

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05938

研究課題名(和文)異種の生殖器官および生殖細胞をマウスで再生する技術の開発

研究課題名(英文) Generation interspecies germ cell and reproductive organ in the mice by nobel experimental system

研究代表者

山城 秀昭 (Yamashiro, Hideaki)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：60612710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CRISPR/Cas9およびジーンターゲティング法を用いて、生殖細胞欠損KOマウスを作製する実験を実施した。その主な結果、(1)生殖細胞の形成に不可欠であるNanos3をKOしたマウスを作製し、精巣の精細管内には精細胞が形成されず、卵巣内にも卵胞、卵母細胞が形成されないことを明らかにした。(2)GATA4flox/floxマウスとGATA4flox/+;Vasa-Creマウスの交配で得たヘテロKOマウスでは、生殖機能は維持されていたが、野生型と比較すると産子数の著しい減少が認められた。以上、本研究の成果は、異種間で生殖巣や生殖細胞を再生する技術開発の基盤となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、異種胚盤胞補完法を用いて脾臓、心臓、肺、眼球など様々な臓器を再生する研究が国内外で実施され始めている。本研究は、異種胚盤胞補完法、ゲノム編集技術および多能性幹細胞技術を融合して、異種の生殖器官および生殖細胞をマウス個体で再生という、全く新たな方法で動物生産のあり方に挑戦し、新たな競争力の源泉を生み出す先導的な研究である。さらに、異種の生殖器官を再生する機能をもち、異種臓器を提供可能な動物の生産という、生殖補助医療や再生医療研究領域に対しても発展が期待される基盤研究に位置づけられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was that the finally generating cattle and rat germ cell in the mouse by the Cas9 knockout and/or gene targeting method combined with interspecies blastocyst complementation. In this experiment, we found that (1) The Nanos gene family is required for germ cell development in diverse organisms. We successfully generated Nanos3 knockout mouse, results in the complete loss of germ cells in both testis and ovary. (2) GATA4 gene encodes a member of the GATA family of zinc-finger transcription factors. Hetero knockout mouse produced by crossing GATA4flox/flox mouse with GATA4flox/+;Vasa-Cre mouse. This hetero knockout mouse was maintained reproductive function, but showed a marked decreased in the number of litters compared to the wild type. In future, these results could be useful for the generation of not only animal but also human germ cells and organs into chimeric animals produced by xenogeneic Blastocyst complementation.

研究分野：動物生産科学関連

キーワード：ゲノム編集 ノックアウトマウス 生殖巣 生殖細胞 ES細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今再生医療は、臓器置換再生医療の開発・実用化が期待されているが、複雑な構造と複数種類の細胞に固有の機能を持たせる必要があり、機能を有した臓器や器官を体外で再生する技術は開発されていない。

胚盤胞補完法とは、特定の細胞を作る能力を欠損させた胚盤胞に多能性幹細胞をマイクロインジェクションすると、キメラ胚となり、そのような胚から作製された個体では、欠損した細胞が完全に注入された多能性幹細胞由来のものに置き換えられる方法である。

この方法については、リンパ球を欠損したマウスを用いて胚盤胞補完の作用機序が報告された(Chen et al., PNAS, 1993)。その後、東京大学の中内らの研究グループは、すい臓の形成に關与する *Pdx1* 遺伝子を欠損するマウスの胚盤胞に、ラットの iPS 細胞を注入することによって、マウスの生体内でラットのすい臓を作ることを報告した (Kobayashi et al., Cell, 2010)。この報告により、すい臓のような実質性臓器の生産にも胚盤胞補完法は応用が可能であること、マウス、ラットという異種動物間にも胚盤胞補完原理が適用できることが示された。

産業動物においては、2013 年、遺伝子導入と体細胞クローニングの技術を用いてすい臓欠損ブタ胎子の細胞をもとに作製した胚に、健全なブタ胚の細胞を注入した場合、胚盤胞補完され、正常ブタ由来のすい臓を持つブタが誕生したと報告された(Matsunari et al., PNAS, 2013)。JA 全農の池田らのグループは、黒毛和牛の *Nanos3* 遺伝子を欠損した体細胞クローン胚に同種のホルスタインの受精卵割球を注入してキメラ受精卵を作製し、胎子からではあるが黒毛和牛の卵巣内にホルスタイン種の卵子を作製したと報告した(Ikeda et al., Sci Rep, 2016)。加えて、2018 年には、ウシ ES 細胞の樹立が報告された(Bogliotti et al., PNAS)。

