

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。

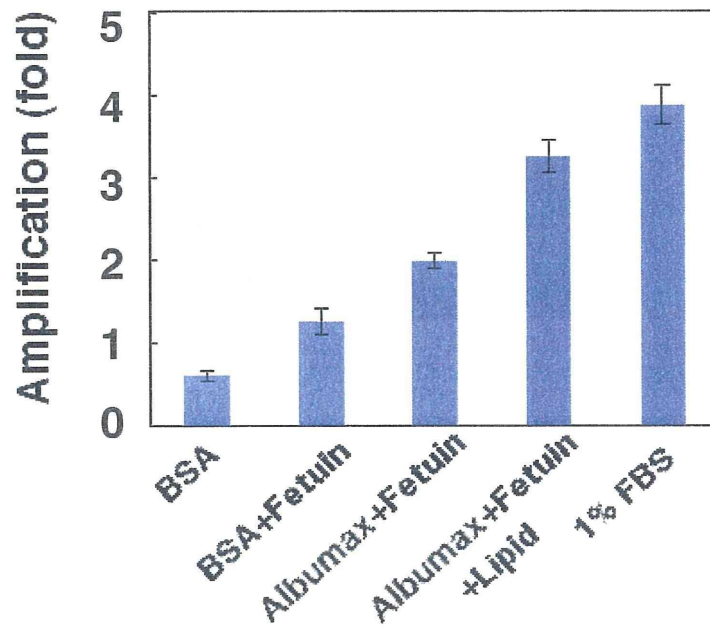


図1 2 : 脂質によるGS細胞の増殖活性の亢進。
 マウスGS細胞をラミニンコートプレートに播種し、無血清培地にFetuinおよび脂質を添加し、効果を調べたもの。6日間の培養後、細胞の増幅率を示した。

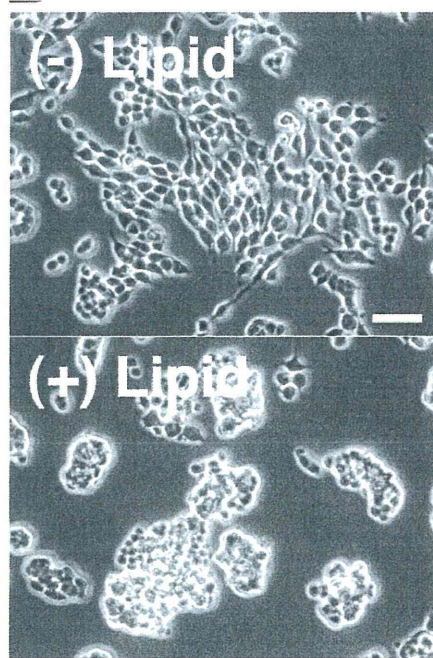


図 1 3 : 脂質の添加によるGS細胞コロニーの形態の変化。
ラミネンコートプレートにGS細胞を播種した。脂質の添加により平面的な形態から、
立体的なコロニーへと変化した。

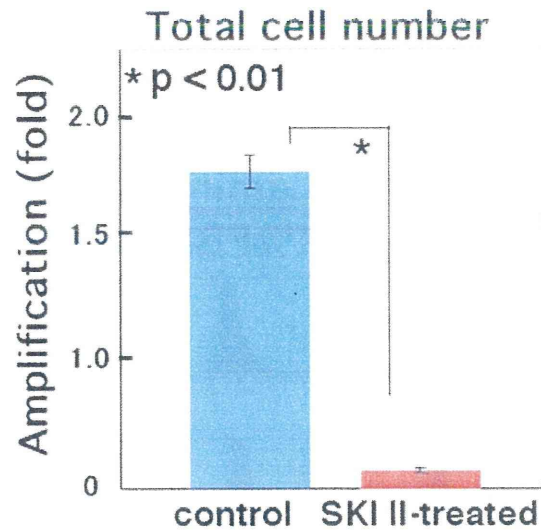


図1 4 : Sphingosine kinase 阻害剤によるGS細胞の増殖阻害。
 マウスGS細胞をSphingosine kinase 阻害剤 II の存在下で培養し、5日後の細胞の増幅率を示したもの。

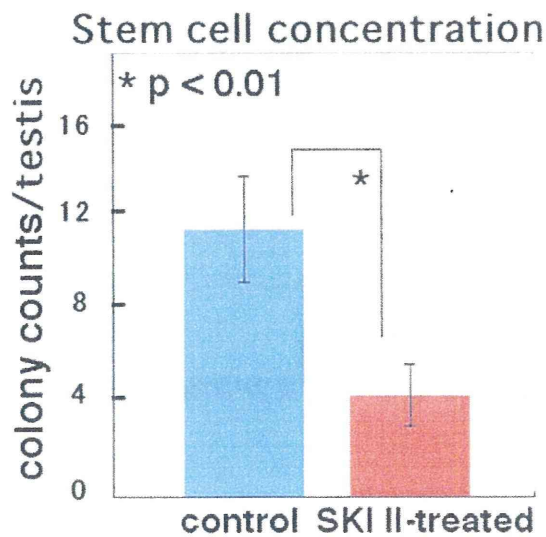


図1 5 : Sphingosine kinase 阻害剤によるGS細胞の幹細胞活性の低下。
 マウスGS細胞をSphingosine kinase 阻害剤 II の存在下で培養し、5日後に細胞を回収し、精巣内移植により幹細胞活性を測定した。

