

20110002B (1/2)

別紙1

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作成技術の開発

平成21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 敬

平成24(2012)年 5月

1/2冊

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 敬

平成24（2012）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	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	38

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
（総合）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 田中 敬 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を遺伝子トラップとジーンターゲットイ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した。

本研究ではラット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。この培養方法がラットにも応用可能であることを示した。

遺伝子トラッ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することに成功した。高い頻度で巨大胎盤が認められたため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、次世代においては巨大胎盤が認められなかった。このヘテロ個体の交配により、ホモ遺伝子破壊ラットの作成に成功した。

ジーンターゲットイングに関しては、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。Polymerase chain reaction (PCR) 法とサザンブロッティングによりOccludin遺伝子にて相同組み換えクローンの同定に成功した。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、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。しかしながら得られた円形精子細胞から個体を作成することは出来ず、GS細胞の移植法などを改善する必要がある課題が明らかになった。

## 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な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、遺伝子トラップ法および相同組換え法により遺伝子ノックアウトラットの作成を試みる。まず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。そしてGS細胞への遺伝子導入・薬剤選択法の改善と、それによるクローン樹立を行った。さらに遺伝子操作後の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から相同組換え体をスクリーニングした。遺伝子トラップにより得られた産仔からホモ個体を作成し、サザンブロットティング及びPCRにより遺伝子発現や表現型の解析を行った。ジーンターゲティングについても、得られた相同組換え体クローンを精巢に移植したヌードマウスから顕微授精により産仔を得ることを目指した。

## 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。本研究では培養条件の改善を行うとともに、改善したプロトコルによって遺伝子トラップ・ターゲティングクローンの樹立を目指し、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た。さらに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 日齢のラット精巢細胞を 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。

GS 細胞の cDNA を定法により採取し、マイクロアレイデータを参考に精子幹細胞の増殖を促進する分子の候補を選定した。これらの候補となるサイトカインを培養中に添加して新規増殖因子をスクリーニングした。GS 細胞に培養中追加し、約 6 日~8 日後に細胞の増殖率から効果を判定した。

薬剤耐性について、neomycin と puromycin の耐性遺伝子を pgk プロモーターの下流に挿入したベクターを作成し、Amaxa 社の Nucleofector Kit T を用いて SD ラット GS 細胞にエレクトロポレーションにより導入した。導入後、約 5 日後から neomycin と puromycin を添加した。細胞の密度が低下すると GS 細胞の増殖が低下するため、継代の際適宜野生型の細胞を混ぜ、数回薬剤選択を繰り返した。最終的にクローンの樹立頻度から薬剤選択効率を比較した。

(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細胞の無血清・フィーダーフリー培養はできなかったが、培養液の改変により無血清・フィーダーフリー培養を試みた。マウスGS細胞を通常のMEF(mouse embryonic fibroblast)でなくラミニン上にて培養し、血清成分を代替できる因子をスクリーニングした。確立した培養条件にて継代培養を行い、4ヶ月の増殖維持を試みた。また培養細胞を精巣内移植し、幹細胞活性を調べた。精巣への移植は内因性の精子形成の欠損しているWマウスをレシピエントとして用いた。約3ヶ月後に精巣におけるコロニー形成をGS細胞に発現するEGFPの発光により検知した。フローサイトメトリーを用いてEpCAM, Integrin, など精原細胞マーカーの発現を調べた他、c-Kit, SSEA-1などの発現を調べた。同時にcDNAを作成し、RT-PCR法により精原細胞マーカーの発現を調べた。

さらにこの無血清・フィーダーフリー条件による培養をラットGS細胞に応用することを試みた。

(4) 遺伝子トラン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ンプベクター (ROSA-b-geo) をPlatE細胞にLipofection (Roche; Fugene6) にて導入し、上

清を回収した。BNラットとクローズドコロニーのSDラットなど、多数の系統から樹立したGS細胞で検討を行った。また、遺伝子導入に用いるGS細胞数、薬剤選択の濃度やタイムコースなどを調整し、single integrationのクローンを樹立する条件を決定し、G418を用いた薬剤選択にてクローンを樹立した。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。さらに得られた遺伝子改変ヘテロラットをホモ化し、表現型を解析した。

