

帝王切開で得られた胎児から大脳を無菌的に採材し、細切後 DMSO10% 含有培養液中で緩徐凍結し、液体窒素中で 3 ヶ月以上保存した。解凍後、酵素処理により細胞を分散させ初代培養を行った。神経細胞純培養の場合は Ara-C を培養 3 日目に添加した。胎齢による神経細胞の形態、生存率を比較するために経時的に位相差顕微鏡下での観察、および抗 MAP-2 抗体による免疫染色を行った。

C. 研究結果

神経細胞の生存率の経時的な変化は胎齢間に有意な差はみられなかったが（図 1）、神経細胞の形態変化には差が認められた。胎齢が若いほど神経細胞の形態に多様性がみられ、神経細胞間に

張り巡らされるネットワークも複雑であった(図 2-a)。102日齢胎児由来の初代培養は組織片とみられる夾雑物が培養液中に多量に混在し、後の培養に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。この初代培養では培養日数が進むと殆どの神経細胞は2極性の形態を示した(図 2-c)。胎齢が進むほどアストログリアの割合が高くなった。Ara-C を添加することにより添加後7日目、すなわち培養10日目には純度の高い神経細胞の培養系が得られた(図 3)。大脳組織全体より得られる細胞数は胎齢により増加したが、単位重量あたりの細胞数は80日齢胎児が最も高かった(表 1)。

D. 考察

脳組織は胎児期に著しく分化、発達するため、胎齢により神経細胞の分化状態も著しく異なると思われる。既に、胎齢109日の胎児大脳組織は初代培養に適さないという報告があることから、本研究では胎齢80日、90日、102日のカニクイザル胎児を選択し、比較した。分化程度が低いほど再生能力に優れていることが知られているが、胎齢80日由来の神経細胞の突起数が多かったのはこれを裏づけるものであり、逆に102日由来の神経細胞が2極性を示していたのは分化が進んでいたからだと考えられる。胎齢102日の培養で夾雑物が多量にみられたことは、大脳組織の発達にともなう組織内結合組織、既に伸長していた突起、細胞外基質等の増加を示していると考えられる。つまり胎齢が若い程培養に適していると考えられるが、大脳組織全体で培養可能な細胞数は胎齢が進むほど大きくなるので用途によりある程度検討の必要がある。Ara-C 添加によりアストログリアの増殖性が抑えられた結果、純度の高い神経細胞の培養が可能であったが、長期培養には向かず21日以降急速に死滅

した。これに対して Ara-C 非添加の共培養では培養21日目以降もわずかながら神経細胞の生存が確認できた。このことは培養においてもアストログリアが支持細胞として神経細胞の生存に深く関与していることを示唆する。今後、新鮮材料由来のカニクイザル胎児大脳神経細胞初代培養との形態的、機能的比較を行い、凍結保存の影響を詳細に検討することがこの系を有用なものにするために必須であると考えられる。

E. 結論

凍結保存したカニクイザル胎児大脳組織を用いた神経細胞の初代培養が可能となった。形態学的評価により、胎齢は若い方が初代培養に適していることが示唆された。また、Ara-C 添加により容易に神経細胞純培養が可能であった。

F. 研究発表

学会発表

根岸隆之、河村晴次、吉川泰弘、開地泰介、黒田洋一郎:サル胎児大脳神経細胞の長期凍結保存と初代培養、第46回日本実験動物学会、1999、市川

カニクイザル胎児大脳組織 凍結保存



大脳組織の単離



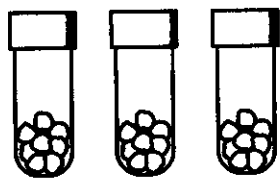
メスによる細切



10% DMSO 含有培養液



緩徐凍結の後、液体窒素中で長期保存可能

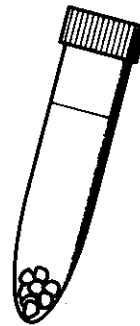


-196℃

凍結材料由来初代培養



ウォーターバスにて急速解凍



パパイン処理
32℃、30 min

遠心・洗浄
32℃、10 min x 2

DMEM / 10%FCS にて培養

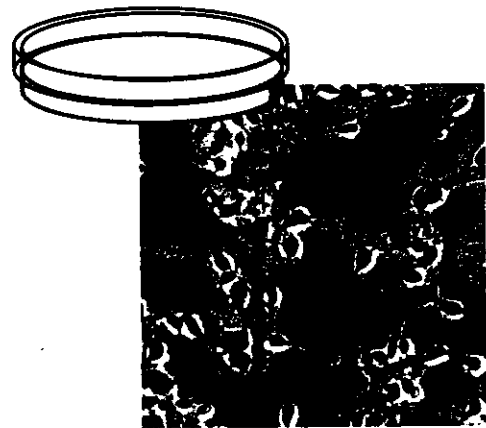
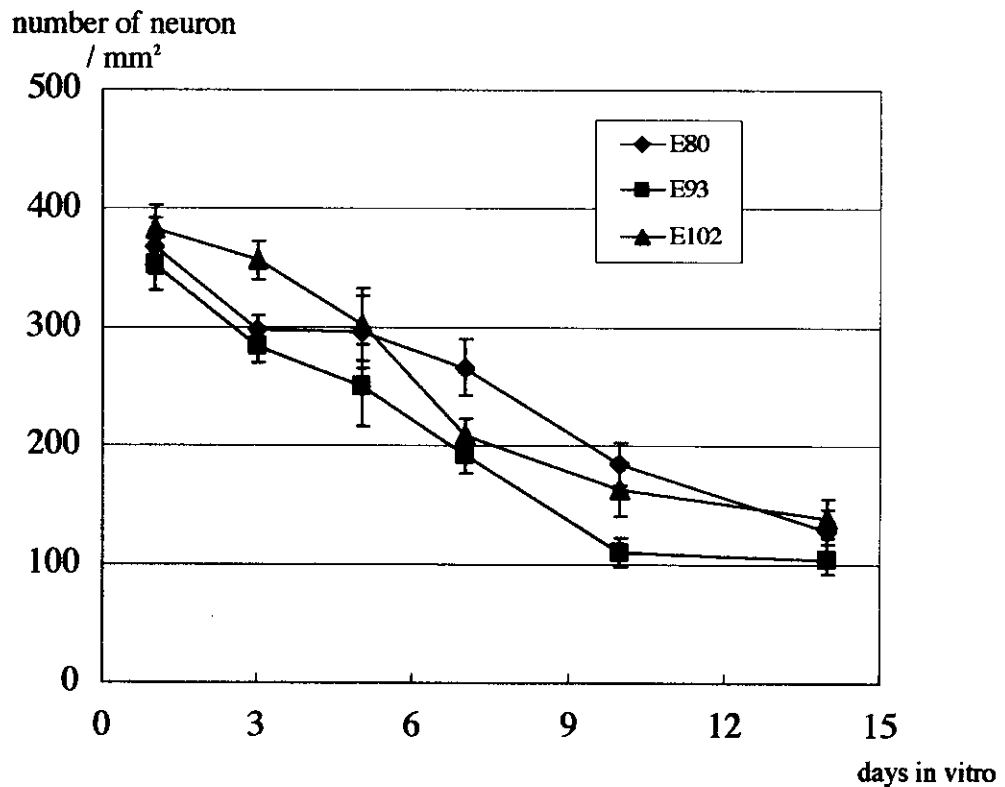


