

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 21 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570260

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ精原幹細胞の増殖因子の同定とその応用

研究課題名(英文) Identification of growth factors for zebrafish spermatogonial stem cells and the utilization

研究代表者

酒井 則良 (Sakai, Noriyoshi)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・准教授

研究者番号：50202081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本課題はゼブラフィッシュにおいて新規の精原幹細胞増殖因子により遺伝子改変可能な長期精原幹細胞培養系の確立を目的とした。マイクロアレイ解析と培養系の検証により、血小板増殖因子、骨形成タンパク質阻害剤、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸に精原幹細胞増殖効果があることを認めた。また、がん化精巣を用いることで2ヶ月以上精原幹細胞を培養できること、この細胞へ効果的に遺伝子導入できることがわかった。さらに、免疫不全変異体へ皮下移植することでがん化精巣の継代維持が可能となった。以上の成果により目的の精原幹細胞培養系を確立できた。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to establish a long-term culture condition for zebrafish spermatogonial stem cells (SSCs) by novel growth factors, which facilitates genetic manipulation in SSCs. Microarray analysis and in vitro culture of SSCs revealed that platelet-derived growth factor, bone morphogenetic protein inhibitor, hyaluronic acid, and heparan sulfate have an effect on the proliferation of SSCs. In addition, the use of a hypertrophied testis enabled us to prolong the SSC culture length more than 2 months, and to transfect foreign genes efficiently. Furthermore, a hypertrophied testis were maintained continuously by subcutaneously grafting into immunodeficient zebrafish. These results will allow us to establish culture system to select genetically modified SSCs.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 精原幹細胞 精子形成 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は自己再生と分化型細胞の産生を担う細胞で、その組織の形成や恒常性の維持に役割を果たす。この自己再生と分化型細胞の産生を制御する分子基盤は発生生物学において重要な課題であり、最近とくに注目が集まっている分野でもある。

オスの生殖系も幹細胞(以下、精原幹細胞とよぶ)の自己再生と分化が正確に制御されることにより生涯にわたり精子形成が維持される。その分子基盤として、例えば、ショウジョウバエでは精巣先端部のハブ細胞に由来する分泌因子 Unpaired (Upd)¹、さらに細胞表面因子として DE-cadherin² が幹細胞の自己再生に機能することが明らかにされている。また、マウスでは精原幹細胞の増殖に分泌因子 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)³ や細胞表面因子 β 1-integrin⁴ が、そして分化には分泌因子の Stem cell factor (SCF)³ や neuregulin-1⁵ が必要であることが報告されている。しかしながら、精原幹細胞の自己再生と分化を制御する分子機構は、まだ多くの因子が未同定で、十分に解明されているとは言えない。

小型の熱帯魚、ゼブラフィッシュは大規模な突然変異体作成とゲノム基盤整備により脊椎動物のモデル生物として注目されている。研究代表者らは、マウス精原幹細胞の増殖に必要な GDNF を中心にゼブラフィッシュ精原幹細胞の増殖に効果を示す増殖因子の解析を進め、GDNF と繊維芽細胞増殖因子 (bFGF)、インスリン様増殖因子 (IGF1) を組み合わせることで、精原幹細胞を1ヶ月以上培養できる系を確立した。さらに、抗がん剤のプサルファンでゼブラフィッシュを処理することで、精原幹細胞のみを持つ精巣の作出も可能となった。これらの成果とこの魚のゲノム基盤を用いることで、精原幹細胞に特異的な遺伝子を単離し、それから類推される増殖因子を精原幹細胞培養系でアッセイすることが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、精原幹細胞のみを持つ精巣と正常の精巣で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ等により網羅的に解析し、分泌因子や受容体リガンドの候補因子のリコンビナントタンパクを精原幹細胞培養系に加えて増殖活性をアッセイして、ゼブラフィッシュ精原幹細胞に対して増殖効果を示す新規因子の同定を目的の1つとした。