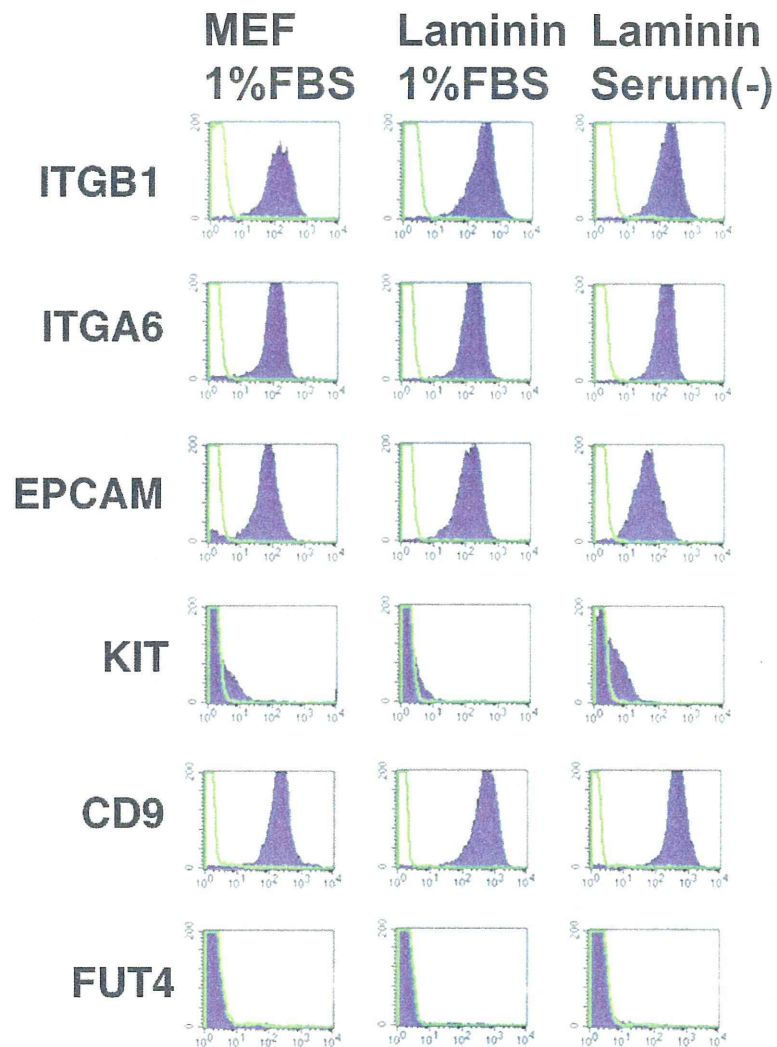


図16：フローサイトメトリーによるSerum&Feeder-free条件における精子幹細胞培養のマーカーの発現。

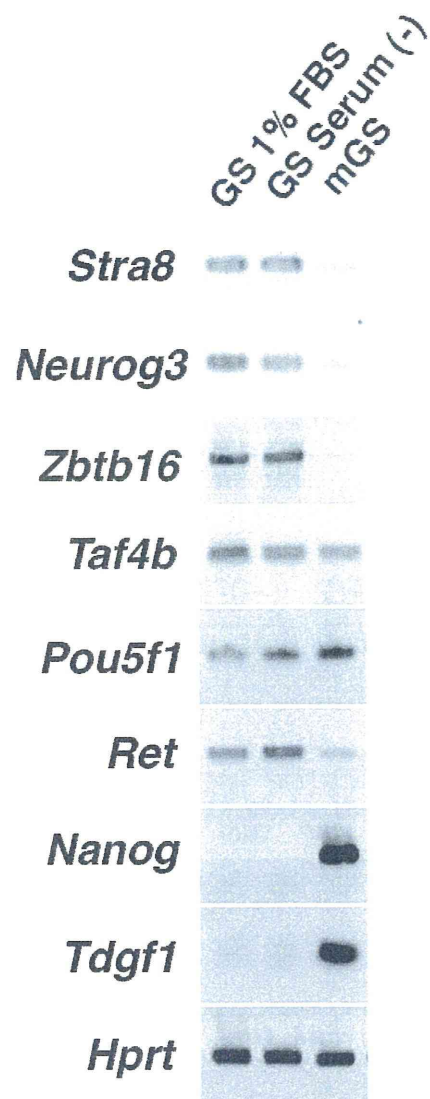


図 1 7 : RT-PCRによるSerum&Feeder-free条件における精子幹細胞培養のマーカーの発現。

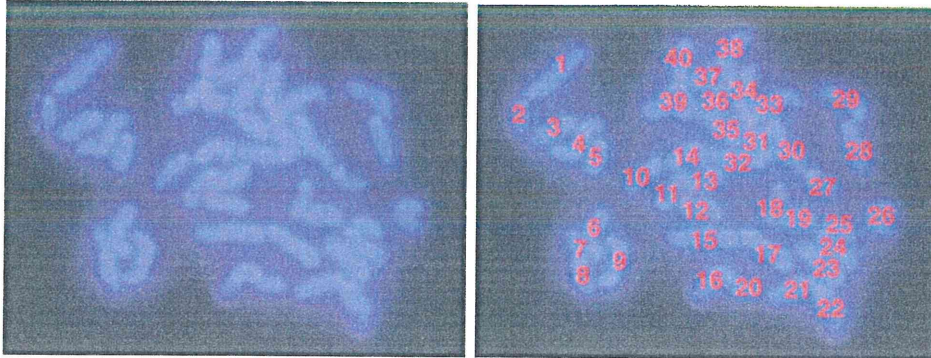


