

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19201040

研究課題名（和文）

精子幹細胞の遺伝子改変によるノックアウト動物の作製

研究課題名（英文）

Production of knockout animals by spermatogonial stem cells

研究代表者

篠原 隆司（ SHINOHARA TAKASHI ）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322770

研究成果の概要（和文）：

精子幹細胞は精子形成の源となる細胞である。我々は2003年にマウスの精子幹細胞の長期培養に成功し、これを Germline stem (GS)細胞と命名した。本研究の目的はラットGS細胞においてノックアウトラット個体を作製することである。我々はラットGS細胞におき相同組み替えの成功を確認した。しかしながら、この細胞からは顕微授精により遺伝子改変された子孫を得ることが出来なかった。一方で遺伝子トラップベクターを導入されたラットGS細胞からは子孫を得ることができた。我々の相同組み替えの成功は今後のGS細胞による遺伝子改変動物における重要な基盤となるものである。

研究成果の概要（英文）：

Spermatogonial stem cells (SSCs) are the only stem cells in the body with germline potential, which makes them an attractive target for germline modification. We previously showed the feasibility of homologous recombination in mouse SSCs, and produced knockout (KO) mice by exploiting germline stem (GS) cells, i.e., cultured spermatogonia with SSC activity. In this study, we report the successful homologous recombination in rat GS cells, which can be readily established by their ability to form germ cell colonies on culture plates whose surfaces are hydrophilic and neutrally charged and thus limit somatic cell binding. We established a drug selection protocol for GS cells under hypoxia. The frequency of the homologous recombination of the occludin gene was 4.2% (2/48). However, these GS cell lines failed to produce offspring following xenogeneic transplantation into mouse testes and microinsemination, suggesting that long-term culture and drug selection have a negative effect on GS cells. Nevertheless, our results demonstrate the feasibility of gene targeting in rat GS cells and pave the way toward the generation of KO rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
20年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
21年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
22年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
年度			
総計	36,900,000	11,070,000	47,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：総合領域、実験動物学

キーワード：幹細胞・生殖・遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は成体の精巣にあり、一生にわたって精子形成の源となる細胞である。研究代表者らは 2003 年にマウスの精子幹細胞の長期培養系を確立し、これを Germline stem (GS) 細胞と命名した。この細胞の特徴は非常に長期にわたり安定的に増殖することであり、2年間で $10^{85}$ 倍 (139 passages) に増え、その間増殖速度や幹細胞としての活性・インプリンティングや核型などに全く変化を示さず、2年の培養後も正常な子孫を作った。さらに、2006年に我々はマウスGS細胞における遺伝子トラップおよび相同組み替え法を利用してノックアウトマウスの作製に成功した。

GS細胞はその後、ラット、ハムスター、ウシ、ヒトなどでも樹立されている。しかしながら、GS細胞を用いた遺伝子改変技術についてはマウス以外の動物では報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はこのマウスで開発された遺伝子改変技術をラットなどの他の動物へと展開することである。特に、ラットGS細胞を用いて相同組み替え法による遺伝子ノックアウトラットの作製を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の3つのステップに分けることができる。

### (1) GS細胞のラット精巣からの樹立

ラットの精巣から精子幹細胞を純化し、GS細胞として培養系を確立する。

### (2) GS細胞の薬剤選択

遺伝子トラップベクター (ROSA betageo) もしくは相同組み替えベクター (ラットオクルジン) をGS細胞に導入後、G418耐性となったGS細胞を一個のコロニーから大量調製を行なう。薬剤選択が終了した細胞については遺伝子改変結果を Polymerase chain reaction (PCR) 法もしくはサザンブロット法により確認を行なう。

### (3) GS細胞からの子孫作製

遺伝子改変が確認された細胞については免疫不全であるヌードマウスの精巣内に細胞を移植を行なう。3-4ヶ月後に、精巣よりラット精子形成細胞を回収し、ラット卵子へとマイクロインジェクションを行ない、子孫を作製する。生まれた子孫については遺伝子改変結果を Polymerase chain reaction (PCR) 法もしくはサザンブロット法により確認を行なう。

## 4. 研究成果

### (1) GS細胞の樹立の効率化

我々はラットGS細胞の樹立の効率を改善するために、新たな樹立方法を考案した。この方法ではラット精巣をコラゲナーゼとトリプシンによりバラバラにした後、ultralow binding plate に無血清培地を用いて播種する。1週間から10日後には、このプレートにラット精原細胞のコロニーが生じてくるので、このときに付着細胞のみを回収することで、選択的に体細胞を除去することができ、GS細胞を簡単に樹立することができることが明らかになった。

