

201008011A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

精子幹細胞を用いた創薬モデルラットの作成技術の開発

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 篠原 美都

平成23（2011）年 5月

目 次

I. 総括研究報告 精子幹細胞を用いた創薬モデルラットの作成技術の開発	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	8
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	3 1

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（総括）研究報告書

精子幹細胞を用いた創薬モデルラットの作成技術の開発

研究代表者 篠原 美都 京都大学・医学研究科・助教

研究要旨

本研究ではES細胞でなく、精子幹細胞に基づく新しいノックアウト技術による創薬モデルラット作成技術の開発を目的としている。精子幹細胞は精子形成の源となる細胞であり、一生を通じて精巣内で自己複製増殖により維持され、かつ分化して多数の精子を産生する。我々の研究グループは2003年にマウス精子幹細胞の長期培養系を確立し、さらに2006年に培養細胞（Germline Stem; GS細胞と命名）に遺伝子導入した後、精巣内移植により精子へと分化させることで、ノックアウトマウスの作成に成功した。本研究ではこの技術をラットに展開し、ラットの精子幹細胞に遺伝子トランプとジーンターゲティングにより遺伝子改変し、ホモ変異個体を作成する技術の確立を目指す。

平成22年度の研究ではラットGS細胞が長期培養後も精子幹細胞としての機能的活性を維持していることを明らかにした。またラットGS細胞は遺伝子導入後の薬剤選択が困難であったため、培養液の組成の改変や低酸素下培養などを導入し、増殖速度の改善が認められた。しかしながら増殖速度や、遺伝子操作と薬剤選択によるクローンの樹立効率はGS細胞のラインによって大きくバラツキがあることが分かった。様々な系統のラットからGS細胞を樹立し、増殖速度やクローン樹立効率を調べたところ、遺伝的背景によって大きく影響されることが分かった。また血清成分がラットGS細胞の維持に悪影響を及ぼすことから無血清培地を開発し、マウスGS細胞において6ヶ月以上の長期培養に成功した。

遺伝子トランプベクターを導入したGS細胞をヌードマウス精巣に移植した後、顕微授精を行って産仔を作成したところ、高い頻度で巨大胎盤が認められた。インプリンティング遺伝子のメチル化を調べたところ、産仔の尻尾および胎盤においてはメチル化の異常は認められなかった。産仔は正常に発育し子孫を作成能を保持していた。次世代においては巨大胎盤が認められなかった。

平成21年度の研究ではラット由来のノックアウトベクター（Lesch-Nyhan病の原因遺伝子であるHprt、癌抑制遺伝子p53、接着因子occludinの破壊ベクター）をラットGS細胞へ導入し、薬剤選択によりHprt遺伝子につき44個、Occludin遺伝子にて146個のクローンを樹立した。平成22年度の研究ではPolymerase chain reaction (PCR) 法とサザンブロッティングによりOccludin遺伝子にて2個の相同組み換えクローンを同定した。これらのクローンをヌードマウスおよびラットのレシピエント精巣に移植を行ったところ、コロニー形成が認められた。Synaptonemal complex protein 3 (SYCP3)抗原への抗体を用いて免疫組織染色によりドナー細胞由来の減数分裂像が認められた。

A. 研究目的

遺伝子ノックアウト動物の作成は現在マウスしか一般的方法が確立していない。それは他種のEmbryonic Stem(ES)細胞から子孫を作成できないためである。しかし創薬や神経疾患、糖尿病などで必要とされる生理学的解析に、マウスでは限界がある。小型実験動物のラットは、ヒトに近い薬剤反応を示す他、マウスより手術操作が容易で、高次な神経機能を持つという利点がある。そのため次世代の疾患モデルとして期待でき、遺伝子ノックアウト技術開発の必要性が唱えられてきた。

本研究ではES細胞でなく、精子幹細胞に基づく新しいノックアウト技術による創薬モデルラット作成技術の開発を目的としている。研究代表者らはこれまで精子幹細胞を中心とした生殖工学技術の開発を行い、2003年にマウス精子幹細胞の長期培養系(Germline stem, GS細胞)を世界に先駆けて確立した(Kanatsu-Shinohara M., et al., Biol. Reprod. 69,612-6,2003)。これを用いて相同組換えにより遺伝子ノックアウトマウス作成にも成功した(Kanatsu-Shinohara M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 8018-23,2006)。本研究全体では、遺伝子トランプ法の改善および相同組替えにより遺伝子ノックアウトラットの作成を試みる。平成22年度は長期培養によるラットGS細胞の機能的活性への影響や、培養条件の改善を行ったほか、遺伝子操作後のGS細胞から顕微授精にて産仔を作製し、その発育やインプリンティング遺伝子のメチル化への影響を調べた。またoccludin遺伝子のターゲティングベクターをGS細胞に導入して得られたstable cloneから相同組み換え体をスクリーニングした。

B. 研究方法

(1) 培養条件の改善：

GS細胞における遺伝子導入とクローンの樹立は、マウスと比べてラットでは薬剤選択の効率が依然低く、特にウイルスベクターではクローン樹立の効率が良いがプラスミドを用いた場合には低いことなど、実用的なプロトコルの確立のために多くの改善点があった。特にランダムな遺伝子挿入でなく遺伝子相同組み換えによるターゲティングのためには効率の改善が必須である。平成22年度の研究では平成21年度に引き続き新規

増殖因子のスクリーニングや無血清培地の開発・遺伝的背景による影響など、培養の諸条件を検討し、薬剤選択法の改善を行うとともに、長期培養や薬剤選択によってGS細胞の安定性や子孫作性能に及ぼす影響を調べた。

生後10-15日齢のラット精巣細胞をGlial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)やbasic Fibroblast growth factor (bFGF)を含む培養液にて培養することにより樹立したGS細胞を用いて、血清成分や、各種添加物、サイトカインの濃度などを改変することでラットGS細胞の増殖に適した組成を検討した。またラミニンを用いたフィーダーフリー培養と、Mouse embryonic fibroblasts (MEF)を用いたフィーダー細胞との共培養にて、増殖速度や薬剤選択への影響を調べた。さらに低酸素培養の増殖・薬剤選択への影響を調べた。

(2) ラット系統による差異の検討：

様々な系統のラットにおいて、生後10-18日齢の精巣からGS細胞の樹立を試み、その樹立・増殖効率を比較した。SDの他、Wistar, Lewis, Long-Evans, Donryuなどの系統や、これらの系統間のF1種を作成し、それぞれGS細胞を樹立して、樹立効率や増殖速度・クローン樹立効率を比較した。