表 1 Changes of body weight, cerebral weight and total cells of cynomolgus monkey fetus

Embryonic day	80	93	102
Body weight (g)	46.89	88.98	85.53
Cerebral weight (g)	4.68	8.74	12.14
Total cells from frozen tissue (x 10 ⁸ cells)	3.58	5.86	5.41
Total cells / g (x 10 ⁸ cells / g)	0.765	0.670	0.446

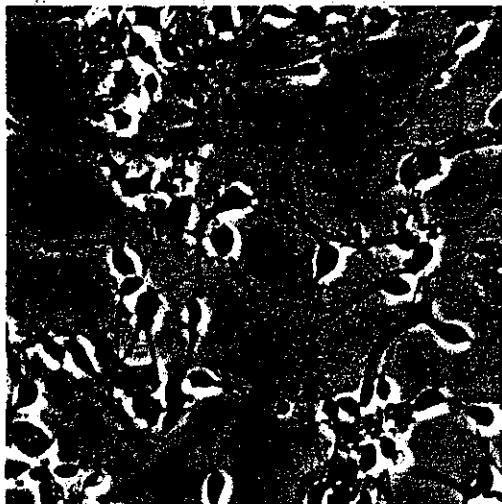
图 1

Survival curve of neuron (MAP-2 positive)

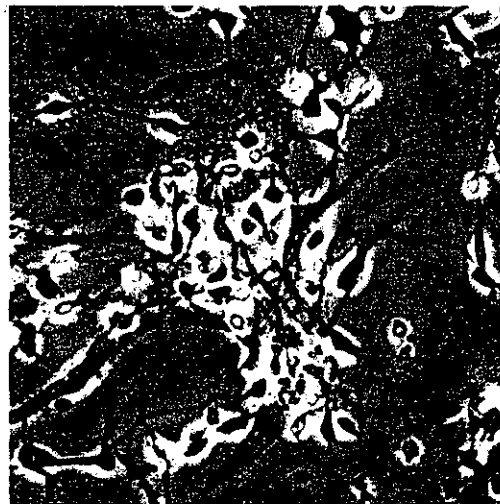


☒ 2 Morphology of brain cells in vitro (5 days in vitro)

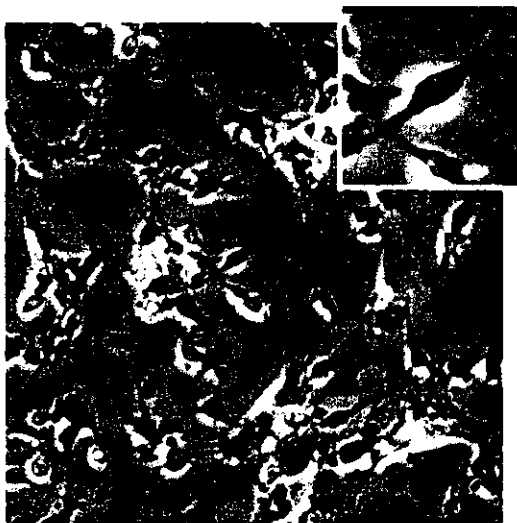
E 80



E 93

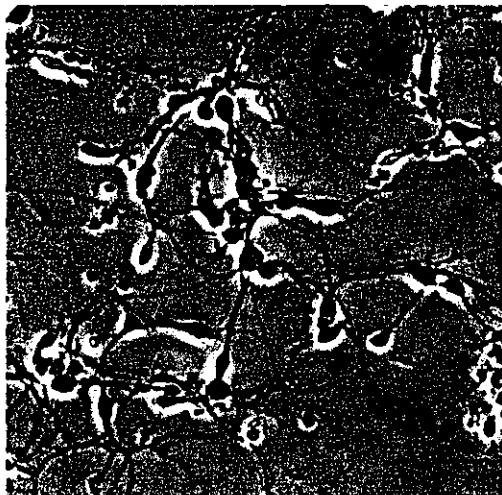


E 102



☒ 3 Effect of cytosine arabinoside (Ara-C) on culture from 80 days fetus (10 days in vitro)

Addition of Ara-C on 3 DIV



Control



霊長類リンパ球系細胞の樹立に関する研究

分担研究者 明里 宏文 (徳島大学医学部ウイルス学教室 助手)

研究要旨 マカク属サルおよびチンパンジー由来Tリンパ球細胞株の樹立法が確立された。これらの細胞はリンパ球系での遺伝子治療法の *in vitro* 評価系に有用であると考えられる。また上記細胞株が、通常の腫瘍細胞株と異なり形態的・機能的に比較的プライマリー細胞の特徴を維持していることから、より *in vivo* に近い遺伝子治療法の *in vitro* 評価系として利用できるものと期待される。

A. 研究目的

昨年度は本研究において、Herpesvirus saimiri (HVS) 感染によるマカク属サル (アカゲサル・カニクイサル) リンパ球細胞株の樹立法を確立する事が出来た。今年度は、ヒトに最も近縁な霊長類であるチンパンジー由来リンパ球細胞株を同様な手法により樹立しその性状を解析するとともに、これらHVS樹立細胞株の増殖機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