図18：Serum&Feeder-free条件にて長期培養した精子幹細胞の核型解析。40本の染色体があることを示す。

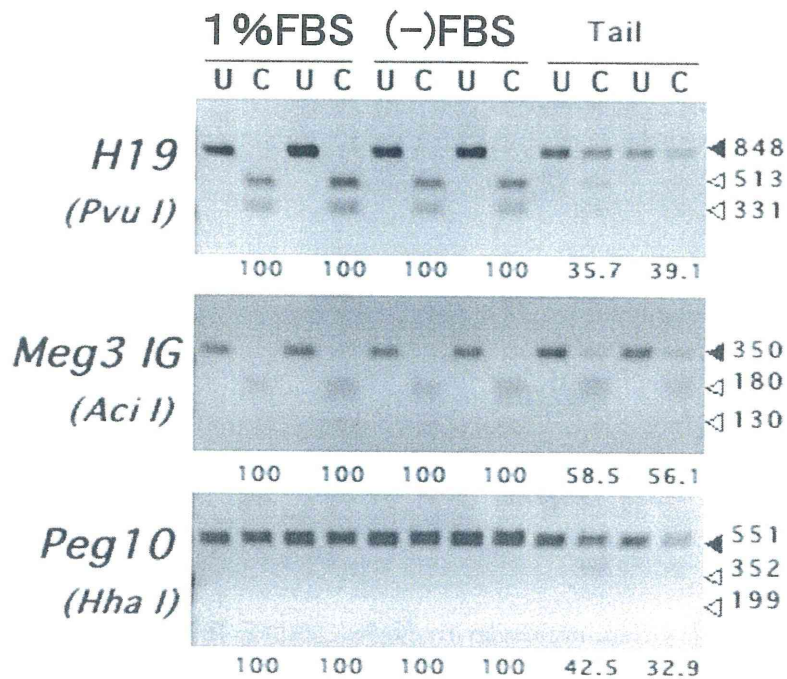


図19：Serum&Feeder-free条件にて長期培養した精子幹細胞のゲノムインプリンティング。COBRA法による。インプリンティング遺伝子DMRのメチル化。数値はメチル化のレベル(%)を示す。U: uncut (切断なし), C: cut (切断あり)。コントロール：マウス尻尾DNA。