(3) 新規無血清培地の開発によるGS細胞のSerum&Feeder-free cultureの確立

これまでの研究で、ラットGS細胞はマウスGS細胞と異なり、1%以上の高濃度の血清で維持できない事が分かっている。また、フィーダーとの共培養ではラミニンによるフィーダーフリー培養と比べ増殖速度が著しく低下することから、フィーダー細胞や血清がGS細胞の維持に悪影響を及ぼす可能性が高い。血清成分には未知の物質が含まれており、用いる血清の種類によりGS細胞の増殖・維持に及ぼす作用も一定でないことから、GS細胞をフィーダー細胞や血清を用いずに培養する方法の確立が必要である。これまでGS細胞のSerum&Feeder-free培養はできなかったが、本年度の研究にて新規無血清培地を開発し、マウスGS細胞のSerum&Feeder-free条件による長期培養を試みた。

(4) 遺伝子トランプ遺伝子改変ラットの作成

平成21年度の研究で、**Molony** ウイルス由来のプロモータートランプベクター (**ROSA-b-geo**) をラット細胞に導入した後、**G418** を用いた薬剤選択にてクローンを樹立した。平成22年度の研究ではそれらの **GS** 細胞をヌードマウスの精巣に移植を行った後、顕微授精にて産仔の作成を試みた。産まれた産仔の発育と胎盤重量の測定・インプリンティング遺伝子のメチル化への影響などを調べた。

(5) 遺伝子ターゲティングベクターの作成

平成21年度の研究で、**Occludin** 遺伝子 (接着因子・マウス **GS** 細胞でジーンターゲティングに成功した)、**Hprt** 遺伝子 (**Lesch-Nyhan** 病の原因遺伝子で **X** 染色体上にある)、**p53** 遺伝子 (癌抑制遺伝子) について **SD** ラット由来のゲノム **DNA** を用いて作成したノックアウトベクターをラット **GS** 細胞に導入し、**stable clone** を樹立した。平成22年度の研究ではこれらのクローンを **PCR** 法とサザンブロッティングにより調べ、相同組み換え体のスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いについては、京都大学大学院医学研究科の実験動物規定に従い、その内容につき審査で適当とされたもののみ取り組んだ。また実験方法・飼育方法を含め、米国の国立衛生研究所(**NIH**)が詳細なガイドラインを提示しているが、本研究はこのガイドラインに準拠して行った。

本研究にはヒト組織を利用した研究は含まれていない。

C. 研究結果

(1) 培養条件の改善：

生後10-15日齢のラット精巣細胞から、**Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)**や **Fibroblast growth factor (FGF2)** を

含む培養液にて樹立した **GS** 細胞を用いて、増殖因子をスクリーニングした。ラミニンにて **GS** 細胞を播種し、マイクロアレイデータを参考に候補となるサイトカインを培養中に添加して7-8日後に細胞を回収し、増幅率により効果を判定した。**FGF9** を添加することにより **GS** 細胞の増殖は亢進した (図1)。他の **FGF** ファミリーの分子の中では、**FGF18**や**FGF19**が **FGF9** に次いで効果が認められた (図2)。また、**PDGF-CC**と**GDF-11** により増殖が亢進した。この二つの分子は相乗的に作用することが分かった (図3)。

Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) を発現するトランスジェニックラット **TgN (act-EGFP)Osb4** (大阪大学・岡部勝博士より供与)から **GS** 細胞を樹立し、**FGF9** を含有する培養液にて長期培養を行った。ヌードマウスをホストとして、長期培養したラット **GS** 細胞を精細管内に注入し、コロニー形成能を調べた。ラットの精子幹細胞はヌードマウス精巣への異種移植により、ドナー由来の精子に分化することが知られている。生後6週齢の **KSN/nu** マウスに **Busulfan** を腹腔内投与した後、副作用の貧血を緩和するため骨髄移植を行った。移植後約3ヶ月で精巣を摘出し、**UV** 照射にて **EGFP** を発現するコロニーの数をカウントし、幹細胞数を算出した。最も長期に培養をおこなったもので、培養開始から922日のものでもコロニー形成が認められた。822日の培養により **GS** 細胞は総細胞数で 2.6×10^{55} 倍に、幹細胞数で 2.2×10^{55} 倍に増幅した (表1)。培養期間が116日と443日のものについて、顕微授精により産仔を作成した。

ラット **GS** 細胞はラミニンプレートにて倍加速度2.5日と比較的良好に増殖する。一方、**mouse embryonic fibroblast (MEF)** をフィーダー細胞として用いた条件では倍加速度3.9日と増殖は遅い (図4)。しかしラミニンにて **neo** 耐性遺伝子と **EGFP** を発現する遺伝子を導入し、**G418** による薬剤選択を行ったところ、薬剤耐性コロニーの増殖は見られなかったのに対し、**MEF** による培養では薬剤耐性コロニーの増殖が見られた。ラット **GS** 細胞はラミニンにおいては平面的な増殖をするのに対し、**MEF** 上では立体的な

コロニーを形成することが、薬剤への反応性の違いの原因ではないかと考えられる(図5)。フィーダー細胞によりラット GS 細胞の増殖効率は低下するものの、薬剤選択において立体的コロニー形成を促すフィーダーとの共培養の方が有効であると判断し、MEF における薬剤選択条件の改善を試みた。

ラット GS 細胞を5%の低酸素条件化で培養を行うと、5日間の培養期間で通常の約1.41倍に増殖効率が亢進した(図6)。また11日間の薬剤選択により通常の培養条件に比し、有意に大きな薬剤耐性コロニーの形成が見られた(図7)。

(2) ラット系統や年齢による差異の検討:

細胞株間、または遺伝的背景の異なる株間で GS 細胞の増殖や薬剤選択の効率がどのように影響されるかを検討するため、様々な系統のラット精巢から GS 細胞の樹立を行った。まず Sprague-Dowly (SD) から複数の細胞株を樹立した。SD 由来の細胞株7個についてラミニンプレートに播種し、6日間に細胞が増える割合を測定した。増殖速度は同一系統内でも多少バラツキが認められたが、維持が全くできない細胞株は殆ど見られなかった(図8-A)。これらの細胞株に Molony ウイルス由来のプロモーターラップベクター (ROSA-b-geo) を導入し、G418 による薬剤選択を行った。薬剤選択によるクローンの樹立効率は細胞株間でのバラツキが大きく、特に全くクローンに樹立できない細胞株が7株中2-3株見られた(図8-B)。一方、クローンを樹立できない細胞株は外観や増殖効率などについては、特に他のものと差が認められなかった。

また Wistar のほか、Donryu, Lewis, Brown Norway (BN) などと SD との F1 hybrid から GS 細胞を樹立した。マウス GS 細胞の場合と異なり、どの系統からも GS 細胞を効率よく樹立することができた。これらの細胞株をラミニンプレートに播種し、6日間に細胞が増える割合を測定した。増殖は異なる遺伝的背景によって大きな差は認められなかった(図8-C)。