これらの報告から、異種胚盤胞補完法、遺伝子改変技術および多能性幹細胞技術を融合することにより、家畜個体から切り離され、かつ動物種の壁を越え、性成熟まで 2 ヶ月の小型実験動物のマウスから異種のウシ生殖巣や受精能を有する生殖細胞を作製することが可能になるのではという仮説を立てた。尚、受精可能な大型産業動物の生殖細胞を異種の小型実験動物のマウス生体内で作製するという戦略での技術開発は未だない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス生体内で、異種の生殖器官および生殖細胞を再生する技術を開発することである。このために、胚盤胞補完技術を利用するが、CRISPR/Cas9 システムおよびジーンターゲット法を用いて、生殖器官あるいは生殖細胞形成欠損ノックアウトマウスの胚盤胞にラットおよびウシ ES 細胞を注入する方法を組み合わせ、マウス個体に補完的に再生された異種 ES 細胞由来の生殖器官あるいは生殖細胞を構成するマウスを作出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CRISPR 遺伝子編集系を電気穿孔法で受精卵に導入して作製した *Nanos3* ノックアウトマウス生殖巣の形態解析

【目的】

本研究は、生殖細胞の形成に不可欠である *Nanos3* をノックアウトしたマウスの生殖巣を解析することを目的に、CRISPR/Cas9 システムを電気穿孔法で受精卵に導入する TAKE 法と GONAD 法での変異導入効率の違いを胚盤胞で調べた。次に遺伝子編集を惹起した受精卵より産仔を得て、生殖巣の解析を行った。

【方法】

TAKE 法: 4 週齢以上のマウスに過排卵処理を施し、交配確認日の夕方に卵管灌流にて前核期卵子を得た。前核期卵子は Cas9mRNA と gRNA を満たしたチャンパー内に並べ、電気穿孔を行った(図 1)。その後、胚盤胞まで発生させて解析に供し、残りは移植した。GONAD 法: 10 週齢以上の雌マウスを交配させ、交配確認日の夕方に外科的に卵管を体外に出し、Cas9 と gRNA を卵管内に注入し、ピンセット型電極を用いて卵管全体に対し電気穿孔法を施した。その後、卵管を雌マウスの体内に戻し、産仔を得た。TAKE 法および GONAD 法にて得られた産仔の尾または胚盤胞から DNA を抽出し、PCR および sequence にて homo、hetero、wild に分類した。得られた産仔は 10 週齢で生殖巣を採取し、生殖巣表現型の差異を比較した。生殖巣は、パラフィンで包埋後、切片を作製し、H&E 染色により組織形態学的解析を行った。



図1. Cas9/gRNA混合液内で受精卵にエレクトロポレーション

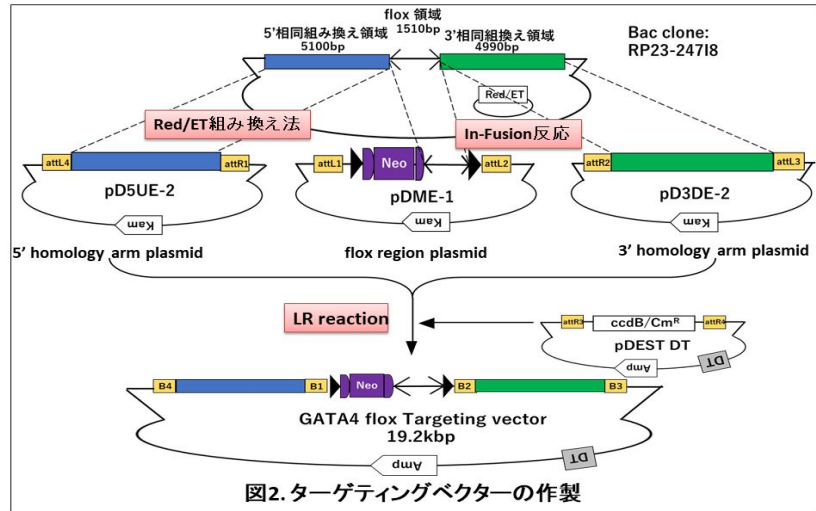
(2) 生殖巣特異的 GATA4 欠損マウスの作製とその胚盤胞補完法受容胚としての適性検索