三和化学研究所・熊本霊長類パークにて飼育されている3頭のチンパンジーの末梢血より、常法に従って末梢血リンパ球細胞 (PBL) を分離した。Herpesvirus saimiri (HVS) は、ウイルス感染OMK細胞の培養上清より調整したものをstock virusとした。表面マーカー解析は、蛍光標識抗体処理後フローサイトメトリー法にて行った。細胞増殖の検討はWST-1法により行った。アポトーシスの検討は、PI/annexin V 染色法により行った。

C. 研究結果・考察

1) チンパンジー由来リンパ球細胞株の樹立

3頭のチンパンジー (#239、#250、#261) よりPBLを分離し、PHA-P処理処理後に、HVSをmultiplicity of infection (m.o.i.) 0.1にて感染させたところ、#239および#250よりinterleukin-2 (IL-2) に依存性に増殖する不死化細胞株HSP-239, HSP-250を得た。#261由来リンパ球では、HVSを感染していない条件でIL-2非依存性に増殖

する細胞株が得られた。この細胞は、B細胞マーカーであるCD20陽性であることから、この個体が自然感染していたEBV-like virusによりトランスフォームしたものと考えられた。

興味深いことに、HSP-239, HSP-250は、CD4⁺, CD8⁺およびCD4⁺CD8⁺ subsetからなるCD3⁺T細胞であることが示された(図1)。昨年本研究において樹立されたカニクイサルT細胞株でも同様に、CD4⁺, CD8⁺のみならずCD4⁺CD8⁺ subsetが認められている一方、同様な手法により樹立したヒトT細胞株においては、CD4⁺CD8⁺ subsetはほとんど認められなかった。これらのことから、(i) チンパンジーでは、マカク属サルと同様に、末梢血中にCD4⁺CD8⁺ subsetが多く存在するのか、または、(ii) 活性化に伴いCD4⁺ subsetに発現されるCD8抗原が維持されたままの状態で不死化している可能性が考えられる。どちらにしても、ヒトとチンパンジー・マカク属サル間の細胞性免疫機構に何らかの違いがあることを表しており、今後さらに検討が必要と考えられる。

2) HVS樹立細胞株の増殖機構に関する解析

これまでの結果より、HVSが広く霊長類末梢血Tリンパ球を不死化することが示された。HVSによる樹立株化細胞では、その増殖に細胞間相互作用が必要であることが示唆されていることから、本研究では、この細胞増殖に関する細胞間因子について検討を行った。

細胞表面分子の解析の結果、本細胞株ではT細胞共刺激分子であるCD28及びそのリガンド

であるCD80が共発現していることが示された(図2)。これらの分子間の相互作用を抗CD28抗体により阻害すると、用量依存性に細胞増殖の抑制が認められた(図3)。この現象がアポトーシスによるものかどうかについて検討したところ、PI/annexin V染色法により明らかなアポトーシス細胞の増加が認められた(図4)。以上のことから、CD28/CD80相互作用はHVS樹立株化細胞の増殖に必要であると考えられた。本研究結果は、HVSによるTリンパ球のトランスフォーメーションに関わるメカニズムを解析する上で重要な意味を持つものと考えられた。

D. 結論

本研究より、マカク属サルおよびチンパンジー由来Tリンパ球細胞株の樹立法が確立された。これらの細胞はリンパ球系での遺伝子治療法のin vitro評価系に有用であると考えられる。また上記細胞株が、通常の腫瘍細胞株と異なり形態的・機能的に比較的プライマリー細胞の特徴を維持していることから、よりin vivoに近い遺伝子治療法のin vitro評価系として利用できるものと期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

Akari H, Terao K, Nam KH, Adachi A and Yoshikawa Y: Comparative analysis of human and macaque monkey CD4: differences in formaldehyde lability and conformation. **Experimental Animals** 47, 23-27, 1998.

Akari H, Ono F, Sakakibara I, Takahashi H, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A and Yoshikawa Y: Simian T-cell leukemia virus type 1-induced malignant adult T cell leukemia-like disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8⁺ T cell leukemia. **AIDS Research and Human Retroviruses** 14, 367-371, 1998.

Akari H, Mori K, Otani I, Terao K, Ono F, Adachi A and Yoshikawa Y: Induction of MHC-II DR expression on circulating CD8⁺ lymphocytes in macaques infected with SIVmac239 nef-open but not with its nef-deletion mutant. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 14, 619-625, 1998.

Nam KH, Akari H, Terao K, Ohto H, Itagaki S, and Yoshikawa Y: Age-dependent remodeling of peripheral blood CD4⁺ CD8⁺ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys. **Developmental and comparative Immunology**, 22, 239-248, 1998.

Akari H, Adachi A, Nam KH, Mori K, Otani I, Terao K, Yoshikawa Y: Early depletion of peripheral blood CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes in cynomolgus macaques by SIVmac infection: implication of Nef. Proceedings of 12th World AIDS Conference, 69-73, 1998.

Nam KH, Akari H, Terao K, Itagaki S, Yoshikawa Y: Age-related alterations of major lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys. **Experimental Animals** 47, 159-166, 1998.

Akari H, Nam KH, Mori K, Shibata H, Otani I, Adachi A, Terao K, and Yoshikawa Y: Effects of SIVmac infection on peripheral blood CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes in cynomolgus macaques. **Clinical Immunology**, 1999, in press.