ROSA-b-geo をこれらの細胞株に導入し、薬剤選択を行った。薬剤選択効率については遺伝的背景により大きな差異が見られ、Wistar や BN/SD F1 由来の GS 細胞のクローン樹立効率が極めて低いのに対し、Donryu/SD F1, Wistar/SD F1 などの hybrid が好成績を示した(図8-D)。

(3) 新規無血清培地の開発によるGS細胞の Serum&Feeder-free culture の確立

我々が2003年に報告した初めのマウス GS 細胞培養系は1%の血清と GDNF, bFGF, EGF を含む培地で MEF をフィーダー細胞として用いていた。その後 laminin を使ったフィーダーフリー培養を報告しているが、血清の存在下でのみフィーダーフリーが可能だが、無血清培地ではフィーダーを用いなければ長期維持ができなかった。GS 細胞は血清成分の低下により laminin への接着性の低下や増殖停止が起きる(図9、10)。

無血清条件下で GS 細胞への接着性を亢進する因子をスクリーニングした結果、血清成分の約45%を占めるといわれる糖タンパク質である Fetuin に効果があることが分かった。血清の非存在下では Laminin への接着が約30%前後と著しく低下する。しかし 30 µg/ml 以上の Fetuin 添加により接着活性は 70-80% と、1%血清入りの場合とほぼ等しいレベルまで回復した(図11)。

Fetuin により接着活性のみでなく GS 細胞の増殖も若干促進するが、血清の存在下に比して依然増殖効率は低かった。ところが、この培地にさらに脂質を添加することにより、GS 細胞の増殖が亢進することが分かった(図12)。また、脂質を添加して得られるコロニーの形はこれまでのフィーダーフリー培養で見られる平面的なものでなく、MEF との共培養に見られるような立体的な形をしていた(図13)。脂質代謝の主要な酵素の一つである Sphingosine kinase の阻害剤を GS 細胞の培養に添加すると、著しく細胞の増殖が阻害されただけでなく(図14)、精巢への移植アッセイで得られる細胞数あたりのコロニーの数も低下した(図15)。Lipid は細胞の増殖維持だけでなく、幹細胞活性の維持にも重要であること

が示唆された。

この Serum&Feeder Free 培養による GS 細胞では精原細胞マーカーの integrin や EPCAM、CD9 などの発現が血清のある場合と同様に保たれていた (図 16、17)。一方 SSEA-1(FUT4)は発現がなかった。c-Kit の発現がやや亢進していることから、この培養条件はやや分化傾向が強い可能性が示唆された。核型やゲノムインプリンティングも、正常なパターンを維持していた (図 18、19)。

この培養条件のもとでは、倍加速度約 4.1 日で比較的安定して増殖を維持し、6ヶ月間で 1.9×10^{12} 倍まで増幅した (図 20)。長期培養を行った細胞を W マウス精巣内へ移植するとコロニーを作り、精子への分化が観察されたが (図 21)、血清入りで培養された GS 細胞に比べると、細胞あたりのコロニー数が半分以下に低下していた (図 22)。一般に無血清培地の方が幹細胞の分化が少ないとされているが、この結果は Serum-Feeder Free 培養は血清入りの場合に比べ、むしろ分化傾向が強い可能性を示唆している。これまでの研究から我々は G1 cyclin の発現量が精子幹細胞の自己複製と分化の制御において重要な役割を果たすと考えている。とくに Cyclin D2 が発現すると精子幹細胞は自己複製分裂をするということや、CyclinD1 の発現レベルが精子幹細胞の分化制御に関わっている事などが示唆されている。そこで Real-time PCR で cyclin の発現を調べたところ、血清入りのものより Serum&Feeder Free では Cyclin D1 の発現が著しく低下していた (図 23)。無血清培地による幹細胞活性の低下に Cyclin D1 を介したシグナルが分化に関与する可能性が示唆された。

移植精巣で形成されるコロニーでは分化度も血清入りの場合より低下していたが、6ヶ月以上培養した GS 細胞にて、完全な精子への分化が認められた。Round spermatid を用いて顕微授精を行ったところ、67個の受精卵を作成して1匹の産仔を作成することができた (図 24；理化学研究所：小倉淳郎博士との共同研究による)。産仔の作成効率は顕微授精で約 6.7%以下と非常に低い点に今後改善の必要が示唆されるが、産仔自体は正常に

発育し自然交配で子孫を作ることができた。

(4) 遺伝子トラップ遺伝子改変ラットの作成

Molony ウイルス由来のプロモータートラップベクター (ROSA-b-geo) をラット GS 細胞に導入した後、薬剤選択して樹立したクローンから産仔の作成を行った。

ヌードマウスの精細管内に移植し、3-6ヶ月ほど経過してから顕微授精を行った (表 2；生理学研究所、平林真澄博士との共同研究による)。EGFP を発現するコロニーから Round spermatid を回収し、SD ラット由来の卵子に注入した。SD 由来のクローン(#886)からは高頻度に巨大胎盤を伴う出産が認められた (図 25、26、表 3)。一方 Wistar 由来のクローン (#1122, #1176) から産まれた産仔には異常が見られなかった。核移植技術によって作成された産仔で高頻度に巨大胎盤が出現することが報告されており、インプリンティング遺伝子の発現異常の関与が指摘されている。そこで Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法により、インプリント遺伝子の differentially methylated region (DMR)におけるメチル化を、産仔および胎盤のゲノム DNA について解析した (図 27)。母親性インプリント遺伝子の H19 や Meg3 IG、父親性インプリント遺伝子の Igf2r, Peg5, Peg10 について解析した。GS 細胞は H19 や Meg3 IG の DMR において完全にメチル化され、逆に Igf2r, Peg5, Peg10 は完全な非メチル化をされた、典型的な雄型のパターンを示していた。しかし産仔の尻尾 DNA や胎盤 DNA は一様に体細胞型のメチル化を示していた。このことから観察された巨大胎盤はこれらのインプリンティング遺伝子のメチル化の異常が原因で生じたものではない可能性が示唆された。