(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：

Neomycin と Tk による二段階選択が可能なたーゲティングベクターを設計した。プロモーターには pgk を用いた。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。Occludin 遺伝子については promoterless ノックアウトベクターも作成した。エレクトロポレーションにてSDラットから樹立したGS細胞に上記のコンストラクトを導入した。neomycin 耐性能を獲得したクローンをG418添加により選択した。GS細胞の増殖効率は細胞の密度により影響を受けるため、薬剤選択の際には遺伝子導入しないGS細胞を適宜混合して増殖・薬剤選択を繰り返し、最終的に安定的に遺伝子導入されたクローンを樹立した。promoterless ノックアウトベクターについても stable clone の樹立効率を調べた。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。さらに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。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。

(6) ラット精子幹細胞精巣内移植技術の改善：

ラットの精巣内移植は、レシピエントの

Busulfanによる前処理の効率が悪い。本研究ではラットとヌードマウスをホストとして移植の効率を検討した。生後および妊娠中のSDラットにBusulfanを腹腔内注射にて投与し、約10日-12日後に精巣内にEGFPを発現するGS細胞を移植した。約3ヶ月後に精巣を摘出し、UV照射によりコロニー形成率を調べた。また一部のレシピエントについて野生型SDラット雌と自然交配を行った。

一方、マウスに関しては従来用いてきたBalb/nuで効率が不安定なため、他の系統(KSN/nu)を用い、比較検討した。

#### (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：

Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)やbasic Fibroblast growth factor (bFGF)を含む培養液にて生後10-15日齢のラット精巣細胞を培養することによりGS細胞を樹立した。血清を0.2%まで下げることで、また培地にB27を添加することにより樹立効率・増殖速度の改善が見られた。この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。Wnt family分子やBMP family分子、TGF $\beta$  family分子などには有意に効果のあるものはなかった。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)Os4(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 $2.6 \times 10^{55}$ 倍に、幹細胞数で $2.2 \times 10^{55}$ 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ことに対し、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：

GS細胞を樹立するラットの年齢を検討した。生後10-18日齢の精巣からはGS細胞の樹立ができるが、20日齢以上の精巣からは樹立できなかった。

マウスにおいてはGS細胞の樹立効率や増殖速度が系統により大きく異なることが分かっ

ている。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巣からGS細胞の樹立を行った。まずSprague-Dowley (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ができない細胞株が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からも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 mg/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)、精巣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 $1.9 \times 10^{12}$ 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上に低下していた(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、Cyclin D1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。

移植精巢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。

このマウスで開発したSerum&Feeder Free培養をラットGS細胞に応用して培地の改変を試み、増殖が亢進されるかどうか検討した。マウス同様、ラットでもSerum&Feeder Freeで培養できたが、最も増殖が良かったFGF9を加えた培地でも、Serumがある場合と同程度にしかならなかった(図25)。このためラットGS細胞のSerum&Feeder Free培養を遺伝子改変に用いるには至らなかった。

#### (4) 遺伝子トラップ遺伝子改変ラットの作成:

これまでの方法では複数遺伝子が挿入されたクローンのみが選択的に樹立されるという問題があった。そこで本研究では以下の点で改善を試みた。改善した培養条件を取り入れた他、遺伝子導入に用いるGS細胞数、薬剤選択の濃度やタイムコースなどを調整し、single integration のクローンを樹立する条件を確立した。

BNラットとクローズドコロニーのSDラットなど、多数の系統から樹立したGS細胞を用いて、Molony ウイルス由来のプロモーターラップベクター (ROSA-b-geo) を導入した。導入に先立ち、エレクトロポレーションにより neomycin と puromycin を発現するベクターをSDラットGS細胞に導入し、薬剤選択効率を比較した。薬剤耐性遺伝子はneomycin にくらべ puromycin の方が3倍程度クローン化効率が良いことが分かった。全体で44個のクローンを樹立し、一部についてはサザンブロッティングにて integration の頻度を調べ、ほぼ1~2個程度の integration であることを確認した。それらのクローンでどのような遺伝子が破壊されているかを5' -RACE法により解析した。結果、St8sial1, Hnrpc, Itg  $\alpha$  6の遺伝子破壊精子幹細胞が得られていることが判明した。