2. 学会発表

明里宏文、福森知治、飯田慎也、寺尾恵治、吉川泰弘、足立昭夫: Herpesvirus Saimiri によるTリンパ球トランスフォーメーションにおける共刺激分子の役割。第46回日本ウイルス学会総会(平成10年10月、東京)

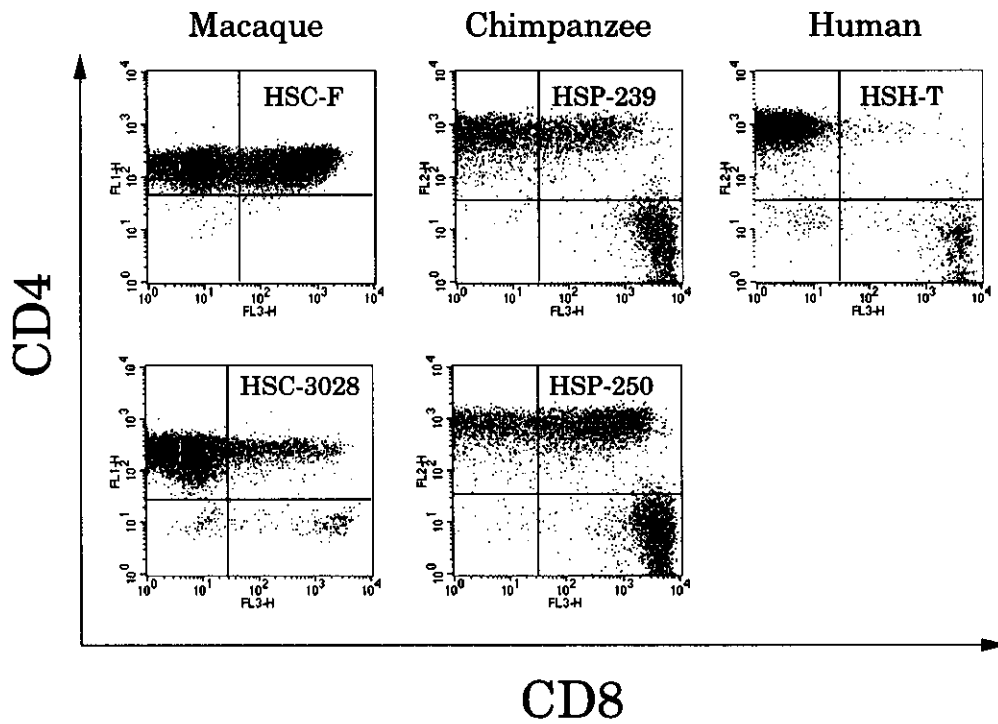


図1 霊長類HVS樹立T細胞株のCD4/CD8発現

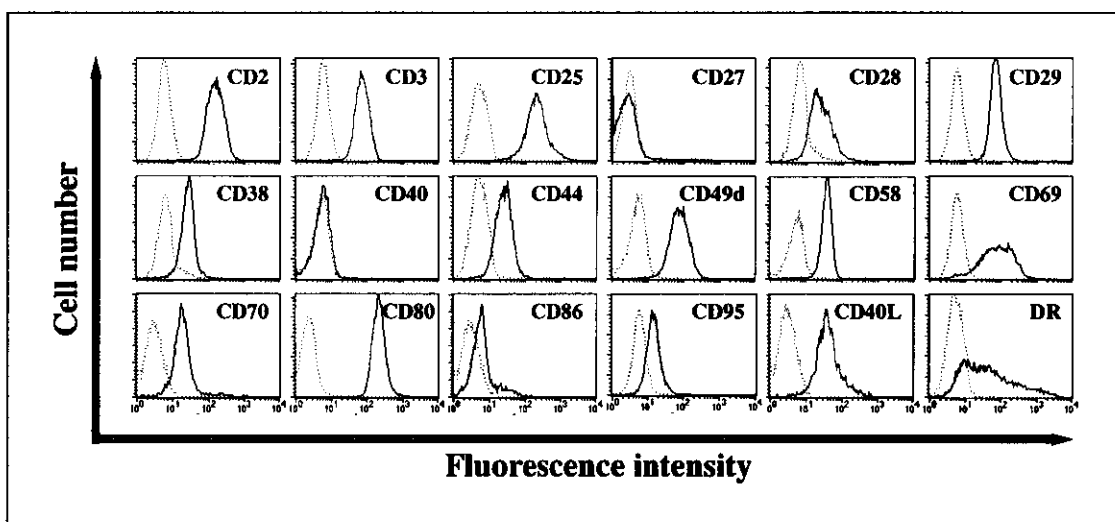


図2 霊長類HVS樹立T細胞株の細胞表面CDマーカー解析

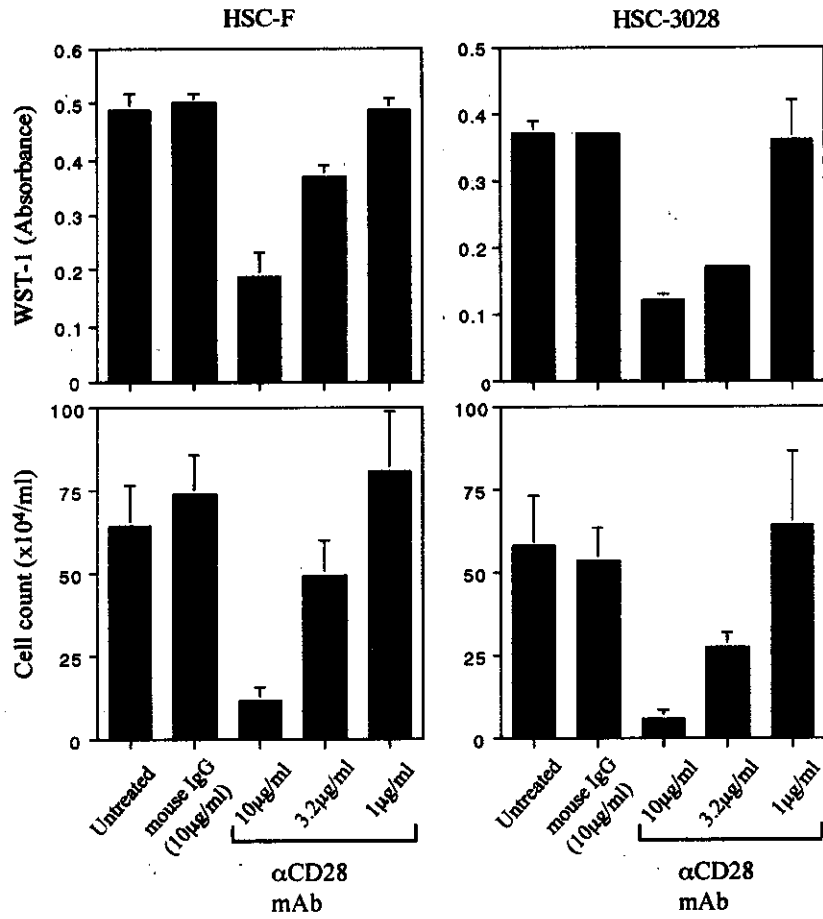


図3 抗CD28抗体によるHVS樹立T細胞株の増殖抑制効果

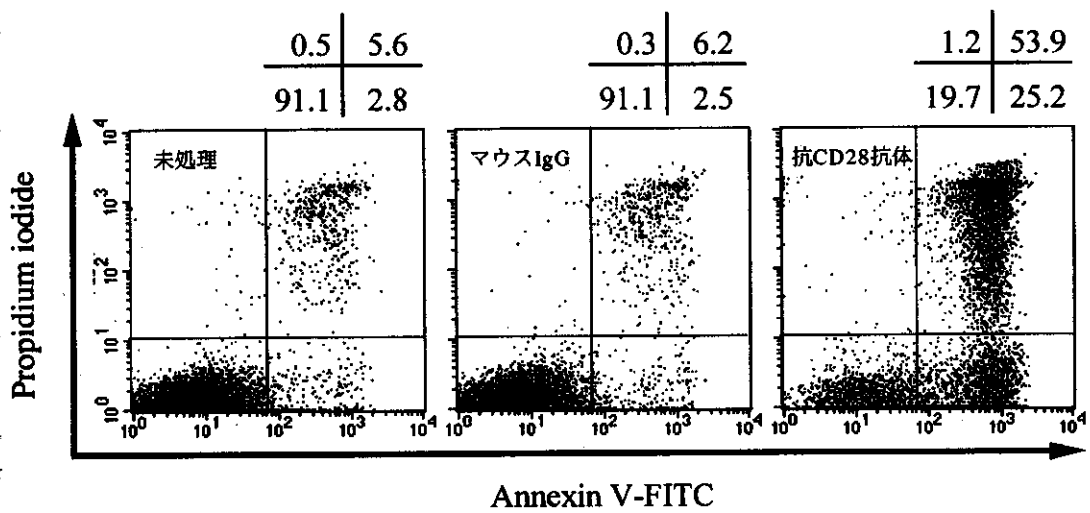


図4 抗CD28抗体によるHVS樹立T細胞株のアポトーシス誘導

分担研究報告書

精子細胞および卵母細胞膜の変化とスフィンゴミエリン

分担研究者 岡田詔子 東邦大学医学部第二解剖学講座

研究要旨 カニクイザル精子の凍結保存は生存精子に先体反応様の変化を起こすことを見出し、FITC-PSA法の成績と比較して確認できた。さらに精子の凍結保存と培養による先体反応では共にスフィンゴミエリンが減少すると報告されている。そのため新しいスフィンゴミエリンの観察方法により、モルモット精子と卵母細胞の細胞膜を破壊せずにスフィンゴミエリンの動態を観察した。その結果、先体と極体形成領域にスフィンゴミエリンが豊富に認められることを見出した。この方法を用いて凍結保存精子や卵母細胞の膜変化を観察して変化の起こる時期や理由について検討できる可能性が示唆された。

I 凍結保存精子における先体膜の変化

1) FITC-PSA による観察

A. 目的

凍結保存法は、受精卵の移植による産業の分野や、発生工学などの生命科学の研究で広く用いられている技術である。しかし、凍結の機序については不明な点が多く残されている。山海等¹⁾はカニクイザル精子の凍結保存による受精の成績から、凍結保存により先体反応が促進されることを報告している。凍結保存により何故先体反応が促進されるのか？ いつ反応が起きるのかを知る目的で電顕(TEM)により凍結融解直後や培養精子を観察した結果、凍結保存により生存精子において既に先体膜の融合や空胞化が観察される事を見出した。しかし、凍結保存精子の先体内に認められる空胞は、数が少ない精子や豊富なものなど様々で先体の内容物の放出を伴うか否かは TEM では明らかに出来なかった。FITC-PSA 法は 細胞膜が intact な精子と先体反応が完了した精子では染色されないが、先体が intact な精子はアルコールで細胞膜に穴をあけることにより先体内内容物が観察できる。そこで凍結保存により精子の先体膜は穴が開き、FITC-PSA 法により内容物が染色される exocytosis が開始されているか否か、さらに先体に変化している率は TEM の観察と近似しているか否かを検討した。また、PI 染色の成績から TEM での所見は生存精子における成績と一致するか否かを調べた。