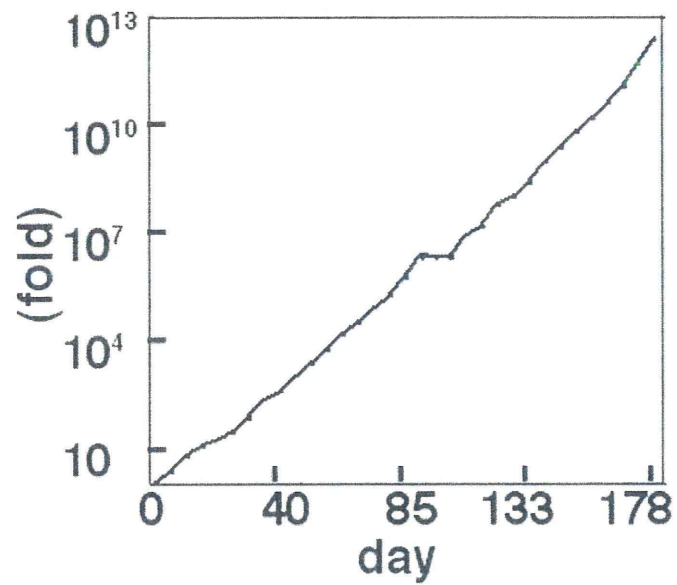


図 2 0 : Serum&Feeder-free培養における増殖曲線。
1 7 8 日間の培養にて1.9 x 10¹² 倍に増幅した。Bar=50 μm

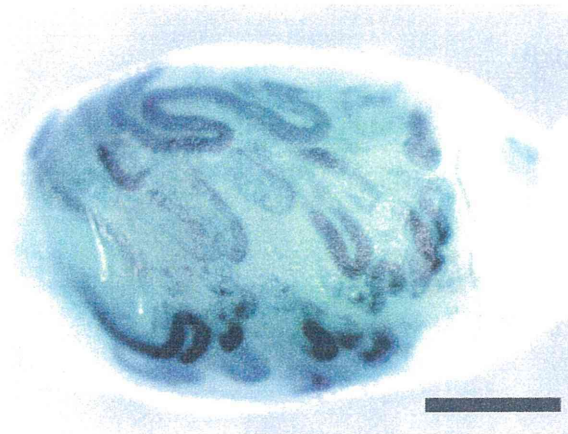


図 2 1 : Serum&Feeder-free培養後の細胞の精巢内移植によるコロニー形成像。
LacZ染色によりドナー細胞が染色されたもの。

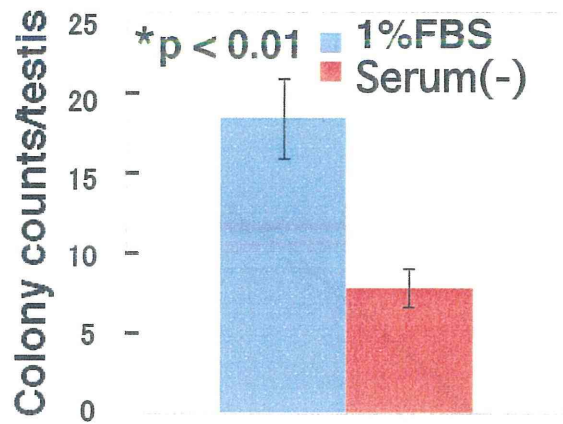


図 2 2 : Serum&Feeder-free条件にて長期培養した精子幹細胞の幹細胞活性の低下。
 8×10^3 個細胞を精巢内移植し、形成されたコロニー数を示した。

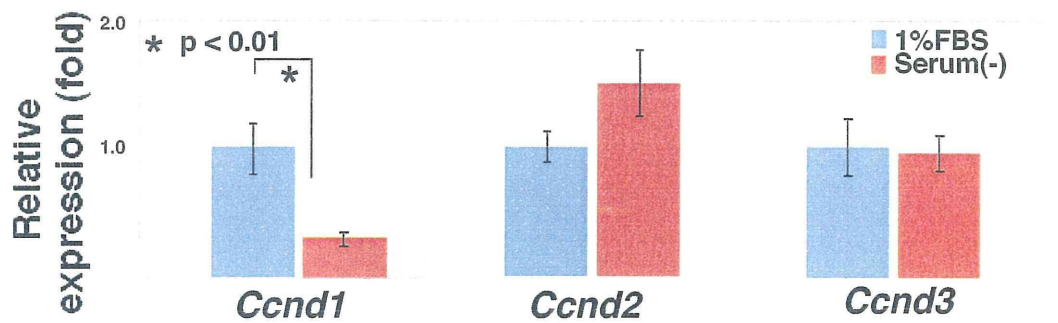
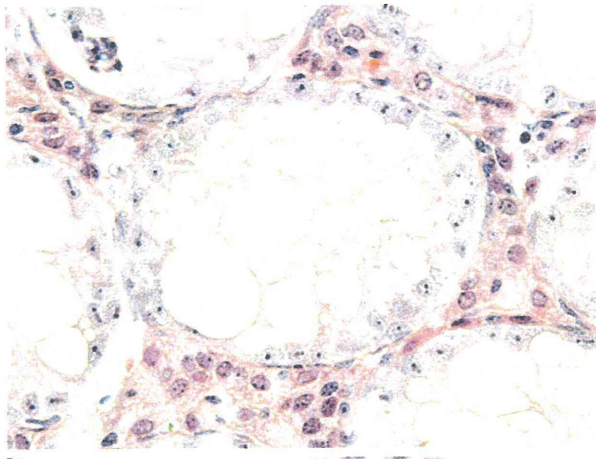


図 2 3 : Serum&Feeder-free条件にて長期培養した精子幹細胞のG1サイクリンの発現。
 Real-time PCR法による。縦軸はHprt遺伝子の発現との相対比を表す。

W



Serum(-) GS

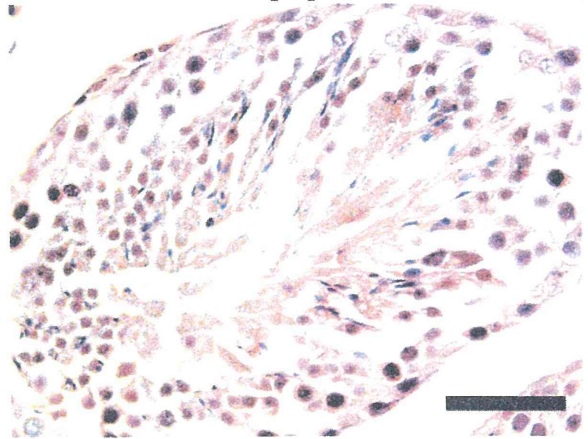


図 2 4 : Serum&Feeder-free培養細胞の精巣内移植による精子形成と産仔の作成。
内因性の精子形成の欠損したWマウス精巣に移植した。矢印：精子。