得られたクローンを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26、27、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28)。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。

遺伝子破壊ラットの作製のため、Itg  $\alpha$  6 遺伝子破壊精子幹細胞をヌードマウスの精細管内に移植、3ヶ月経過の後顕微授精により産仔を得た。PCR genotyping によりヘテロラットを同定し、ヘテロ同士の交配によりノックアウトラットの作製を試みた。生存産仔が得られなかったため妊娠中期で胎児の形態を解析したところ、発生が途中で停止し胎生致死となっていることが確認された(図29)。

#### (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

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ラット由来のノックアウトベクターを作成した。Occludin 遺伝子については

promoterless ノックアウトベクターも作成した。Neomycinと Tkによる二段階選択が可能ベクターを設計した。プロモーターにはpgkを用いた。Tkによるネガティブセレクションが理論上可能であるが、ラットGS細胞ではgancycl ovirへの反応性が良くないことが分かったため、G418のみにて選択を行った。GS細胞の増殖効率は細胞の密度により影響を受けるため、薬剤選択の際には遺伝子導入しないGS細胞を適宜混合して増殖・薬剤選択を繰り返し、最終的に安定的に遺伝子導入されたクローンを樹立した。

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30)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。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31、32)。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33)。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34)。これにより得られた円形精子細胞を卵子に直接注入し産仔作製を試みた。合計1586個の卵子に円形精子細胞を直接注入し、1207個の受精卵を作製、内1081個を偽妊娠ラット子宮に移植したが、産仔を得ることができなかった(表4)。そこで精子幹細胞クローン#502、#2054の核型解析を行ったところ、正常な核型(42 chromosomes)を有する細胞はそれぞれ12.5% 7.5%であった(図35)。遺伝子トラップによる遺伝子破壊精子幹細胞の中で産仔を得られたクローン#886では20%が正常核型であった。

#### (6) ラット精子幹細胞の精巣内移植技術の改善:

ラットの精巣内移植は、レシピエントのBusulfanによる前処理の効率が悪い。内因性の精子形成を除去するためにレシピエントに投与するBusulfanの効果が不安定であり、過度に除去すると、移植された細胞からの精子形成も抑制してしまうため、投与条件を検討する必要が

あった。

本研究ではラットをレシピエントとした移植効率の改善のため、生後でなく胎生期のラットに対し Busulfan を投与した。妊娠 SD ラットに Busulfan を投与し、生後 1-2 週齢にて精巣内移植を行った。移植後 2 ヶ月から野生型のメスと自然交配を行ったところ、一部のレシピエントから子供が得られた。しかしながら妊性を獲得するレシピエントの割合が低く、不安定な点において改善の必要がある。

一方、ヌードマウスをホストとした異種移植ではラットよりも安定したコロニー形成が見られた。Balb/nu より KSN/nu の方が成績がよいなどのホストの系統差もあることが分かった。

#### D. 考察

ラットGS細胞はマウスGS細胞にくらべ増殖が遅く、培養条件や薬剤選択・クローン化の効率が極めて低かった。そのためまずこれらの条件を詳細に検討した。これまでラットでは single integration clone の薬剤選択が困難であったが、平成 21 年度の研究では血清濃度や低酸素下での培養、ラット系統の検討、薬剤選択法の改善などにより、安定的に樹立することができるようになった。しかしながら増殖速度はマウスに比べると遅く、クローンの樹立までに 4~5 ヶ月かかることから、更なる改善が必要であった。平成 22 年度に条件検討を重ねた結果、ラットGS細胞培養株はラミネン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。またマウス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。これをもとに平成 23 年度では Fetuin と Lipid Concentrate を添加した無血清培地がラットGS細胞の増殖を維持可能であることを示した。しかし増殖の亢進は見られなかった。ラットGS細胞は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示唆された。

本研究では遺伝子トラップ法と相同組み換え法の2種類の方法での遺伝子破壊を試みた。まず遺伝子トラップ法についてトラップクローンが得られ、それをマウス精巣へ移植して円形精子細胞を顕微授精することにより、遺伝子改変ラット個体を作製することができた。この際、特定の精子幹細胞クローンで巨大胎盤が高頻度に認められたので、その原因と考えられるインプリントを解析したが、インプリント遺伝子のメチル化状態に異常は認められなかった。この遺伝子改変ラットの表現型解析と発育エピジェネティックな解析を行った結果、Itg $\alpha$ 6遺伝子破壊ラットの解析を行い、ホモの場合耐性致死であることを突き止めた。