B 方法

カニクイザル精子は凍結融解後 0.2h 培養したものをを用いた。精子の凍結や培養条件は Sankai 等¹⁾の方法に準じた。FITC-PSA の染色法は Cross 等²⁾の方法に準じてアルコール固定した後 100 µg/ml の FITC-PSA レクチンで染色し Slow Fade にて封入した。なお死滅精子の PI 染色のコントロールとして固定前に凍結保護剤を添加しないで -80 °C で 10 分放置して死滅させたものを用いた。染色後の精子は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

C 結果

死滅処理した精子は PI で ≤98%核が染色された。凍結保存精子では 0 h 培養精子で PI に染色される精子は 3.2%であった。また、生存している intact 精子は 38.7% 先体に於ける FITC 蛍光が中等度で先体反応中のものは 58.4% であった。2h 培養精子の成績は

前者が 25% 後者が 47.2% でこれらの成績は TEM での成績と近似していた。

D 考察

凍結保存精子の生存率や先体反応率は FITC-PSA と TEM の成績が近似していたので、TEM の実験処理中に空胞化が生じたのではないことが明らかになった。また、凍結 0 h で FITC-PSA の染色性が中等度のものは細胞膜に穴が開いているものと考えられる。従ってこれらの精子は TEM では空胞化精子でありこの精子は開口分泌が開始している可能性が考えられる。

E 結論

FITC-PSA と TEM の成績から、凍結融解直後の生きている精子に 50% 以上の先体反応中の精子が含まれると考えられる。

文献

- 1) Sankai, T., Terao, K., Yanagimachi, R., Cho, F. and Yoshikawa, Y. (1994) Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Rprod. Fertil.* 101:273-278.
- 2) Cross NL, Morales P, Fukuda M, Behboodi E. : Determining acrosomal status of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. *Am J Primatol.* 17:157-163. 1989