巨大胎盤を伴って産まれた産仔は、正常に発育し、自然交配により産仔を作成した。次世代において巨大胎盤は認められなかった。

(5) 遺伝子ターゲティングによるノックアウトラットの作成

平成 21 年度の研究で EGFP を発現するトランスジェニックラット TgN (act-EGFP)Osb4 から樹立した GS 細胞に、エレクトロポレーションにて Occludin 遺伝子のノックアウトベクター (図 2 8) を導入し、G418 を用いて neomycin 耐性能を獲得したクローンを選択し、安定的に遺伝子導入された 146 個のクローンを樹立した。平成 22 年度の研究ではこれらのクローンから PCR・サザンブロットにて相同組換え体をスクリーニングし、二個の相同組み換え体を同定した (図 2 9、3 0)。これらの GS 細胞をヌードマウスの精細管内に移植し、3-5 ヶ月後精巣を摘出し UV 照射にて観察を行ったところ、EGFP を発現するドナー細胞由来のコロニー形成が認められた (図 3 1)。さらに synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) 抗原に対する抗体にて免疫組織染色を行ったところ、synaptonemal complex の形成が認められることから、減数分裂の進行が確認された (図 3 2)。

D. 考察

これまでの研究で、ラット GS 細胞培養株はラミニプレートを用いたフィーダーフリー培養においてはマウス GS 細胞とほぼ等しい増殖効率を達成できることが分かった。しかし平面的なコロニーを形成するフィーダーフリー培養においては G418 による薬剤選択が困難であった。一方、MEF をフィーダー細胞とした共培養では立体的なコロニー形成により薬剤選択が可能であるが、増殖速度が低いことが問題となった。低酸素条件での培養により増殖速度は改善され薬剤選択が可能となったが、依然マウスに比べると増殖速度が劣り、クローン樹立効率が著しく低いことから、さらなる改善が必要である。その原因の一つとして、ラット GS 細胞のライン間のばらつきの大きさが考えられる事や、ラットの系統が影響する可能性が平成 22 年

度の研究で示唆された。本年度の研究では特に立体的なコロニー形成を支持する培養形態における増殖速度の促進をめざすとともに、安定して効率のよいラットの系統を検索する。

平成 22 年度の研究で、マウス GS 細胞にて新規に開発した無血清培地にて長期の幹細胞活性の維持が可能であることが分かった。平成 23 年度の研究では Fetuin と Lipid Concentrate を添加した無血清培地をベースに改変し、ラット GS 細胞の増殖の促進を試みる。

遺伝子ターゲティングによるノックアウトラットの作成については、これまでの研究で Occludin 遺伝子にて 2 個の相同組み換えクローンを同定した。ヌードマウスおよびラットのレシピエント精巣に移植を行ったところ、コロニー形成および減数分裂像が認められた。平成 23 年度の研究ではこのクローンからの個体作成と解析を目指す。

E. 結論

平成 22 年度の研究から、ラット GS 細胞によって相同組み換えが可能であることや、GS 細胞の長期培養によって産仔作成能が維持できることが分かった。しかしながら、GS 細胞のラインによる増殖効率やクローン化効率にばらつきがあること、またトラップクローン由来の産仔に巨大胎盤が高頻度に出現することなど、改善すべき課題も明らかになった。平成 23 年度の研究ではこれらの問題に取り組みながら、相同組み換えクローンからノックアウトラットの作成を試みる。

F. 健康危険情報

得られた成果の中で健康危険情報に該当するものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinohara T., Ishii K., Kanatsu-Shinohara M. Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *J. Reprod. Dev.* 2011 Jan 6. PMID:21224526

Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Morimoto H., Ogura A., Shinohara T. Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol. Reprod.* 2011; 84(1):97-105

Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Germline modification using mouse spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol.* 2010; 477:17-36

Iwasa T., Baba S., Doi H., Kaichi S., Yokoo N., Miwa T., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T., Nakahata T., Heike T. Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 400(1):27-33

2. 学会発表

平成 22 年 6 月 3-4 日

新学術領域 第三回領域会議

篠原美都「CDK インヒビター p21 と p27 による精子幹細胞の制御」

筑波大学附属下田臨海実験センター

平成 22 年 6 月 26 日

11th International Symposium on Spermatology

Takashi Shinohara, Seiji Takashima, Mito Kanatsu-Shinohara

“Positive and negative regulators of mouse spermatogonial stem cell self-renewal”

沖縄コンベンションセンター

平成 22 年 7 月 26-28 日

特定領域研究 班会議

篠原美都「精子幹細胞の制御における CDK インヒビター p21 と p27 の関与」

門司港ホテル

平成 22 年 10 月 16 日

アステラス病態代謝研究会 第 41 回研究報告会

篠原美都「生殖細胞特異的な遺伝情報場の継承のメカニズムの解明」

東京・経団連会館

平成 22 年 11 月 8-9 日

新学術領域研究 「配偶子制御」第 4 回領域会議

篠原美都「マウス精子幹細胞ニッチェ制御における G 蛋白質分子の役割の解明」

葉山・IPC 生産性国際交流センター

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinohara T., Ishii K., Kanatsu-Shinohara M.	Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	In press		2011 PMID:21224526
Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Morimoto H., Ogura A., Shinohara T.	Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells.	<i>Biol. Reprod.</i>	84(1)	97-105	2011
Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T.	Germline modification using mouse spermatogonial stem cells.	<i>Methods Enzymol.</i>	477	17-36	2010
Iwasa T., Baba S., Doi H., Kaichi S., Yokoo N., Miwa T., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T., Nakahata T., Heike T.	Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	400(1)	27-33	2010

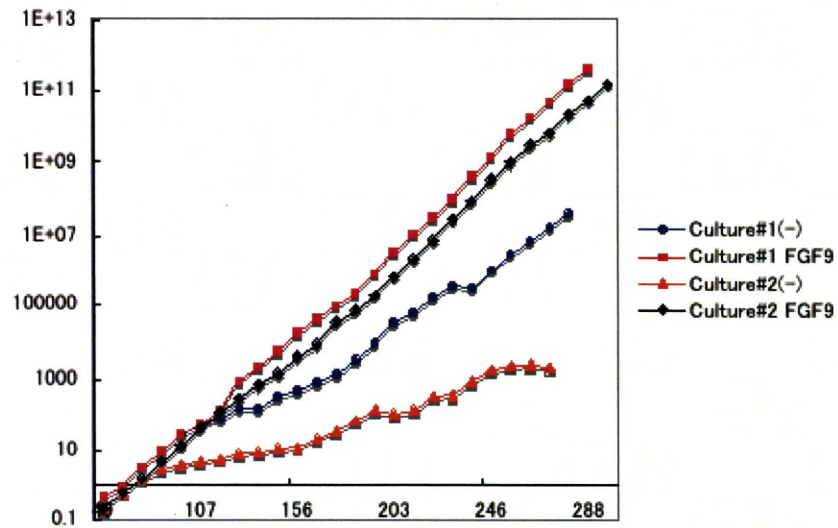


図 1 : GS細胞の長期培養におけるFGF 9 の作用
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートにて長期培養を行い、細胞の増殖曲線をしめした。FGF 9 の添加によりGS細胞の増殖が亢進した。