相同組み換え法については、特定の遺伝子をねらったターゲティング法によりOcln遺伝子を欠損したラットGS細胞を作製し、ラット精巣に移植、産仔作製に使用可能な円形精子細胞を形成させることに成功した。しかしながら正常な産仔を得ることはできなかった。相同組み換えが起きたGS細胞の染色体解析の結果、正常な染色体数の細胞が少なかった。そのため薬剤選択などの際の培養の間に染色体異常が蓄積し、産仔形成能が下がった可能性がある。

#### E. 結論

平成21年度はラットGS細胞の樹立、培養などの条件検討を行いながらトラップクロンの樹立とターゲティングベクターの作成・遺伝子導入を行った。平成22年度では条件検討を継続し、さらに樹立したトラップクローンを精巣内に移植して個体化を進めた。平成23年度ではトラップクローンから得られた遺伝子改変ラット個体の解析と、相同組み換えにより得られた個体化を目指した。

これらの結果、まずラット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。そして遺伝子トラップ法により遺伝子破壊ラットを作成することができた。相同組み換え法により遺伝子改変GS細胞が得られ、精巣への移植により円形精子細胞を得ることができた。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、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、また相同組換えにより得られたクロンの産仔形成能

が下がっていることなど改善すべき課題が明らかになった。

#### 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

Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Takehashi M, Morimoto H, Shinohara T. Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier. *Cell Stem Cell*. 2011; 9(5):463-75

Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Ishii K, Shinohara T. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One*. 2011; 6(8):e23663

Kanatsu-Shinohara M, Kato-Itoh M, Ikawa M, Takehashi M, Sanbo M, Morioka Y, Tanaka T, Morimoto H, Hirabayashi M, Shinohara T. Homologous recombination in rat germline stem cells. *Biol. Reprod*. 2011; 85(1):208-17

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

Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Shinohara T. Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(14): 6210-5 (2010)

Morimoto H., Kanatsu-Shionohara M., Takashima S., Chuma S., Nakatsuji N., Shinohara T. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One*. 2009 Nov 19;4(11):e7909

Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Takashima S., Ogura A., Shinohara T. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *J.Reprod.Dev.* 56(1):145-153 (2009)

Yoshimoto M., Heike T., Chang H., Kanatsu-Shinohara M., Baba S., Varnau J.T., Shinohara T., Yoder M.C., Nakahata T. Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp.Hematol.* 37(12):1400-10 (2009)

## 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  
11<sup>th</sup> 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

平成 21 年 9 月 1-3 日  
特定領域「細胞増殖制御」班会議  
篠原美都「精子幹細胞の細胞周期の調節機構の解明」  
ホテルアンビエント安曇野

平成 21 年 9 月 15-16 日  
特定領域「細胞外環境」班会議  
篠原美都「精子幹細胞の癌化における細胞外環境の関わり」  
京都国際会議場

平成 21 年 10 月 13-14 日  
新学術領域研究 「配偶子制御」第 2 回領域会議  
篠原美都「精子幹細胞の自己複製制御機構」  
総合研究大学

平成 21 年 12 月 18-19 日  
特定領域 「統合脳」班会議  
篠原美都「精子幹細胞を用いた神経疾患モデルラット作成技術の開発」  
東京・学士会館