2) 精子細胞膜のスフィンゴミエリンの分布

A 目的

前述のごとく凍結保存により先体反応は促進されることが、電顕と FITC-PSA 法で明らかとなった。その先体反応精子と凍結保存精子は、膜のリン脂質の組成が変化しその変化が両者間で類似している。また膜の総リン脂質量は変わらない 反応早期の stage においてホスホコリン、アラキドン酸が上昇するがスフィンゴミエリン(SM)は減少する(Nikolopoulou1986¹⁾、Buhr 1994²⁾)。凍結精子でこのような変化が起きる理由として前二者は凍結保護剤中に多量に含まれるが SM は不足していることが報告されている(Buhr 1994²⁾)ので SM の減少が関係していると考えられる。これを明らかにするためにはカニクイザル精子の先体反応や凍結保存に伴う SM の動態を先体の経時的な変化とともに調べる必要

があるがリン脂質は抗原性がほとんどないので形態的な観察は困難なためまだ報告はない。しかし昨年、SMに特異的に結合する蛋白 Lyseinin を(Yamaji A. and Kobayashi H 1998) 小林が見出した。Lyseinin は297個のアミノ酸からなる蛋白で精子を不動化し10分以内に致死させるがSMの分解作用は認められない。しかし血清、精漿やSM-liposomeの存在下では結合は抑制される。なお大腸菌に発現させたリコンビナントの作用も同様であることは既に認められている。分担研究者と山海等は、全薬工業の小林英司博士と共同研究中であり、Lyseinin と Lyseinin 抗体を用いる方法により生存精子や固定した細胞の膜を分離することなくSMの動態を可視化して観察できる。さらにSM-liposomeを添加する事によりこれらの変化の抑制実験が可能である。膜からSMが減少する事を抑制する凍結保存の凍害予防や先体反応の抑制法について検討できる。

一方、モルモット精子は先体が著しく大きいので光学顕微鏡化で生きたまま先体反応を観察できる。そこで精子細胞膜のSMの動態を調べるための基礎実験としてヒト、モルモット、ラット精子のSM分布を調べた。

B 方法

ラット、モルモット精子は精巣上体より回収し、ヒト精子は射精精子を用いた。精子はDPBSで洗浄後、固定は4% paraformaldehyde, 2mM EDTAを含む30mM pipes bufferを用いて、4℃の水浴中でmicro wave 10秒2回を施した後、室温で1h処理した。洗浄液は0.2% BSA, 2mM EDTA, 0.5% fish gelatinを含むPBSを用いた。更にアルデヒドの除去に0.1M NH₄Clを含む液で20分洗浄し、blockingは10%正常ウサギ血清を用いた。その後Lyseinin 0.2 μg/mlと、抗Lyseinin ウサギ抗体にて4℃で一晩免疫反応させた後FITC-抗ウサギ-ヤギIgGにて2h免疫染色した。死滅精子核はPopidium Iodide (PI)で染色した。対照はLyseinin無処理とした。

C 結果

ヒト、ラット、モルモット精子の細胞膜にSMの存在を示すFITC蛍光を認めた。モルモット精子においては、先体に特に強いFITC蛍光が認められた。しかしヒトとラット精子では先体に強い蛍光を認めることはなかった。対照では膜に蛍光は認められなかった。

D 考察

モルモット精子では先体領域の細胞膜にSMが豊富に存在する可能性が示唆されたが、ヒトやラットでは明らかでなかったため、今後生きた精子における処理や固定条件、Lyseininの濃度などについて更に検討してこの点を明らかにしたい。またその検討した方法を用いて先体反応精子と凍結保存精子のSMの動向を明らかにしたい。

E 結論

サル類を含む哺乳類の生きた精子や固定した精子膜を、分離することなくSMの動的変化をLyseinin法により観察できる。

文献

- 1) Nikolopoulou, M., Soucek, D.A. and Vary, J.C. (1986) Modulation of the lipid composition of boar sperm plasma membranes during an acrosome reaction in vitro. Arch. Biochem. Biophys. 250. 30-37.
- 2) Buhr, M.M., Curtis E.F. and Somnapankakuda, N. (1994) Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. Cryobiology. 31. 224-238.

II マウス卵母細胞膜のスフィンゴミエリンのLyseininによる観察

A 目的

SMは前述の様に高等動物にのみ認められ、下等動物には認められないが神経の髄鞘に多量に含まれ膜を構成するリン脂質で情報伝達との何らかの関係が考えられる。Lyseininはシマミズの体腔液から小林ら(1997)¹⁾が抽出した41KDの蛋白でSMと特異的に結合する。LyseininのSM結合の特異性はELISA, TLCやLiposome lysis assayで確かめられている¹⁾。卵母細胞におけるSMの分布動態は不明である。しかし、1:卵母細胞の減数分裂における不等分裂時の膜の動態。2:受精時の精子の取り込み(食作用に相当する)の際に出現するcytoprojection。3:受精丘の膜。4:受精後直ちに全細胞膜に波及する精子と卵膜の融合と混合その後の細胞膜の新生。5:受精後に起こる最初の分裂(等分裂の膜)。などの著名な膜の変化を発現する。膜の変化にはリン脂質が深く関与していると考えられるのでSMの変化を通して膜の動態を調べる目的で、今回は卵母細胞の極体形成におけるSMの動的変化を観察出来るか否か、lyseininを用いてマウス卵母細胞で調べた。

B 方法

4-6週令のICRマウスにPMSGとhCGで過排卵誘起し、hCG投与後9-16hに卵母細胞を回収した。Hyaluronidaseとacidic ringer(Naitoら1992)pH2.5で裸出卵を得た。卵母細胞の減数分裂期はPI染色により判定した。卵母細胞のLyseininの免疫染色法は前述の精子での方法に準ずる。4% paraformaldehyde固定した後、NH₄Clを含むPBSでアルデヒドを除去し0.3 μg/mlのlyseininを処理した。10%正常ウサギ血清を処理してlyseininウサギ抗体(500倍希釈)と免疫反応させた後、FITCラベルした二次抗体を用いて染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡で連続断層像を得た後、一部