【目的】

GATA4 は、性腺の分化に関与する転写因子で、生殖巣の発達において重要な役割を担っていると考えられている。一方、この分子は胚発生および胎生期の心筋の分化に関与するため、ホモ欠失では胎生致死となり、成体生殖腺への影響は未知な点が多い。我々は、胚盤胞補完法を用いた配偶子生産を計画し、コンディショナルノックアウト法で生殖巣特異的に GATA4 を欠損するマウスを作製し、その適性の検討を進めてきた。この GATA4-*fl*ox マウスを用いて生殖巣特異的に当該分子を欠損させたマウスを作製し、生殖巣および生殖細胞を胚盤胞補完法で作製するための受容胚としての可否を検証した。

【方法】

生殖巣特異的に GATA4 欠損を誘発するために、生殖巣に選択性高く発現する Vasa 遺伝子プロモーターの制御下で Cre を駆動するトランスジェニックマウス (Vasa-Cre マウス) と GATA4-*fl*ox マウスを交配させ、GATA4^{*fl*ox/*fl*ox};Vasa-Cre マウスを作出し、その生殖機能および生殖巣を形態学的に解析した (図 2)。



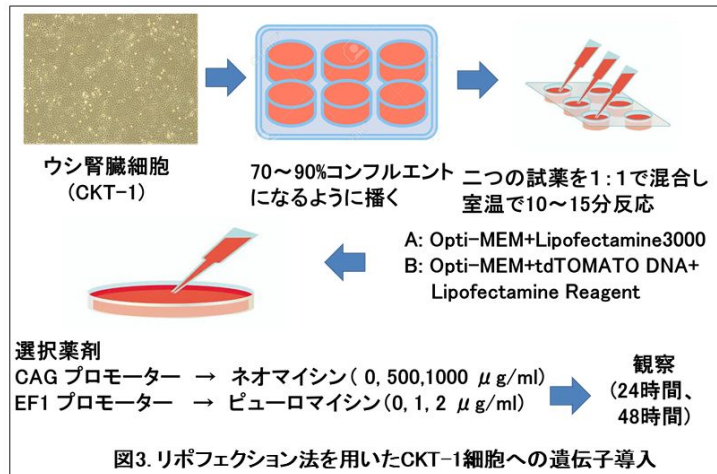
(3) ウシ CKT-1 細胞における効率的な遺伝子導入条件の検討と ES 細胞樹立の試み

【目的】

ウシ遺伝子改変技術開発の一環として、未分化幹細胞の樹立を進めている。その過程で、ウシ由来細胞に薬剤選択を用いて遺伝子導入を行う必要がある。同一組織由来の細胞でも動物種により利用できる選択薬剤と効率よく外部遺伝子を発現できるプロモーターは異なっているので、ウシに適した選択薬剤とプロモーターの検討を株化細胞で行った。

【方法】

蛍光タンパク *tdTomato* 遺伝子を CAG 及び EF1 プロモーターに継ぎ、その下流にそれぞれ pgk プロモーター制御下にネオマイシン (neo) とピューロマイシン (puro) 耐性遺伝子を発現するカセットを配置させた。ウシ腎臓由来細胞 (CKT-1) を E-MEM、10%FBS で培養し、リポフェクション法を用いて環状及び直線化したベクターを導入した。薬剤選択は 24 時間後から neo(0, 0.5, 1 mg/ml)、Puro(0, 1, 2 mg/ml) でおこなった (図 3)。