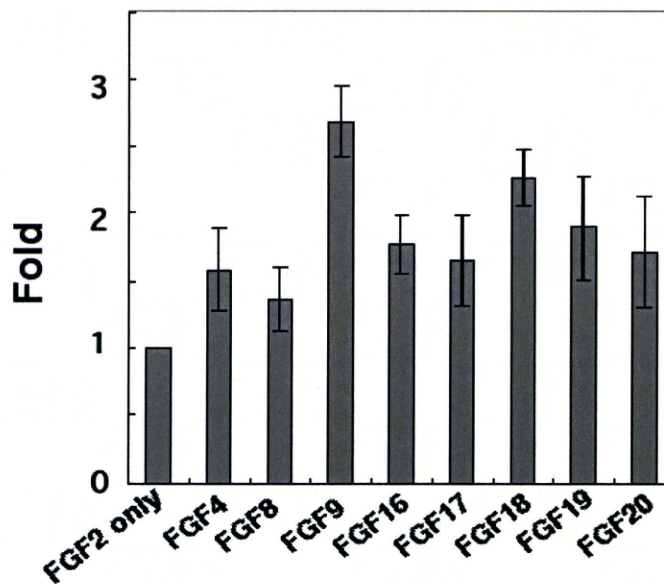


図 2 : FGFファミリー分子のラットGS細胞増殖への効果
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、7日後の増幅率を示した。FGF 9 が最も増殖促進効果が高く、次いでFGF18も効果が認められた。

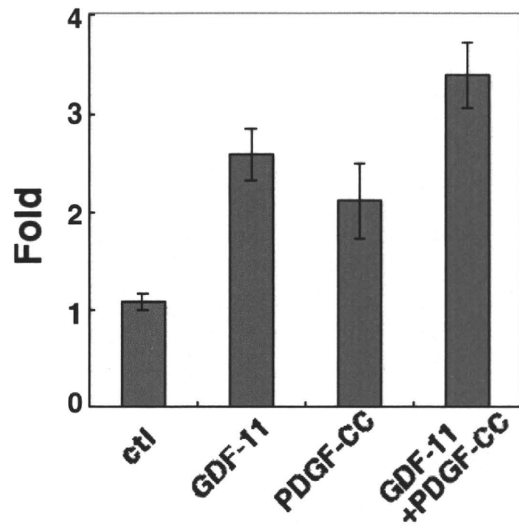


図3：GS細胞増殖におけるGDF-11とPDGF-CCの効果
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、7日後の増幅率を示した。GDF-11とPDGF-CCは増殖促進効果が認められ、さらに相乗効果があった。

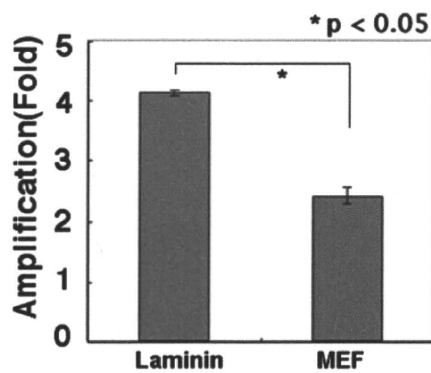


図4：ラミニンによるフィーダーフリー培養とMEFとの共培養
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、7日後の増幅率を示した。MEFとの共培養はフィーダーフリー培養に比し、増殖率が低い。

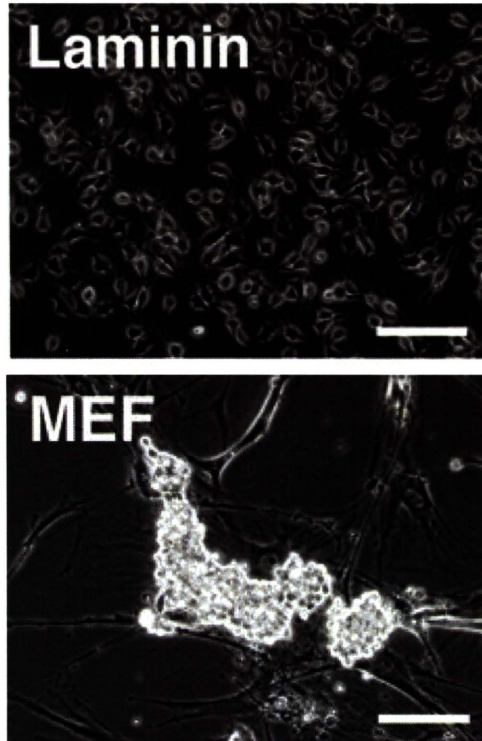


図5：ラミニンによるフィーダーフリー培養とMEFとの共培養
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、6日後のコロニー形成。（上）ラミニンによるフィーダーフリー培養：GS細胞は平面的なコロニーを形成する、（下）MEFとの共培養：立体的なコロニー形成をする。Bar=100 μm

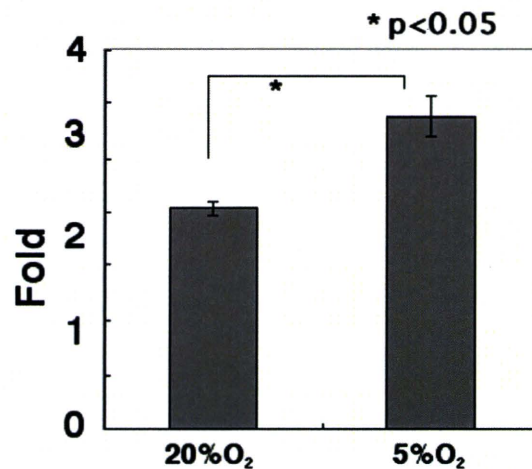


図6：低酸素条件での培養におけるGS細胞の増殖の亢進
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、6日後の増幅率を示した。通常の酸素濃度における培養の約1.41倍の増幅率が得られた。