一方、ゼブラフィッシュでは zinc finger nuclease による欠損型遺伝子ノックアウトは報告されているものの⁶、相同遺伝子組換えによる遺伝子ノックアウトはまだできていない。精原幹細胞培養系では生殖系列への遺伝子改変が可能であり、すでにその成功例がマウスで報告されている⁷。そこで、同定した因子を用いて培養系を改良し、精原幹細胞の遺伝子改変を可能にする長期間の精原幹細胞

培養系を確立することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 精原幹細胞特異的遺伝子の解析

精原幹細胞のみを含む精巣と正常の精巣から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。精原幹細胞のみを持つ精巣は、プサルファン (66 μ g/ml) を溶かした飼育水でゼブラフィッシュ個体を3日間処理して得た。

ゼブラフィッシュゲノムデータベースを参照して、発現差が認められた遺伝子の中から分泌因子と受容体を絞り込み、それらに対して特異的なプライマーを合成した。vas プロモーター-EGFP 遺伝子 (vas::EGFP) トランスジェニックゼブラフィッシュの精巣から精原幹細胞および分化型精原細胞を単離し、RNA を抽出して、RT-PCR 解析によりその発現パターンを確認した。

(2) 精原幹細胞培養系による増殖因子の効果解析

見つかった遺伝子が分泌因子であればそのリコンビナントタンパク、受容体であればそのリガンドのリコンビナントタンパクを用いて、精原幹細胞培養系によりその効果を解析した。培養には vas::EGFP あるいは sox17 プロモーター-EGFP 遺伝子 (sox17:EGFP) トランスジェニックの精原細胞(精原幹細胞を含む)を用い、EGFP 陽性細胞を計数してその効果を解析した。

(3) nanos2 プロモーター-EGFP 遺伝子 (nanos2::EGFP) トランスジェニックゼブラフィッシュの作成

nanos2 プロモーター領域を持つ BAC クローン CH211-31P3 を用いて、Suster ら⁸ の方法にしたがって EGFP 遺伝子をその下流に導入した。作成したコンストラクトは、1細胞胚に tol2 transposase mRNA とともに顕微注入した。

(4) がん化精巣の維持

ゼブラフィッシュでは、まれに精巣が肥大化したがん化精巣が認められる。そのがん化精巣細胞を培養したところ、精原幹細胞培養系に適することが明らかとなった。そこで、がん化精巣を維持することを目的に、免疫不全変異体の rag1 欠損ゼブラフィッシュへ皮下移植を行った。移植法は Kawasaki ら⁹ の方法に従った。

4. 研究成果

(1) 精原幹細胞増殖因子の同定

初めに sox17:EGFP トランスジェニックの精巣において初期型精原細胞にのみ EGFP シグナルが認められたため、この精巣を用いて精原幹細胞の培養を行った。その結果、培養一ヶ月後においても精原細胞塊において EGFP シグナルが認められ(図1) 初期型精

原細胞が培養できていることが示された。この細胞が精原幹細胞である可能性は高く、従来よりも効果的に精原幹細胞の増殖をアッセイできる系ができたものと考えられる。

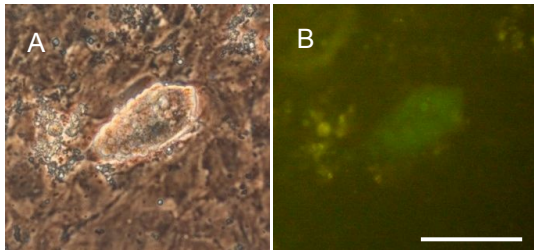


図 1. *sox17::EGFP* 精巢細胞の培養 1 ヶ月。A. 明視野, B. 蛍光像。バー ; 100 μm。

精原幹細胞のみの精巢と正常に精子形成を精巢とのマイクロアレイ解析から、受容体では activin 受容体 2b (ACVR2b)、colony stimulating factor1 受容体、線維芽細胞増殖因子受容体 4 (FGFR4)、肝細胞増殖因子受容体 (HGFR)、血小板由来増殖因子受容体 a (PDGFRa)、chemokine 受容体 4a、分泌因子では somatostatin2、線維芽細胞増殖因子 10、インスリン様増殖因子 2 (IGF2)、stromal cell-derived factor1、骨形成タンパク 4 の遺伝子が 2 倍以上発現に差があることがわかった。