## 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
Takashima S, <u>Kanatsu-Shinohara M</u> , <u>Tanaka T</u> , Takehashi M, Morimoto H, Shinohara T.	Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germ line niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier.	<i>Cell Stem Cell.</i>	9(5)	463-75	2011
<u>Kanatsu-Shinohara M</u> , Takashima S, Ishii K, Shinohara T.	Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis.	<i>PLoS One.</i>	6(8)	e23663	2011
<u>Kanatsu-Shinohara M</u> , Kato-Ito H M, Ikawa M, Takehashi M, Sanbo M, Morioaka Y, <u>Tanaka T</u> , Morimoto H, Hirabayashi M, Shinohara T.	Homologous recombination in rat germline stem cells.	<i>Biol. Reprod.</i>	85(1)	208-17	2011
Shinohara T, Ishii K, <u>Kanatsu-Shinohara M</u> .	Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	57(2)	288-95	2011
<u>Kanatsu-Shinohara M</u> , 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 germ line stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	400(1)	27-33	2010
Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Shinohara T.	Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	107(14)	6210-5	2010
Morimoto H., Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Chuma S., Nakatsuji N., Shinohara T.	Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells.	<i>PLoS One.</i>	4(11)	e7909	2009
Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Takashima S., Ogura A., Shinohara T.	Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal.	<i>J.Reprod.Dev.</i>	56(1)	145-153	2010
Yoshimoto M., Heike T., Chang H., Kanatsu-Shinohara M., Baba S., Varnau J.T., Shinohara T., Yoder M.C., Nakahata T.	Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germ line stem cells derived from neonatal mouse testis.	<i>Exp.Hematol.</i>	37(12)	1400-10	2009

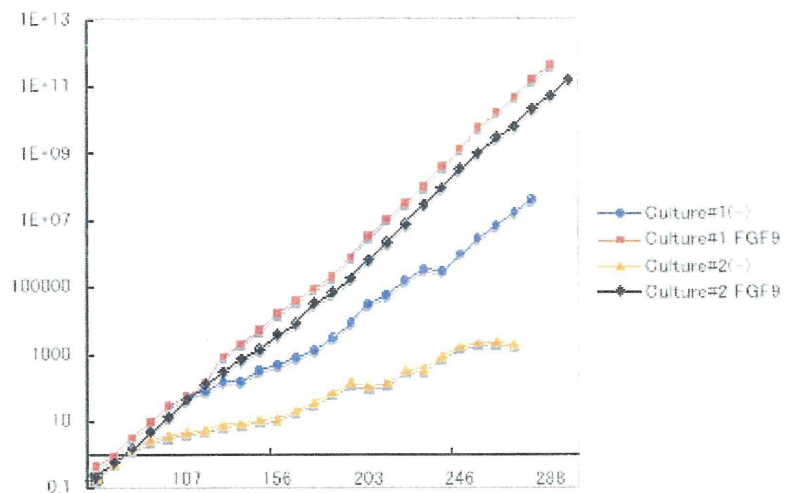


図1：GS細胞の長期培養におけるFGF 9の作用  
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートにて長期培養を行い、細胞の増殖曲線をしめした。FGF 9の添加によりGS細胞の増殖が亢進した。

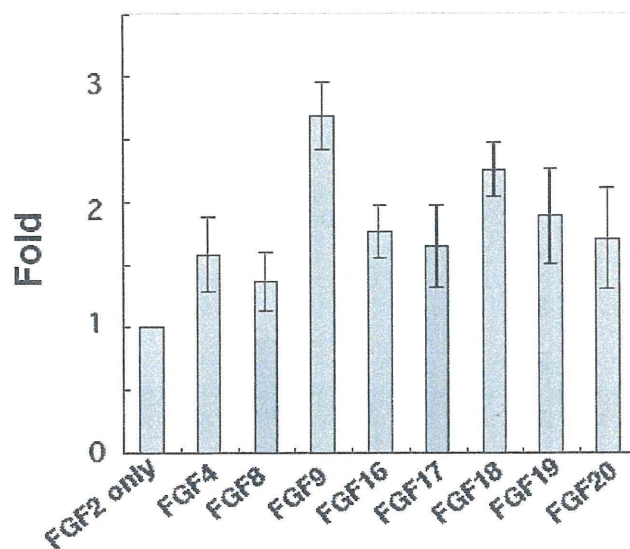


図2：FGFファミリー分子のラットGS細胞増殖への効果  
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、7日後の増幅率を示した。FGF 9が最も増殖促進効果が高く、次いでFGF18も効果が認められた。