### (2) GS細胞の薬剤選択

我々は当初ラットGS細胞の薬剤選択をマウスGS細胞と同じ方法により行なったが、この場合は複数遺伝子が同時に挿入されたクローンのみが取れてくるという問題が生じた。このために、培養液の改善 (B27 supplement の添加、血清濃度の低下) および培養酸素濃度の低下を行なった。その結果、一個の遺伝子のみが挿入された細胞クローンを樹立することが可能となった。

この実験系を用いた結果、ラットオクルジン遺伝子の相同組み替え体を 2/48 (4.2%) の確率で得ることができた。

### (3) GS細胞からの子孫作製

薬剤選択されたクローンからの子孫作製には先天的に免疫抑制されているヌードマウスの精巣に遺伝子改変されたGS細胞の移植を行なった。3-4ヶ月後にラット由来の回収された円形精子細胞をラット卵子にマイクロインジェクションを行なった。遺伝子トラップされたGS細胞からは導入された遺伝子をもつラット個体が確認されたが、相同組み替えを行なったGS細胞からは子孫を得ることが出来なかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① 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):6210-6215 (2010).
- ② Morimoto H., Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Chuma S., Nakatsuji N., Shinohara T. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One*. 4(11):e7909,p1-9 (2009).
  - ③ Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Takashima S., Ogura A., and Shinohara T. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *J. Reprod. Dev.* 56(1):145-153 (2010).
  - ④ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Kazuki Y., Takashima S., Oshimura M., Toyokuni S., and Shinohara T. Genetic reconstitution of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras/cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell* 5(1):76-86 (2009).
  - ⑤ Takashima S., Takehashi M., Lee J., Chuma S., Okano M., Hata K., Suetake I., Nakatsuji N., Miyoshi H., Tajima S., Tanaka Y., Toyokuni S., Sasaki H., Kanatsu-Shinohara M., and Shinohara T. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol. Reprod.* 81(1):155-64 (2009).
  - ⑥ Kanatsu-Shinohara M., Takehashi M., and Shinohara T. Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73:17-23 (2008).
  - ⑦ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Ogura A., and Shinohara T. Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 80(3):518-27 (2009).
  - ⑧ Kanatsu-Shinohara M., Takehashi M., Takashima S., Lee J., Morimoto H., Chuma S., Raducanu A., Nakatsuji N., Fässler R., and Shinohara T. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on  $\beta 1$ -integrin. *Cell Stem Cell* 3(5):533-42 (2008).
  - ⑨ Kanatsu-Shinohara M., Kato M., Takehashi M., Hirabayashi M., and Shinohara T. Production of transgenic rats following lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 79(6):1121-8 (2008).
  - ⑩ Kanatsu-Shinohara M., Muneto T., Lee J., Takenaka., Chuma S., Nakatsuji N., Horiuchi T., and Shinohara T. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol. Reprod.* 78(4):611-7 (2008).
  - ⑪ Kanatsu-Shinohara M., Lee J., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ikawa M., Nakamura T., Ogura A., and Shinohara T. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol. Reprod.* 78(4):681-7 (2008).
  - ⑫ Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, and Shinohara, T. Production of knockout mice by gene targeting in multipotent germline stem cells. *Dev. Biol.* 312, 344-352 (2007).
  - ⑬ Kanatsu-Shinohara M. and Shinohara T. Culture and genetic modification of mouse germline stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 312(1):344-52 (2007).
  - ⑭ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Kimura T., Nakano T., Ogura A., and Shinohara T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* 134(10), 1853-9 (2007).
  - ⑮ Takehashi M., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H.,

Toyokuni S., Ogura A., and  
Shinohara T. Adenovirus-mediated  
gene delivery into mouse  
spermatogonial stem cells. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 104(8),  
2596-601 (2007).

[学会発表] (計 6 件)

1. Cold Spring Harbor 73<sup>rd</sup> Symposium:  
Control and Regulation of Stem Cells  
“Culture of Spermatogonial stem  
cells” 2008 年 5 月 28 日-6 月 2 日 米  
国 New York
2. Society for the Study of Reproduction,  
Annual meeting “Culture of  
Spermatogonial stem cells” 2008 年 5  
月 25-30 日 米国 Hawaii
3. Cornell University Stem Cell Lecture  
“Culture of Spermatogonial stem  
cells” 2008 年 6 月 3 日 米国 New York
4. The 11<sup>th</sup> Kyoto University  
International Symposium. “Culture  
of Spermatogonial stem cells” 2008  
年 10 月 9-11 日 中国上海
5. Takashi Shinohara (Kyoto University),  
“Derivation of embryonic germline  
stem cells” The 36<sup>th</sup> International  
Congress of Physiological Sciences,  
Kyoto, 8/1/09
6. Takashi Shinohara (Kyoto University),  
“Positive and negative regulators of  
mouse spermatogonial stem cell  
self-renewal” Keystone Meeting,  
Keystone, Colorado, 2/17/10

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad\\_sch  
ool/introduction/1504/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1504/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠原隆司 (SHINOHARA TAKASHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 30322770