の卵母細胞には FITC 像の強い部分の膜長を測定した。

C 結果

hCG 投与後9h卵は、極体放出直前の第一減数分裂後期であった。PI により赤く染まった染色体は放出される極体側と卵細胞側に別れ、細胞質は球状に突出していた。FITC の蛍光は極体と卵母細胞の境界領域により強く認められた。hCG 投与後16hでは、第二減数分裂中期の紡錘体とその中央に染色体が認められた。分裂装置の存在する表層はわずかに突出し、その膜は他の部位に比べて FITC の蛍光が強かった。その強い蛍光を示す領域は直下にある分裂装置の形状と一致した紡錘状を呈していた。対照では膜に蛍光は認められなかった。

D 考察

卵膜に認められた FITC 像は細胞膜の外葉や膜を貫通している SM の存在部位と考えられる。また、減数分裂装置の存在する領域により強い蛍光が認められたのでこの部位は SM が豊富に存在すると考えられる。これらの所見から、SM は卵母細胞の成熟過程において重要な役割を担っている可能性が推察され、Lysenin を用いることで SM の動的変化を可視化して観察出来ると考えられる。

E 結論

スフィンゴミエリンは卵母細胞の極体形成時に分裂装置に一致した膜に著名に分布していたことから、極体形成時の膜の新生や極体の形成に重要な役割を担っている可能性が推察された。

文献

- 1) Kobayashi H., Sekizawa Y. Shioda S., tori „Nakajima „Umeda .1997) "Neuroendocrinology :Retrospect and Perspectives". ed. By Korf HW and Usadel KH. Springer-Verlag, Heidelberg, New York, p. 255

- 2) Yamaji A., Sekizawa Y. Emoto K., Sakuraba H., Inoue K., Kobayashi H., Umeda M.(1998) Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. 273. 5300-5306

F 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) Okada A., Igarashi H., Kuroda M., Yoshikawa Y., Tsuchiya H., Sankai T. (1998) Acrosome vesiculation in unincubated frozen-thawed cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. The international symposium on the molecular and cell biology of fertilization : Semicentennial celebration of the discovery of the acrosome reaction by Jean Clark Dan. *J. Reprod. Dev.* 44. P33 (suppl. P-11).
 - 2) Kita S., Ito M., Okada A. (1998) Effect of gravity load on cortical granule distribution in the mouse oocyte. The international symposium on the molecular and cell biology of fertilization : Semicentennial celebration of the discovery of the acrosome reaction by Jean Clark Dan. *J. Reprod. Dev.* 44 . P 38 (Suppl. P-16)
 - 3) 岡田詔子、五十嵐広明、黒田 優、喜多清、伊藤雅夫、山海 直、吉川康弘 : マウス卵母細胞のG負荷の影響と電顕観察。第39回日本哺乳動物卵子学会

サルおよびラット卵の体外培養系とその細胞骨格に関する研究
分担研究者 佐藤英明¹⁾・松本浩道²⁾ 東北大学大学院農学研究科教授¹⁾・助手²⁾

研究要旨 哺乳動物の卵子や胚の培養系は一部の動物種や発生ステージでは確立されているものの、多くの動物種や発生ステージの体外培養は未だ困難である。本研究では、サル卵子の体外成熟とラット胚の発生停止における体外培養系と細胞骨格について検討した結果、サル卵子の体外成熟には卵丘細胞の膨化が重要であること、またラット胚の発生停止には細胞骨格の異常が関わっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

サル卵子の体外培養、体外受精、体外発生は困難であり、適切なサル卵子の体外培養系の作出が重要課題となっている。また、哺乳動物胚を体外で培養すると多くの種で特有の細胞期で発生が停止する現象が起きる。この発生停止の機構解明は体外発生の研究において大きな課題である。そこで本研究では、細胞骨格の動態を指標とし、体外培養系の改善を目標とし、サル卵子の体外成熟とラット胚の発生停止における細胞骨格の動態について検討した。

B. 研究方法

サル卵丘卵子複合体を 20% FCS、10 µg/ml FSH、5 IU/ml hCG を添加した CMRL-1066 と 0.8 mM シス테인、10 IU/ml hCG、10 IU/ml PMSG、10%ブタ卵胞液を添加した NCSU-23 で成熟培養を行った。成熟培養後の卵子は、光学顕微鏡で観察した後、微小管と核を免疫蛍光染色し観察した。ラット胚は、発生阻害の生じる 2 細胞期を採卵し、mHECM-1 で培養し、経時的に微小管またはマイクロフィラメントと核を免疫蛍光染色し観察した。

C. 研究結果

サル卵丘卵子複合体を成熟培養した結果、NCSU-23 で培養した卵丘細胞でより大きな膨化が見られた。核相は、両区で MII 期に成熟していたが、NCSU-23 で大きく膨化した卵で典型的な紡錘体が見られ、他の卵は微小管が染色体から放射状に伸びているステージにあった。ラット発生阻害胚では、主要な細胞骨格である微小管とマイクロフィラメントの動態に異常がおきていた。経時的に観察した結果、この異常は発生阻害の起きる時期と一致していた。

D. 考察

サルの体外成熟を CMRL-1066 と NCSU-23 で行った結果、成熟率に差はないが、NCSU-23 で卵丘膨化率が大きく、成熟卵の微小管が典型的な分裂期である紡錘体を形成していたことから、NCSU-23 で培養することがサル卵子の体外成熟に有効であると考えられる。また、ラット胚の発生停止には、微小管とマイクロフィラメントの両方が関わっていた。

E. 結論

サル卵子の体外成熟過程における細胞骨格と卵丘膨化を検討した結果、NCSU-23 で培養することがより有効であった。また、ラット胚の発生停止と細胞骨格の動態異常には関連があることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsumoto H. Shoji N. Umezumi M. Sato E.: Microtubule and microfilament dynamics in rat embryos during the two-cell block in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, (1998) 281: 149-153.

2. 学会発表

Matsumoto H. Shoji N. Umezumi M. Sato E.: Distribution of mitochondria and cytoskeletal dynamics in rat embryos during the 2-cell block in vitro. Thirty-first Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Biology of Reproduction, (1998) 58 (Supplement 1): 191.