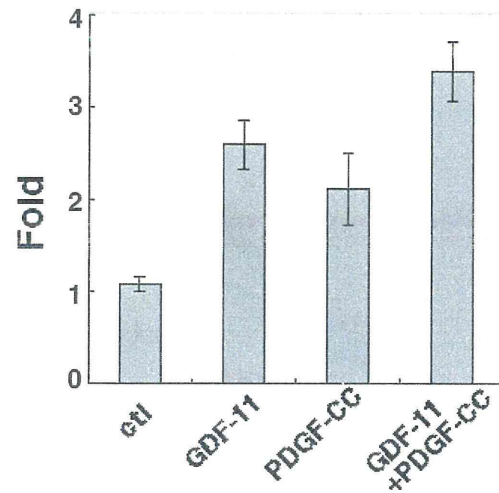


図3：GS細胞増殖におけるGDF-11とPDGF-CCの効果  
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、7日後の増幅率を示した。GDF-11とPDGF-CCは増殖促進効果が認められ、さらに相乗効果があった。

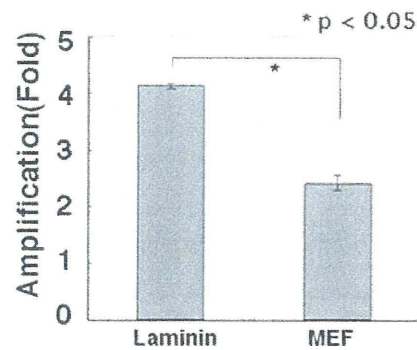


図4：ラミニンによるフィーダーフリー培養とMEFとの共培養  
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、7日後の増幅率を示した。MEFとの共培養はフィーダーフリー培養に比し、増殖率が低い。



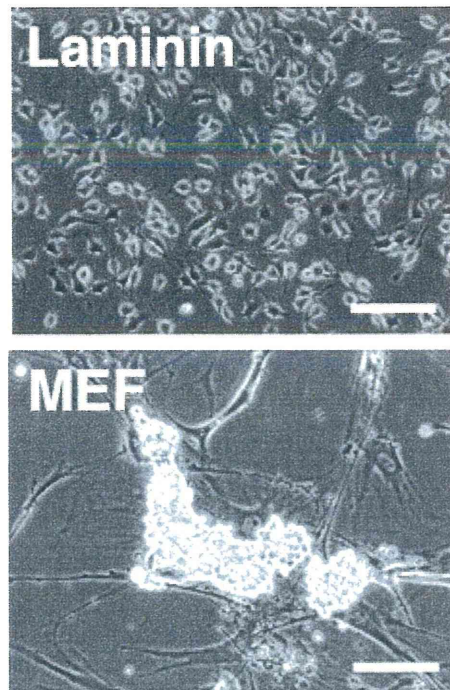


図5：ラミニンによるフィーダーフリー培養とMEFとの共培養  
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、6日後のコロニー形成。(上)ラミニンによるフィーダーフリー培養：GS細胞は平面的なコロニーを形成する、(下)MEFとの共培養：立体的なコロニー形成をする。Bar=100  $\mu$ m

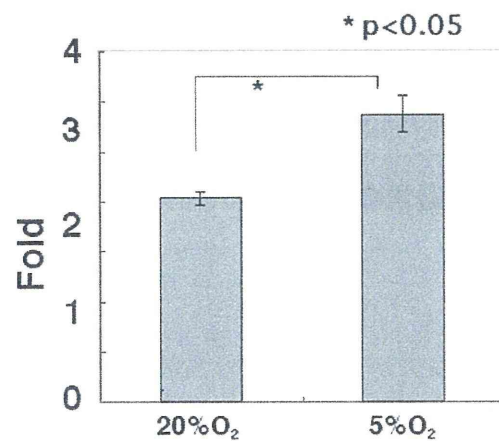


図6：低酸素条件での培養におけるGS細胞の増殖の亢進  
SDラットから樹立したGS細胞をラミニンコートしたプレートに播種し、6日後の増幅率を示した。通常の酸素濃度における培養の約1.41倍の増幅率が得られた。