2018年にウシES細胞が樹立されたとの報告 (Bogliotti et al., PNAS)があったが、生殖系列伝達の確認はできていない。そこで、独自に確立したナイーブ化ラットES細胞樹立法技術を適用して、生殖系列伝達可能なウシES細胞の樹立を目指した。ウシ受精卵は、体外受精後の胚を胚盤胞期まで培養した。その後、透明体を除去し、フィーダー上で内部細胞塊が採取できるまで培養した。内部細胞塊由来細胞は、N2B27培地をベースにLIFや各種の細胞シグナル阻害剤を添加し、コロニー形態と増殖能を指標に株化を行った。

4. 研究成果

(1) CRISPR 遺伝子編集系を電気穿孔法で受精卵に導入して作製した Nanos3 ノックアウトマウス生殖巣の形態解析

【結果】

TAKE 法の胚盤胞区では、17.6%(homo:2 個 / 5.9%, hetero:4 個 / 11.7%)、移植区では 18.5%(homo:6 匹 / 17.2%, hetero:1 匹 / 1.3%)の効率で変異を確認できた。GONAD 法では、18.6%の効率で変異が確認でき、全て homo 欠損個体であった。精巣および卵巣は、wild 個体と homo 欠損個体でサイズに著しく差が生じていた。H&E 染色像を観察した結果、homo 欠損個体では、精子を含む生殖細胞は確認されず、セルトリ細胞のみが確認された。卵巣では、H&E 染色像を観察した結果、homo 欠損個体において卵子および卵胞は確認されなかった。以上、電気穿孔法で受精卵での遺伝子編集により、TAKE 法と GONAD 法では同程度の効率で Nanos3 遺伝子への変異を導入することが可能であり、かつ作製した Nanos3 ノックアウトマウスの生殖巣は、精巣の精細管内には精細胞が形成されず、卵巣内にも卵胞、卵母細胞が形成されないことを明らかにした(図4)。

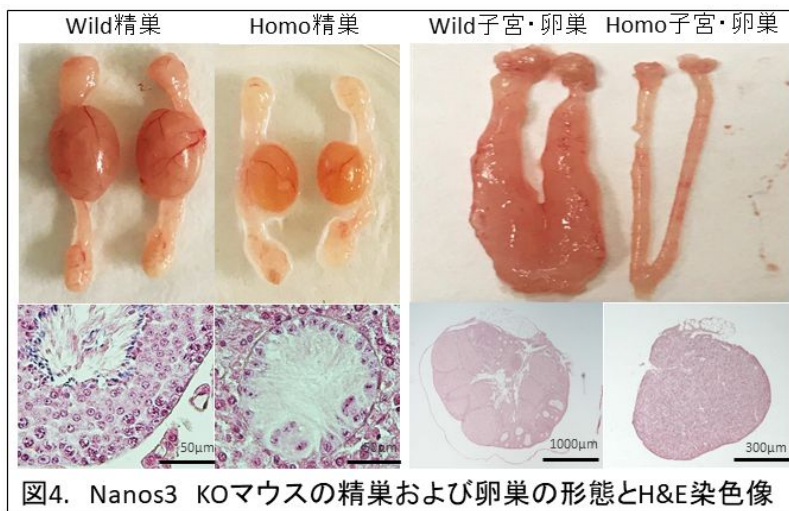


図4. Nanos3 KOマウスの精巣および卵巣の形態とH&E染色像

(2) 生殖巣特異的 GATA4 欠損マウスの作製とその胚盤胞補完法受容胚としての適性検索

【結果】

GATA4^{flox/flox} マウスと GATA4^{flox/+};Vasa-Cre マウスの交配過程で得たヘテロノックアウトマウスでは、生殖機能は維持されていたが、野生型と比較すると産子数の著しい減少が見られた(図5)。この結果から、ヘテロノックアウトマウスでは生殖機能が低下している可能性が示唆された。また、Vasa 遺伝子は生殖巣以外の皮膚の細胞にも一部発現しており、遺伝子型判定に尾や耳のバイオプシー試料を用いるとノックアウトバンドの発現が認められた。さらに、雌が Vasa-Cre 遺伝子を持つ場合、卵母細胞に Cre の発現があるためか、標的の GATA4-flox 遺伝子の組換えが全身で起きていた。そのためコンディショナルノックアウトには、雄が Vasa-Cre 遺伝子を持つ必要があることが解った。これらマウスの作製過程と作出マウス生殖巣の組織学的解析結果を示すことで、生殖巣特異的 GATA4 欠損マウスの胚盤胞補完法受容胚としての適性を考察する。