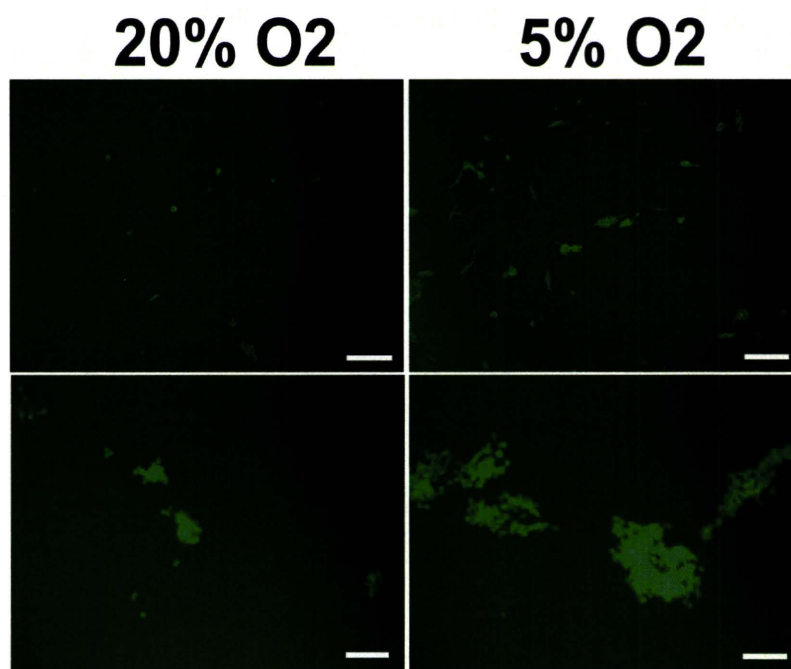


図7：低酸素条件にてG418による薬剤選択

EGFPを発現するGS細胞にneo耐性遺伝子を導入した細胞株について、MEFとの共培養のもと、40 $\mu\text{g/ml}$ G418にて11日間薬剤選択を行った後のコロニー形成。低酸素条件におけるコロニーは通常の酸素濃度のものより大きい。

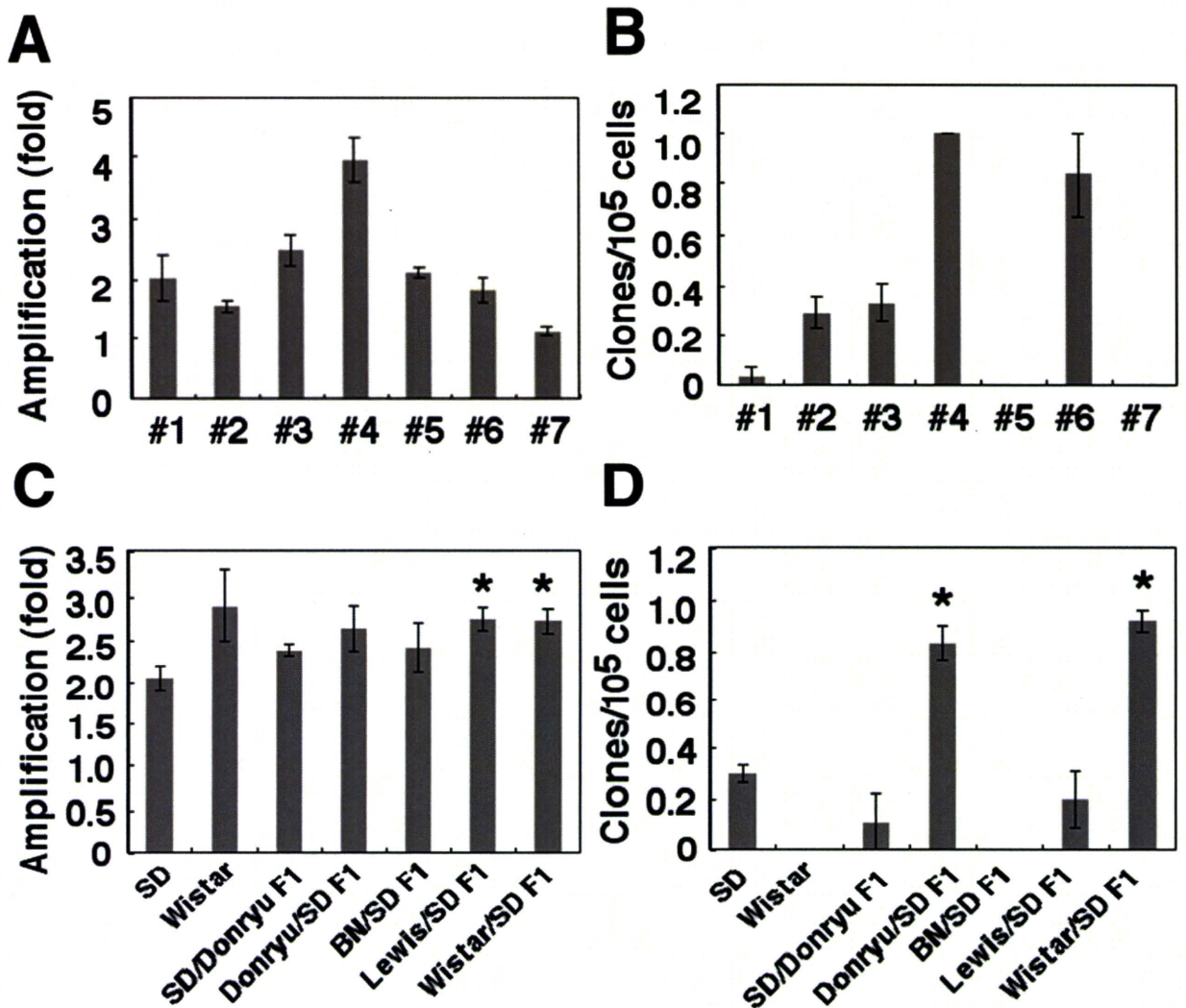


図8：GS細胞株におけるクローン間の差異と系統差

(A) SD由来GS細胞株の増殖活性におけるライン間の差異。SDラットから樹立した7個のGS細胞株について、ラミニンコートしたプレートに播種し、6日後の増幅率を示した。(B) SD由来GS細胞株の薬剤選択効率におけるライン間の差異。1 x 10⁵個細胞にROSA-β-geoウイルスを用いて遺伝子導入を行い、G418による薬剤選択にてクローンの樹立できた頻度を示した。7ライン中2ラインでクローンを全く樹立できなかった。(C)GS細胞の増殖活性における系統差。各系統から樹立した7個のGS細胞株について、ラミニンコートしたプレートに播種し、6日後の増幅率を示した。（*SDに比し有意差が認めれた。P<0.05）(D)GS細胞の薬剤選択効率における系統差。1 x 10⁵個細胞にROSA-β-geoウイルスを用いて遺伝子導入を行い、G418による薬剤選択にてクローンの樹立できた頻度を示した。Donryu/SD F1およびWistar/SD F1のhybridは高頻度にクローン樹立された。（*SDに比し有意差が認めれた。P<0.05）