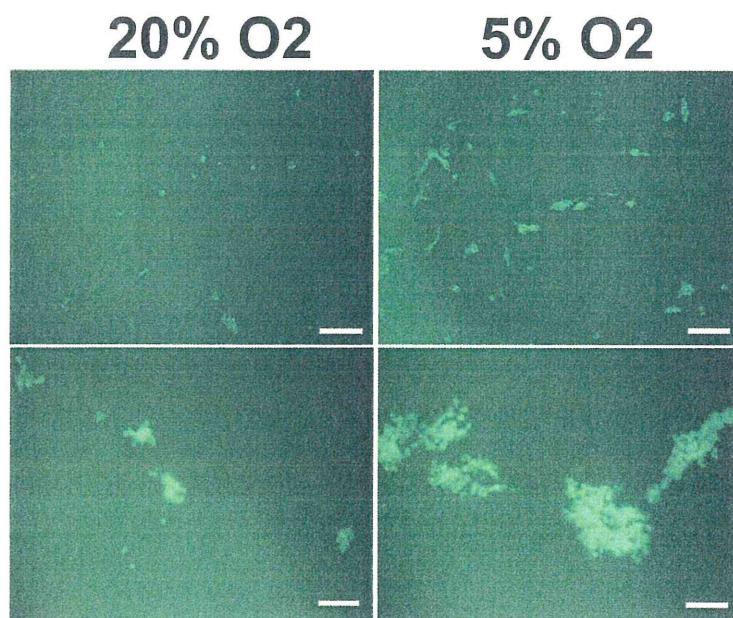


図7：低酸素条件にてG418による薬剤選択  
EGFPを発現するGS細胞にneo耐性遺伝子を導入した細胞株について、MEFとの共培養のもと、40  $\mu\text{g/ml}$  G418にて11日間薬剤選択を行った後のコロニー形成。低酸素条件におけるコロニーは通常の酸素濃度のものより大きい。

