

平成22年5月30日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：%##+～%##,
 課題番号：20790302
 研究課題名（和文）精子幹細胞における RNAi 法による
 研究課題名（英文）Production of gene Knock-down animal by introducing RNAi into spermatogonial stem cells.
 "
 研究代表者 高島 誠司（Takashima, Seiji）
 京都大学 医学研究科 助教
 研究者番号：40396891

研究成果の概要（和文）：まず、精子幹細胞において RNAi 法による遺伝子ノックダウンが有効であるかを検討すべく、緑色蛍光（EGFP）マウス由来精子幹細胞へ、EGFP に対する RNAi を導入した。レンチウイルスベクターによる RNAi 導入により EGFP の発現を有意に抑制することができたが、完全にノックダウンすることはできず、個体を作製するには至らなかった。一方この RNAi 導入法を用いて DNA メチル転移酵素 1 が精子幹細胞の生存に重要であることを示したが、これは同時に、この課題で確立した RNAi 法による遺伝子ノックダウンが内在性の遺伝子に対しては有効であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：To assess whether RNAi mediated gene knock-down could be applied to germline stem cells, RNAi construct for EGFP knock-down was transduced to germline stem cells derived from EGFP transgenic mouse. Although lentivirus mediated RNAi transduction suppressed the EGFP expression to some extent in germline stem cells, the efficiency was not enough to produce the knock-down mouse. Meanwhile, by using RNAi technology developed in this project, it was shown that DNA methyl transferase I is indispensable for the survival of germline stem cells in vitro, suggesting that RNAi mediated knockdown is available for the endogenous genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
~%##+年度	1,500,000	450,000	1,950,000
~%##, 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞研究は、幹細胞の機能を評価する実験系が存在しなかったため、ほかの幹細胞研究に比較しあまり進展していな

った。しかし、1994年の精子幹細胞移植法の開発によりようやく精子幹細胞の機能評価が可能となった。これをもとに、 α_6 、 β_1 -integrin 発現を指標とした精子幹細胞の濃縮

法及び *in vitro* 長期培養法が開発された。こうして幹細胞研究に必須の基盤技術が確立された。

一方精子幹細胞は、生体の中で個体の遺伝情報を子孫に伝えることのできる数少ない細胞の一つであり、生殖工学の観点から非常に有用な細胞として期待されている。既に申請者のグループによりマウス精子幹細胞を用いたトランスジェニックおよびノックアウトマウスが作製されており、精子幹細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製が可能であることが証明されている。現在胚性幹細胞でのノックアウト動物の作製は、マウス以外の動物では成功していない。一方、精子幹細胞は種々の動物種でその存在が確認されており、胚性幹細胞が樹立困難な動物であっても精子幹細胞による遺伝子改変動物の作製が可能になると期待されている。

申請者の研究目標は、マウスを含め種々の動物種に応用可能、且つより安価に短期間で行うことができる遺伝子ノックダウン個体作製法を開発することである。精子幹細胞は遺伝子改変動物作製に用いることができ、且つマウス以外の種々の動物でも存在が確認されている生殖系列細胞である。そして RNA interference (RNAi) 法は、遺伝子ノックアウト法に比し費用・時間の面で格段に優れているため、個体における遺伝子発現抑制法として将来幅広く用いられる可能性がある。申請者は、これら二つの長所を組み合わせることで研究目標を達成できると考えているが、まずはこの手法が可能かどうかを検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、『精子幹細胞において RNAi 法による遺伝子ノックダウンが可能であるか』及び『それを利した遺伝子ノックダウン個体の作製が可能か』を、マウスとラットについて同時に検討することを当初の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 緑色蛍光タンパク EGFP を発現する精子幹細胞をラットおよびマウスより樹立する

① 新生児 EGFP トランスジェニックマウス・ラット精巣をトリプシン・コラゲナーゼ処理にて分散させ、胎児繊維芽細胞上グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、白血病阻止因子 (LIF)、表皮増殖因子 (EGF)、繊維芽細胞増殖因子 (FGF)-2 存在下で培養し EGFP 発現精子幹細胞を樹立した。

(2) プラスミドベクターによる精子幹細胞への RNAi 導入

① EGFP の発現をノックダウンし、且つ赤色蛍光タンパク (HcRed) と抗生物質ネオマイシン耐性の発現を誘導する RNAi コンストラクト (阪大岡部勝博士より供与) を EGFP 発現精子幹細胞にリポフェクション法により遺伝子導入した。