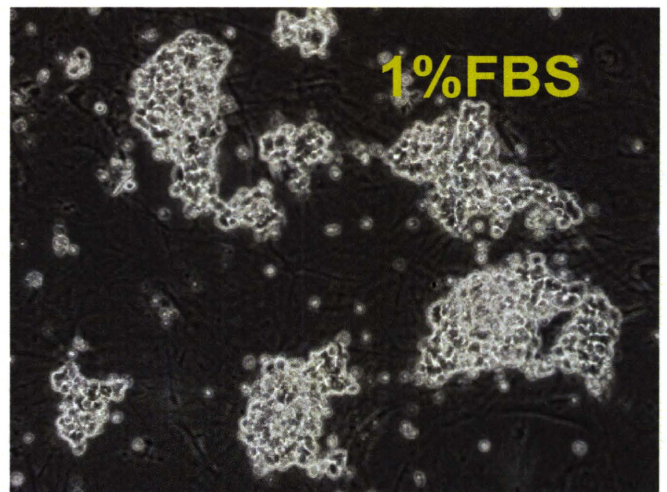
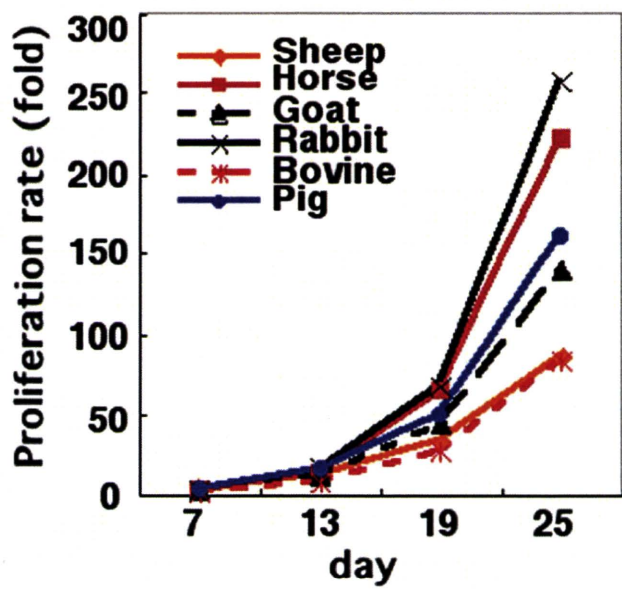


図 9 : 血清の種類による増殖への影響。
 マウスGS細胞にて各種血清の増殖に及ぼす効果を調べた。

図 1 0 : 従来のSerum & Feeder-free培養におけるGS細胞の増殖低下。

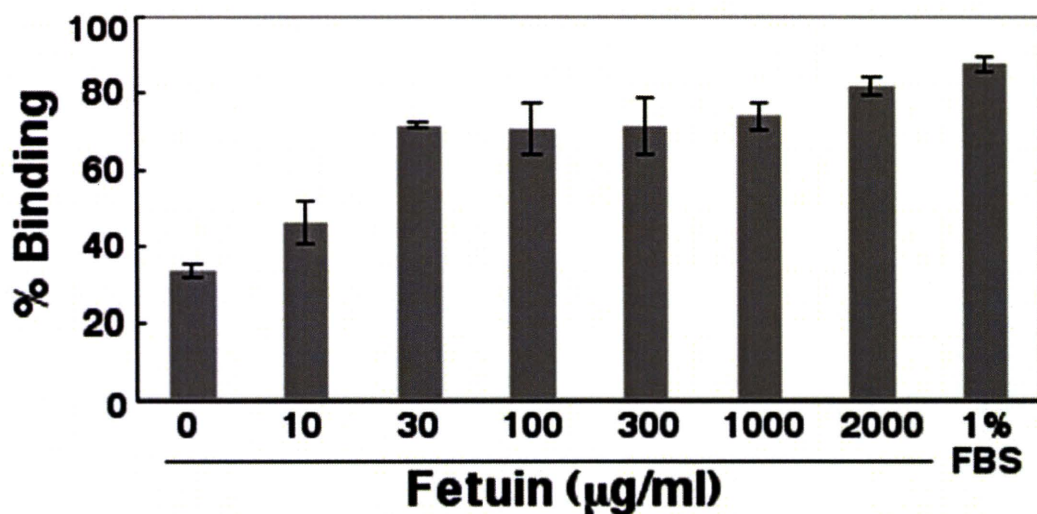


図 1 1 : Fetuin によるGS細胞のラミニンへの接着性の亢進。
 マウスGS細胞をラミニンコートプレートに播種し、24時間後に接着する割合を示した
 もの。無血清培地にFetuinの添加により接着性の回復が認められる。

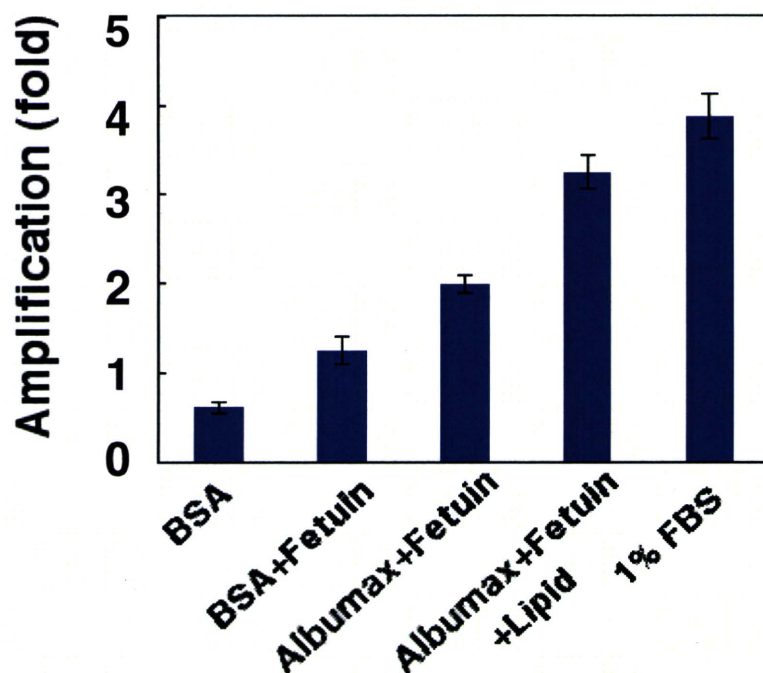


図 1 2 : 脂質によるGS細胞の増殖活性の亢進。
 マウスGS細胞をラミニンコートプレートに播種し、無血清培地にFetuinおよび脂質を
 添加し、効果を調べたもの。6日間の培養後、細胞の増幅率を示した。