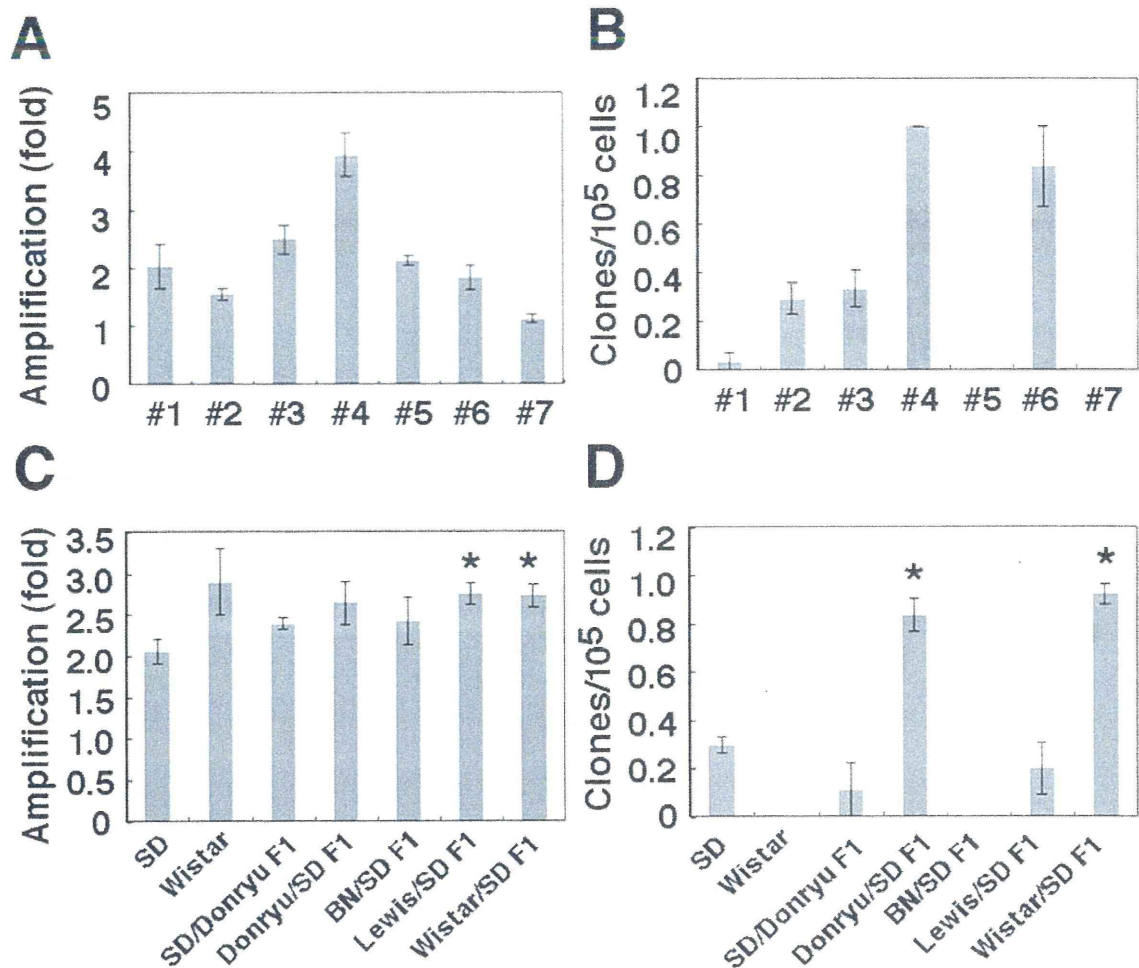


図8：GS細胞株におけるクローン間の差異と系統差

(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、ラミネ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 10<sup>5</sup>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、ラミネ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 10<sup>5</sup>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)



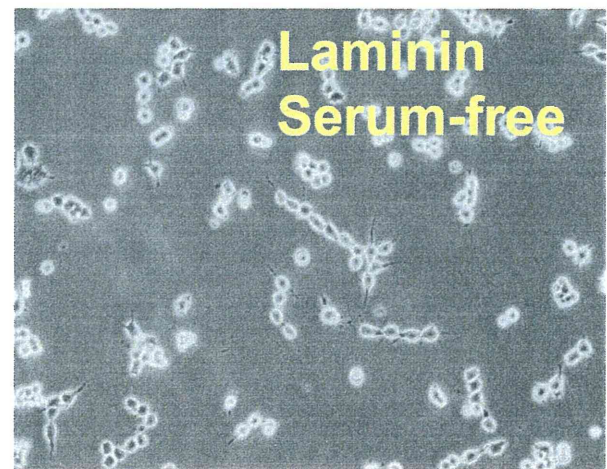
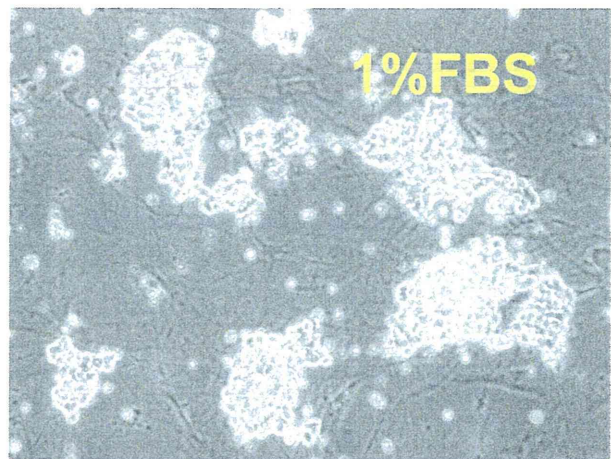
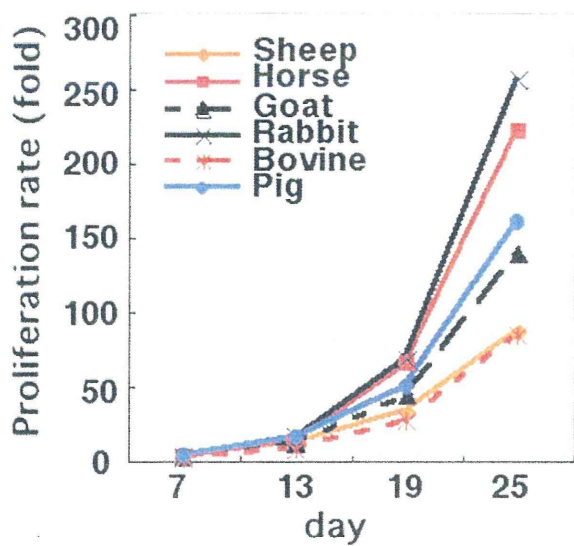


図9：血清の種類による増殖への影響。  
マウスGS細胞にて各種血清の増殖に及ぼす効果を調べた。

図10：従来のSerum & Feeder-free培養におけるGS細胞の増殖低下。