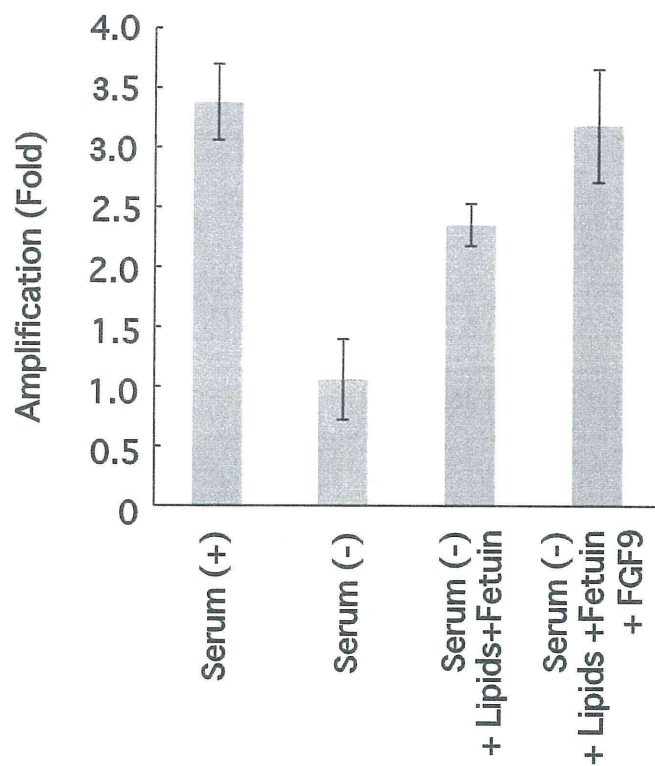


図25: ラットGS細胞のSerum & Feeder Free培養
ラットGS細胞はラミニン上において、Lipids, Fetuin, FGF9を加えた
Serum Free培地でSerum添加培地と同様に増殖する。

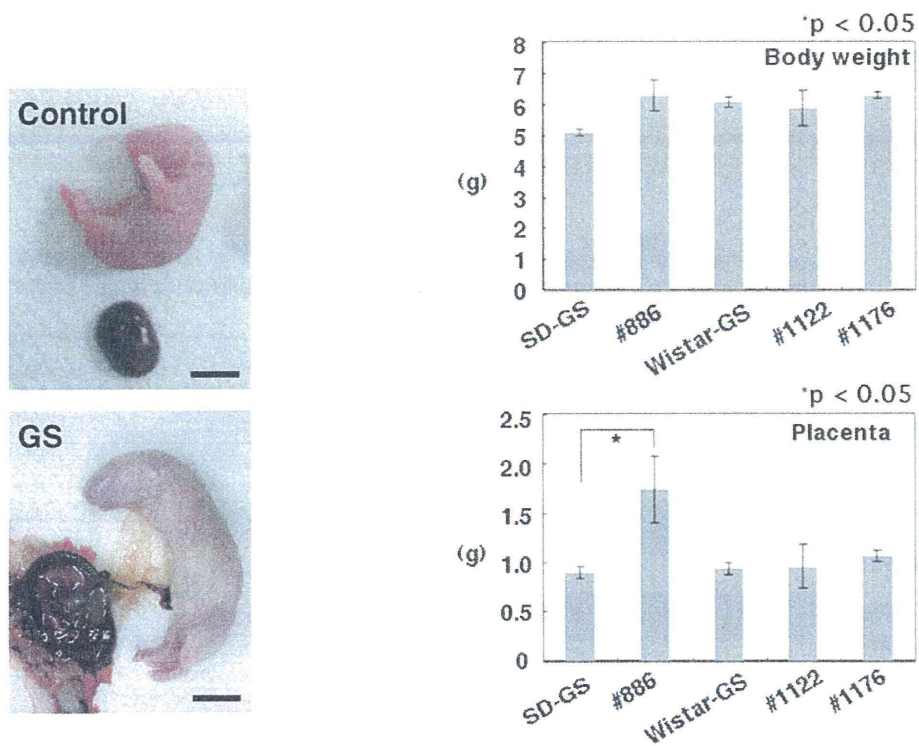


図 26 : GS細胞クローン由来の産仔における巨大胎盤

(上) SDラット由来round spermatidにて顕微授精を行った産仔とその胎盤。(下) トランプクローン由来round spermatidにて顕微授精を行った産仔とその胎盤。コントロールに比し胎盤が大きい。Bar=1cm

図 27 : GS細胞クローン由来の産仔における巨大胎盤

(上) GS細胞クローンをヌードマウス精巣に移植して形成されたround spermatidを用いて顕微授精を行い、産まれた仔の体重。(下) 胎盤重量。クローン#886由来の胎盤はコントロールに比し、有意に重い ($p < 0.05$)。コントロール: SDおよびWistarラット由来round spermatidにて顕微授精を行ったもの。