松本浩道、梅津元昭、佐藤英明：ラット発生阻害胚における細胞骨格とオルガネラの関係. 第 16 回日本受精着床学会講演抄録集 (1998): 92

生殖幹細胞への遺伝子導入によるトランスジェニック動物作出に関する研究

分担研究者 橋本 光一郎 明治乳業ヘルスサイエンス研究所
発生工学研究グループ 主任研究員

研究要旨 精原細胞の *in vitro*での増殖条件の検討とその細胞の機能性の評価と産仔作出のための精細管内移植

A. 研究目的

トランスジェニック動物作出のために、生殖幹細胞、特に雄のほぼ一生の間精子を生産し続けるために必要な雄性生殖細胞の幹細胞である精原細胞を遺伝子導入への対象の細胞として利用する方法の開発を本研究の目的としている。本年度は、(1) 昨年度報告した解離した胎仔精巣の細胞のマトリゲル包埋培養にて作出した精細管様構造物の成体精巣間充織内移植による精子の作出法により、細胞を解離した時点でリポフェクションによる遺伝子導入を実施した。また、効率的な遺伝子導入のためには選別培養が必要であることから、(2) 解離した精原細胞の *in vitro* 培養での増殖条件の開発を試みた。また、これらの培養した精原細胞の機能が維持されているか否かを検討する方法として、(3) 培養細胞の成体精細管内への移植方法について検討した。

B. 研究方法

(1) リポフェクトアミンを使用し、細胞を解離した時点でマニュアルに従ってマーカー遺伝子 (β ガラクトシダーゼ) をユビキタスな発現をさせるコンストラクトと半数体で発現させるためプロタミンのプロモーターにつないだコンストラクトを使用した。

(2) 精原細胞として新生仔期の精原細胞を使用し、まず精原細胞の培養条件に関する報告の多いラットにて *in vitro* 培養系を確立した後それ

をマウスへ適用するという方針で、研究を開始した。Wisterラット2.5日の新生仔精巣より精細管を単離し、酵素処理にて単細胞に解離したものを無血清培地を用いて37℃で6日間培養した。精原細胞の同定は形態で行った。増殖に効果があると報告されている増殖因子として白血球阻害因子 (LIF) と毛様体神経栄養因子 (CNTF) を添加しその効果を検討した。C57BL/6マウス1.5日新生仔の精巣を採取し、上記と同様にして培養した。

(3) C57BL/6マウス1-6日新生仔精巣より精細管を単離し、酵素処理にて単細胞に解離し、精原細胞とセルトリ細胞から成る細胞懸濁液を生殖細胞欠損 *W* ミュータントマウス *WBB6F1-W/W^v* の成体精細管内に、先端を研いだガラスキャピラリーを手で操作し、マウスピースにつないで注入した。移植の成否は組織学的に検討した。

C. 研究結果

(1) ユビキタスな発現ベクターにより、トランジエントな発現で導入効率を検討しリポフェクションの条件設定を行った。より高率にトランジエントな発現が観察された条件の正確な導入効率を求めることは、細胞塊を形成するため難しかったが酵素処理により細胞を解離して検討したところ、およそ1%であった。この条件では精原細胞の比率はおよそ1/4-1/5である。この条件で精原細胞に導入・組み込まれて半数

体の時点で発現するコンストラクトにより上記導入処理をした後精巣へ移植した。3ヶ月後組織学的に検討した結果、x-gal染色陽性細胞を認めることはできなかった。

(2) ラットの結果を図に示す。全細胞数はLIFやCNTFの添加・無添加に関係なく培養日数に従って増加した。精原細胞数はLIF添加区のみ増加が認められた。ラット精原細胞の同定法が確立していなかったため、同定法の確立しているマウスに材料を代えて同様の実験を行った。結果はLIF及びCNTFを添加した場合に精原細胞の増加が認められた。精原細胞の同定にモノクロー抗体TRA98、セルトリ細胞に対しては抗WT1抗体を使用し現在実験中である。

(3) 31個の生殖細胞欠損Wミュータント精巣へ移植し、1,2,4,8週後に順に4,4,9,14個を組織切片にして精原細胞を探した。移植後1週ではA型精原細胞を3精巣で、2週後ではA型を3精巣・B型精原細胞～精細胞を1精巣で確認した。4週後ではA型を9精巣・B型～精細胞を6精巣で、8週後ではA型を12精巣・B型～精細胞を6精巣・精子を4精巣で確認した。しかしながら、これら生殖細胞は移植細胞数に比べて数は極めて少なかった。

D. 考察

(1) リポフェクションにより精原細胞への遺伝子導入を確認することができなかった。トランジェントな発現での導入効率が低すぎたことがまずあげられるであろう。しかし、精原細胞への機能性を損なわないでリポフェクションが可能か否かについてはあまりにも情報が乏しいことから、リポフェクション以外の導入方法も検討する必要がある。

(2) 結果は精原細胞を形態的に同定した結果であり、より厳密な同定法による結果をみる必要がある。

(3) 精細管内へ注入した細胞数に比して、2ヶ月後の組織学的観察結果から推測される定着した細胞数は極めて少ない。注入直後にかなりの細胞が精巣上体へ逃げてしまうことが確認できたことから、この流出をいかにして阻止するかが重要な問題であると考えられる。

E. 結論

精原細胞の機能を維持した増殖条件の開発は、導入遺伝子が宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞の選別にとっても必要であるし、遺伝子導入方法として種々の培養細胞に対する導入方法を適用できる上、同一クローンを多数得ることにも必要である。精原細胞の精細管内移植により、Brimsterらは移植細胞由来産仔を得ている(改良する余地があるが)。精原細胞を遺伝子導入のための細胞として利用し、効率的に遺伝子導入動物を作出するためには、精原細胞の培養条件を確立することが急務であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1) 橋本光一郎

体外におけるマウスの精子形成
日本アンドロロジー学会第17回
学術大会シンポジウム

2) 橋本光一郎

胎仔生殖系列細胞の発生工学的操作によるTgマウス作出
生殖工学会第2回大会シンポジウム

rat germ - Sertoli cell coculture