② ネオマイシン存在下で継代培養し、RNAi 導入細胞を選別した。

③ 蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリにて EGFP 蛍光の減弱を検討した。

(3) レンチウイルスベクターによる精子幹細胞への RNAi 導入

① EGFP の発現をノックダウンするレンチウイルスを調製し、EGFP 発現精子幹細胞に spin infection 法により感染させた。

② 蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリにて EGFP 蛍光の減弱を検討した。

(4) 精子幹細胞への DNA メチル転移酵素 1 (Dnmt1) に対する RNAi 導入とその性状解析

① Dnmt1 の発現をノックダウンするレンチウイルスを調製し、精子幹細胞に spin infection 法により感染させた。

② 細胞の増殖をセルカウントにより、アポトーシスの検出を TUNEL 染色により行った。

4. 研究成果

まず、マウスおよびラット EGFP 発現精子幹細胞の樹立を試みた。新生児 EGFP 発現マウス・ラット精巣をトリプシン・コラゲナーゼ処理にて分散させ、胎児繊維芽細胞上 GDNF, LIF, EGF, FGF-2 存在下で培養することで、安定した増殖挙動を示す EGFP 精子幹細胞を樹立することができた。

次に、マウス EGFP 発現精子幹細胞に、GFP に対する RNAi コンストラクト (阪大岡部勝博士より供与、ネオマイシン耐性遺伝子、赤色蛍光タンパク質 HcRed を共発現する) を EGFP 発現精子幹細胞にリポフェクション法により遺伝子導入したところ、ネオマイシン耐性クローンを複数得たものの、いずれも RNAi による EGFP 蛍光の減弱は認められなかった。

そこで、リポフェクション法よりもより強力且つ簡便に RNAi 効果を得るために、レンチウイルスを用いた RNAi 導入を検討した。GFP に対する RNAi を発現するレンチウイルスを調製しマウス EGFP 精子幹細胞に感染させたところ EGFP 蛍光の減弱が認められた。しかしながら、EGFP の蛍光が完全に消去された精子幹細胞株を得ることができなかつ

た。

一方、この研究課題において確立したレンチウイルスを介した RNAi 導入法により、精子幹細胞において DNA メチル転移酵素 1 (Dnmt1) がその生存に必須であることを明らかにした。精子幹細胞に Dnmt1 に対する RNAi をレンチウイルスベクターにより導入したところ、精子幹細胞における Dnmt1 発現量は元の 20%にまで抑制され、アポトーシスにより死滅した。当初の研究目的は果たせなかったものの、本研究課題で確立された遺伝子発現抑制技術により Dnmt1 が精子幹細胞の生存に必須の遺伝子であることを発見した。

本研究では、『(1)精子幹細胞において RNAi 法による遺伝子ノックダウンが可能であるか』及び『(2)それを利した遺伝子ノックダウン個体の作製が可能か』を、マウスとラットについて同時に検討することを当初の目標とし、研究を遂行した。(1)については、精子幹細胞において RNAi 法による遺伝子ノックダウンが有効であることを、EGFP 並びに Dnmt1 のノックダウン実験により示すことができた。しかしながら、EGFP のノックダウンは完全ではなく、EGFP 発現が完全に抑制された精子幹細胞を得ることができなかつたため、(2)のそれを利した遺伝子ノックダウン個体の作製にはいたらなかつた。原因としては、外来遺伝子である EGFP の精子幹細胞における発現が強力なため、完全に押さえることができなかったためと考えられる。実際、内在性に発現する Dnmt1 のノックダウンは成功し、80%の発現抑制を達成できた。今後、RNAi 導入を取り扱いが困難で感染の危険性のあるレンチウイルスベクターではなく、より安全且つ簡便なベクターで行うこと、ノックダウンの標的となる遺伝子を内在性の遺伝子に変更し、遺伝子ノックダウン個体の作製が可能か』を検討する予定である。

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 8 件)

- (3) 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. *Journal of Reproduction and Development* 2010 56(1) p145-153 (査読あり)

- (4) Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Takehashi M, Shinohara T. Phenotypic Plasticity of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *PLoS One*. 2009 4(11):e7909. (査読あり)
- (3) Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Kazuki Y, Takashima S, Oshimura M, Toyokuni S, Shinohara T. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell* 2009 5(1): 76-86. (査読あり)
- (4) 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, Shinohara T. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biology of Reproduction*. 2009 81(1): 155-64. (査読あり)
- (5) Izumi-Yoneda N, Toda A, Okabe M, Koike C, Takashima S, Yoshida T, Konishi I, Saito S, Nikaido T. Alpha 1 antitrypsin activity is decreased in human amnion in premature rupture of the fetal membranes. *Molecular Human Reproduction*. 2009 15(1): 49-57 (査読あり)
- (6) Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J, Morimoto H, Chuma S, Raducanu A, Nakatsuji N, Fassler R, Shinohara T. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell*. 2008 3(5): 533-42. (査読あり)
- (7) Kanatsu-Shinohara M, Kato M, Takehashi M, Morimoto H, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Hirabayashi M, Shinohara T. Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction* 2008 79(6): 1121-1128. (査読あり)
- (8) Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T, Toda A, Nikaido T. Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue and Cell* 2008 40(2): 75-81. (査読あり)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高島 誠司 (Takashima, Seiji)

京都大学大学院 医学研究科 助教

研究者番号 : 40396891