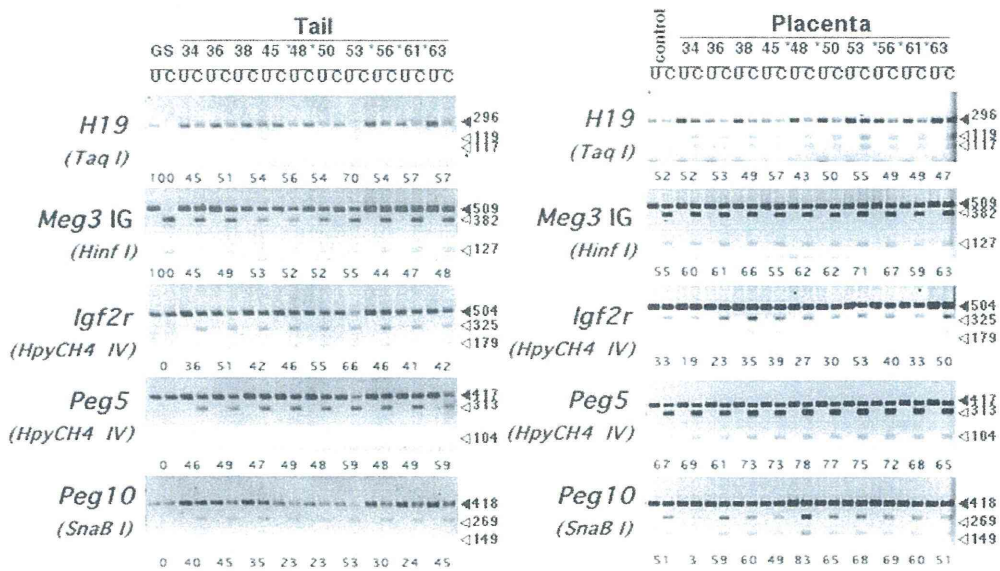


図 28 : 巨大胎盤を伴う産仔とその胎盤におけるゲノムインプリンティング
 (左) GS細胞クローン#886をヌードマウス精巢に移植して形成されたround spermatidを用いて顕微授精を行い、産まれた仔の尻尾DNAにてCombined bisulfite restriction analysis によりインプリンティング遺伝子のDMRにおけるメチル化を調べたもの。(右) 胎盤におけるインプリンティング遺伝子DMRのメチル化。数値はメチル化のレベル (%) を示す。U: uncut (切断なし), C: cut (切断あり)

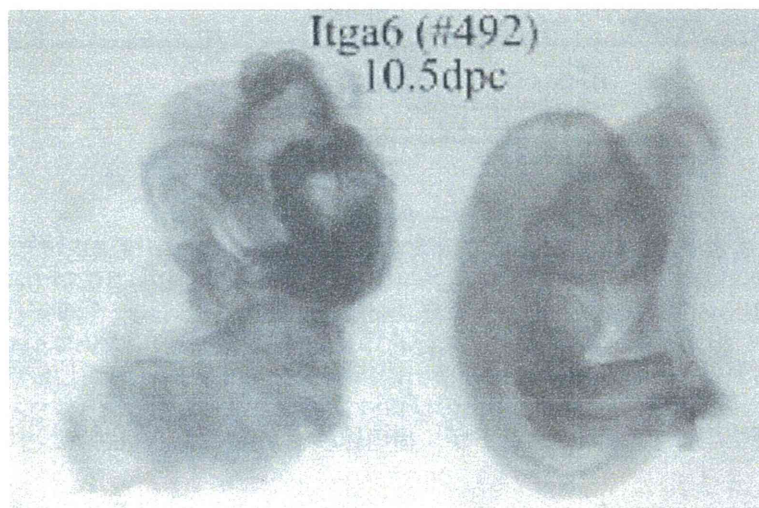


図29: 遺伝子トラップ法によるItga6 KO Rat
右の野生型胎仔は正常に発生しているが、左のItga6 ホモ個体は胎性致死となっている。

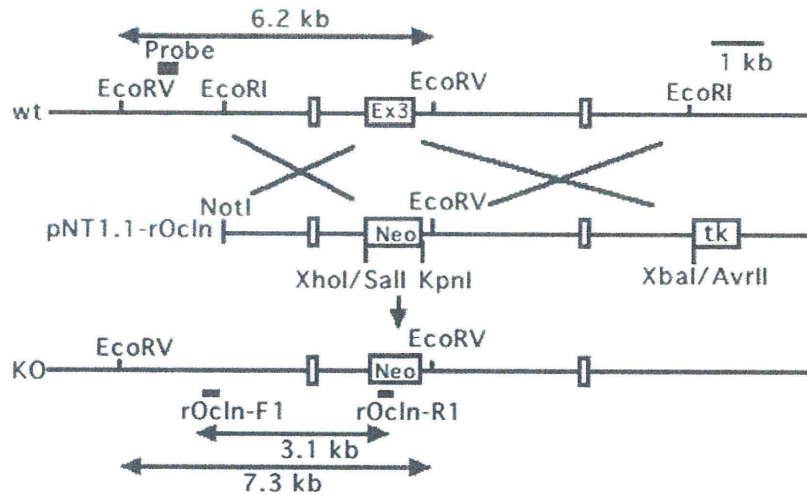


図 30 : ターゲティングベクターの設計

Occludin遺伝子のexon 3をneoにて置換することにより遺伝子破壊を行う。neo と thymidine kinase 遺伝子を含有するpNT1.1 ベクターにOccludin 遺伝子のexon3上流のNotI-XhoI断片 (2.8-kb) と下流 KpnI-XbaI断片 (6.5-kb) を挿入した。プライマー (rOcln-F1, rOcln-R1) によるPCRにて相同組み換え体では3.1kbのバンドが検出される。相同組み換え体の検出にはサザンブロッティングにはゲノムDNAをEcoRVにて切断し、Intron1領域のプロープによりハイブリダイゼーションを行った。野生型にて6.2 kbのバンドが、相同組み換え体では7.3 kbのバンドが検出される。