図5. Gata4-floxマウスの獲得

(3) ウシ CKT-1 細胞における効率的な遺伝子導入条件の検討と ES 細胞樹立の試み

【結果】

一過性発現では、CAG プロモーターの方が導入初期から強い蛍光が認められ、EF1 プロモーターより効率が良かった。一方、選択薬剤に関しては、CKT-1 細胞は neo 耐性が高く、1 mg/ml でも十分な選択ができなかった。Puro では、1.0 mg/ml 48 時間で完全に選択ができた。これらのことから、ウシ CKT-1 細胞では、CAG プロモーターを用いて Puro で選択する事が適していることが明らかになった(図6)。

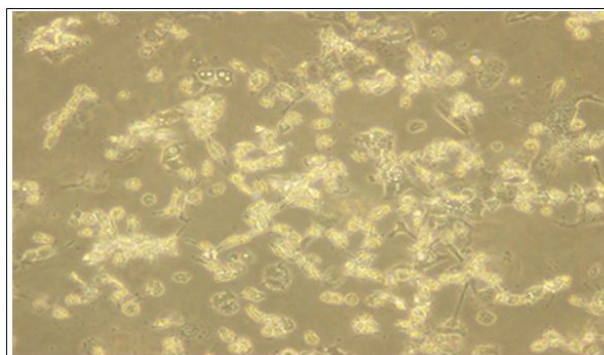


図6. Puromycinにて薬剤選択したCKT-1細胞

現段階では、ウシ ES 細胞様細胞のドーム状のコロニー形成を確認しているが、継代して培養するまでには至っておらず、継続してコロニー形態と増殖能を指標に株化を行う（図7）。

以上、本研究の成果は、異種間で生殖巣や生殖細胞を再生する技術開発の基盤となることが期待される。

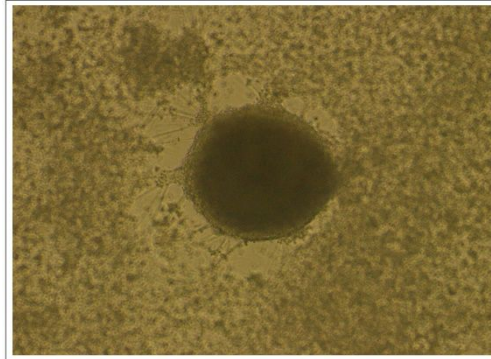


図7. ウシES様細胞のドーム状形態

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎亜美, 村田康輔, 川村名子, 中務 胞, 阿部 学, 夏目里恵, 杉村智史, 崎村建司, 山城秀昭
2. 発表標題 生殖巣特異的GATA4欠損マウスの作製とその胚盤胞補完法受容胚としての適性検索
3. 学会等名 第114回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田康輔・岩崎亜美・中務胞・川村名子・崎村建司・阿部 学・山城秀昭
2. 発表標題 ウシCKT-1細胞における効率的な遺伝子導入条件の検討
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎亜美・村田康輔・川村名子・中務 胞・阿部 学・夏目里恵・杉村智史・崎村建司・山城秀昭
2. 発表標題 ジーンターゲット法によるGATA4-floxマウスの作製
3. 学会等名 第113回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大平拓也・中務 胞・阿部 学・夏目里恵・杉村智史・崎村建司・山城秀昭
2. 発表標題 CRISPR遺伝子編集系を電気穿孔法で受精卵に導入して作製したNanos3ノックアウトマウス生殖巣の形態解析
3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大平拓也・中務 胞・阿部 学・夏目里恵・杉村智史・崎村健司・山城秀昭
2. 発表標題 エレクトロポレーション法によるマウス胚へのNanos3ノックアウト変異導入効率の検討
3. 学会等名 北信越畜産学会第67回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉村 智史 (Sugimura Satoshi) (00728454)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	
研究分担者	笹岡 俊邦 (Sasaoka Toshikuni) (50222005)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------