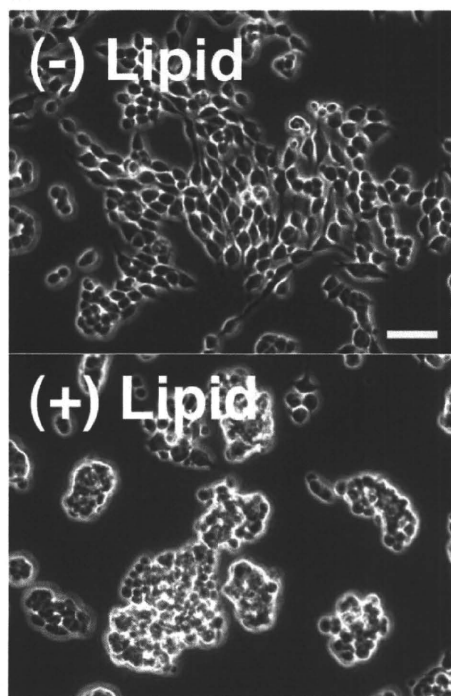


図1 3 : 脂質の添加によるGS細胞コロニーの形態の変化。
ラミニンコートプレートにGS細胞を播種した。脂質の添加により平面的な形態から、
立体的なコロニーへと変化した。

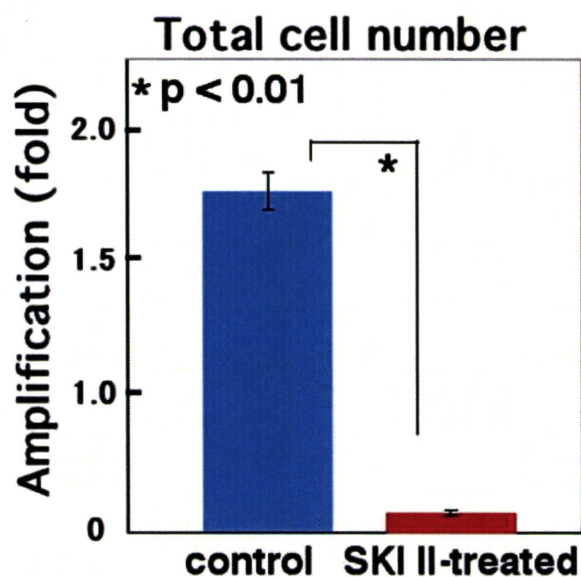


図 1 4 : Sphingosine kinase 阻害剤によるGS細胞の増殖阻害。マウスGS細胞をSphingosine kinase 阻害剤 II の存在下で培養し、5日後の細胞の増幅率を示したものの。

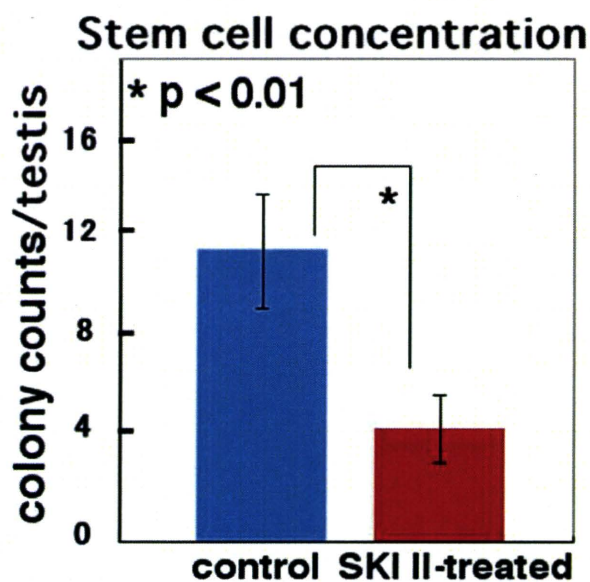


図 1 5 : Sphingosine kinase 阻害剤によるGS細胞の幹細胞活性の低下。マウスGS細胞をSphingosine kinase 阻害剤 II の存在下で培養し、5日後に細胞を回収し、精巢内移植により幹細胞活性を測定した。

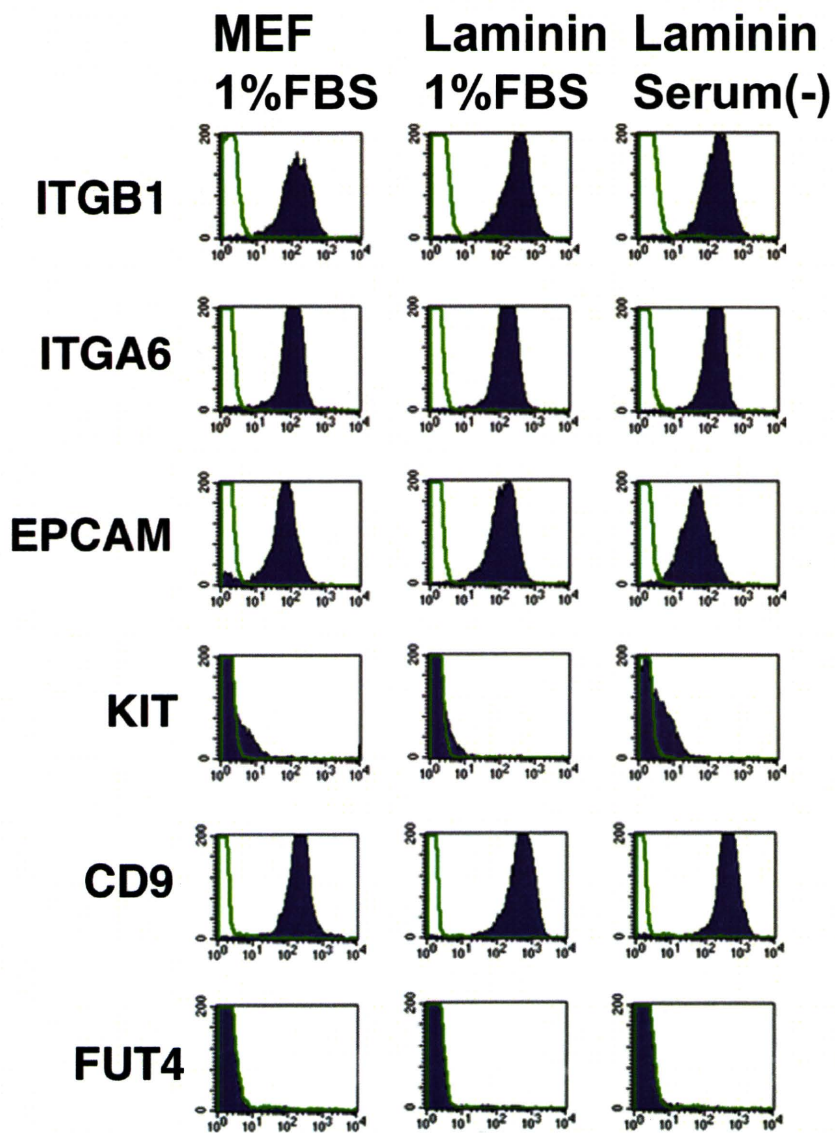


図16：フローサイトメトリーによるSerum&Feeder-free条件における精子幹細胞培養のマーカの発現。