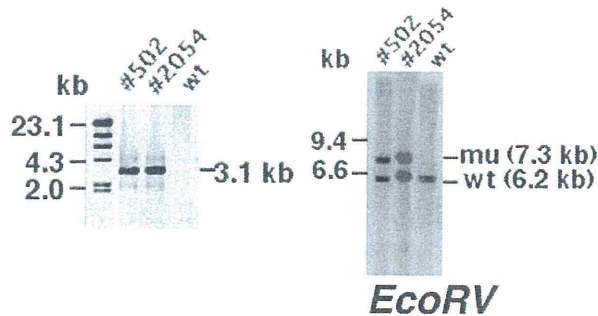


図 31 : PCR法による相同組み換え体の検出

図 32 : サザンブロッティング法による相同組み換え体の検出

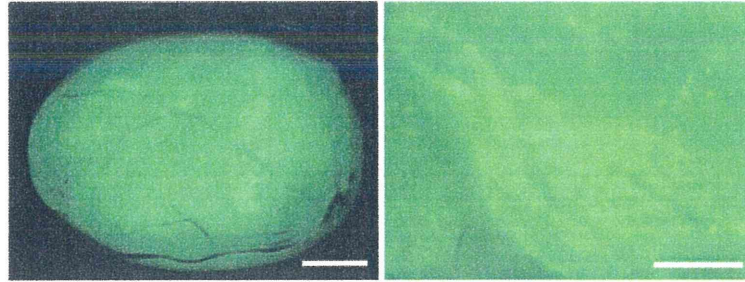


図 33 : 相同組み換えクローンの精巣内移植によるコロニー形成
クローン#2054-GS細胞をヌードマウス精巣に移植後3ヶ月におけるコロニー形成を示した。ドナーマーカーのEGFPを発現している。Bar=1 mm (左)、200 μm (右)

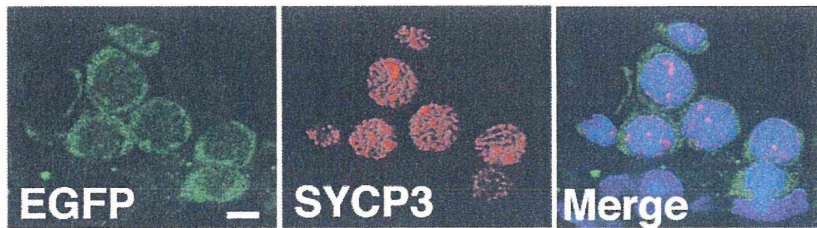


図 34 : 相同組み換えクローンの精巣内移植による減数分裂像
クローン#2054-GS細胞をヌードマウス精巣に移植後3ヶ月におけるコロニーのSYCP3発現。抗SYCP3抗体にて免疫組織染色を行った。Hoechst 33258により核染色(青)、ドナーマーカーのEGFP(緑)、SYCP3(赤)。Bar=1 mm (左)、200 μm (右)

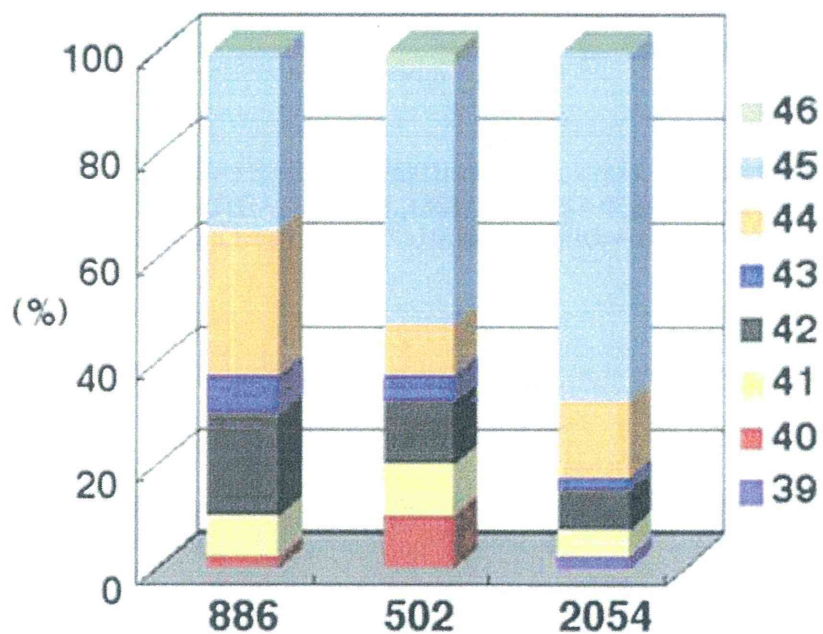


図35: 遺伝子トラップおよび相同組換えクローンの染色体数
 遺伝子トラップクローン#886および相同組換えを起こしたラットGS細胞クローン
 #502, 2054の染色体数を調べた。ラット細胞の正常な染色体数は42本である。
 #886では20%、#502, #2054では12.5%, 7.5%の細胞が正常な染色体数
 であった。

表1 ラット精子幹細胞長期培養における増殖

培養	培養日数 ^a (継代数)	コロニー/10 ⁵ GS細胞 (レシピエント数)	細胞の増殖率 (倍) ^b	幹細胞の数の増加 (倍) ^c
#1	100 (8)	251.4 ± 13.1 (4)	-	-
	172 (16)	70.6 ± 15.7 (4)	1.7 × 10 ³	466.2
	351 (37)	493.3 ± 149.6 (6)	3.4 × 10 ¹³	6.7 × 10 ¹³
	443 (48) ^d	310.0 ± 63.4 (6)	5.2 × 10 ¹⁸	6.4 × 10 ¹⁸
	922 (114)	210.0 ± 58.6 (3)	2.6 × 10 ⁵⁵	2.2 × 10 ⁵⁵
#2	116 (10) ^d	137.3 ± 20.3 (4)	-	-
	338 (35)	332.5 ± 33.8 (8)	2.5 × 10 ¹¹	6.1 × 10 ¹¹

数値は平均 ± 標準誤差で示した。4.0-8.0 × 10⁴ 個のGS細胞を精細管内に移植した。

^a 培養開始からの日数を示した。

^{b,c} 培養開始からの総細胞数または幹細胞数の増加率を示した。

^d 顕微授精により産仔を作成した。

表2 顕微授精による産仔の作成

クローン	ホスト卵の系統	卵子の数(%)				No.(%)	
		Injected	Survived	Cleaved	Transferred	Implantations	Pups born
886	SD	1482	1184 (80)	176 (15)	1089	75 (7)	18 (2)
1122	SD	154	115 (75)	4 (3)	100	61 (61)	33 (33)
1176	SD	587	401 (68)	103 (26)	334	154 (46)	64 (19)
Total		2223	1700 (76)	283 (17)	1523	290 (19)	115 (8)

表 3 遺伝子改変したラット GS 細胞由来の産仔における体重と胎盤重量

クローン	系統	ID	性別	Dead/Alive	体重 (g)	胎盤重量 (g)	クローン	系統	ID	性別	Dead/Alive	体重 (g)	胎盤重量 (g)		
886	SD	34	♂	Alive	5.51	1.85	1176	Wistar	306	♂	Alive	7.4	0.81		
		36 ^a	♂	Alive	6.84	0.71			308	♂	Alive	7.2	1.15		
		38	♂	Alive	7.64	0.79			310	♂	Alive	6.9	0.72		
		40	♀	Dead	6.75	0.74			312	♂	Alive	4.4	1.57		
		42	♀	Dead	ND	ND			314	♂	Alive	7.0	0.60		
		43	♀	Dead	5.80	0.69			316	♀	Dead	6.3	1.00		
		45	♀	Alive	6.84	1.32			319	♀	Alive	7.0	0.88		
		48 ^a	♂	Alive	8.40	2.31			321	♂	Alive	5.4	0.83		
		50	♀	Dead	4.84	4.66			323	♂	Alive	7.8	1.3		
		52	♀	Dead	ND	ND			325	♀	Alive	7.21	1.92		
		53	♀	Dead	7.24	0.94			327	♀	Alive	6.47	0.95		
		55	♀	Dead	ND	ND			327	♀	Alive	6.71	1.12		
		56	♂	Alive	8.51	2.35			331	♂	Alive	7.43	0.88		
		61	ND	Dead	4.42	2.07			333	♂	Alive	7.39	0.70		
		63	♀	Alive	7.91	2.4			335	♂	Alive	7.33	0.81		
												337	♂	Alive	7.04
								339	♂	Alive	6.94	0.68			
		Total		n=12	6.73±0.39 ^b	1.74±0.33 ^b			341	♀	Alive	7.6	1.10		
1122	Wistar	282	♂	Alive	6.81	0.89	343	♀	Alive	7.2	1.88				
		284	♀	Alive	6.60	0.88	345	♂	Alive	7.0	0.74				
		286	♂	Alive	6.62	0.50	347	♂	Alive	7.3	0.78				
		288	♂	Alive	6.47	0.55	349	♂	Alive	6.8	0.68				
		290	♂	-	ND	3.29	351	♀	Alive	7.4	0.81				
		291	♀	Dead	5.48	0.63	364	♀	Alive	6.6	1.35				
		293	♀	Alive	ND	1.01	366	♂	Alive	7.2	0.85				
		295	♂	Alive	ND	0.58	368	♂	Alive	7.3	1.52				
		297	♀	Alive	ND	0.83	370	♂	Alive	7.4	0.76				
		299	♀	Alive	ND	0.76	372	♂	Alive	7.1	1.40				
		301	♂	Alive	ND	0.44	374	♀	Alive	6.7	1.46				
		303	♂	Dead	3.07	1.06	376	♀	Alive	6.3	1.28				
										378	ND	Alive	ND	1.40	
										379	♂	Alive	8.0	1.27	
				Total		n=12	5.84±0.59 ^b	0.95±0.22 ^b			381	♀	Alive	6.3	1.30
											383	♀	Alive	6.5	1.07
								Total		n=34	6.90±0.13 ^b	1.02±0.06 ^b			

^a#36 と #48 の産仔はそれぞれ 10 匹と 9 匹の産仔を作成した。

^b数値は平均 ± 標準誤差を表す。

表 4 : Occludin 遺伝子破壊ラット精子幹細胞由来円形精子細胞の顕微授精による産仔の作成

Clone	Host oocyte strain	No. of oocytes (%)			No. (%)	
		Injected	Survived	Transferred	Implantations	Pups born
502	SD	900	688 (76)	572	22 (4)	0 (0)
2054	SD	276	211 (76)	210	6 (3)	0 (0)
2054	Wistar	221	170 (77)	162	9 (6)	0 (0)
2054	Wistar Hannover	171	138 (81)	137	6 (4)	0 (0)
Total		1568	1207 (77)	1081	43 (4)	0 (0)