そこで、*vas::EGFP* の精巢から蛍光強度により未分化型精原細胞と分化型精原細胞を単離し、これらの遺伝子の発現パターンを RT-PCR 法により解析した。その結果、PDGFRa と IGF1Ra が未分化型精原細胞で発現上昇していることがわかった。ACVR2b は分化型精原細胞の方で発現が上昇していた。すでに IGF についてはその増殖促進効果を認めていたため、PDGF の効果を培養系でアッセイした。市販のヒト PDGF リコンビナントタンパクを用いて精原幹細胞の増殖効果を調べたところ、0.02 μg/ml の濃度で添加した場合、1 ヶ月の培養で約 1.5 倍の増殖効果が認められた (図 2 A)。

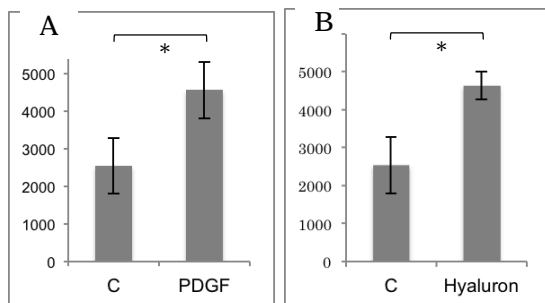


図 2. PDGF (A) とヒアルロン酸 (B) による精原幹細胞増殖効果。縦軸は細胞数、*は $P < 0.05$ 。

一方、ヒト胚性幹 (ES) 細胞では細胞外基質の構成要素ヒアルロン酸が長期間にわたる増殖に必要なこと¹⁰が報告されているため、ゼブラフィッシュ精原幹細胞の増殖効果を同様に培養系で確認した。0.2 μg/ml のヒ

アルロン酸を添加した結果、PDGF と同等の効果を示すことがわかった (図 2 B)。このことは細胞外基質成分がゼブラフィッシュの精原幹細胞の増殖に必要であることを示唆するものである。そこでショウジョウバエの生殖系幹細胞ニッチに必要な因子として知られるヘパラン硫酸¹¹の効果を検討した。ヘパラン硫酸の一種、ヘパリンを 50 U/ml で添加したところ、この魚においても精原幹細胞の増殖に効果があることがわかった。

また、上記解析で分化型精原細胞で発現上昇が認められた ACVR2b については、リガンドの 1 つである骨形成タンパク (BMP) シグナルを阻害剤で抑制するとゼブラフィッシュ稚魚の精原幹細胞が増殖することが報告された¹²。そこで、この精原幹細胞培養系においてその効果を調べたところ、阻害剤に精巢体細胞の増殖を抑え、精原幹細胞を増殖させる働きがあることがわかった。すでに同じトランスフォーミング増殖因子-β (TGF-β) 系の GDNF が精原幹細胞の増殖に効果を持つことが示されているため、これら 2 つの TGF-β 系因子は受容体を共有せずに精原幹細胞への増殖あるいは分化に作用するものと推測される。

(2) *nanos2* プロモーターによる精原幹細胞の標識

ゼブラフィッシュゲノムデータベースから未報告の *nanos* 遺伝子が見つかったため、その解析を行った。マウスでは *Nanos2* が未分化型精原細胞で発現し、幹細胞性を維持していることが報告されているが¹³、ゼブラフィッシュ精原幹細胞において *nanos* の役割は検討されていなかった。アミノ酸配列による系統解析の結果、この *Nanos* はメダカの *Nanos2* と相同性が高く、発現解析の結果、精巢では生殖細胞特異的に発現していることがわかった (図 3)。ゼブラフィッシュではすでに 2 つの *nanos* ホモログが *nanos1* と *nanos3* として報告されており、われわれはこの *nanos* ホモログを *nanos2 (nos2)* とした。

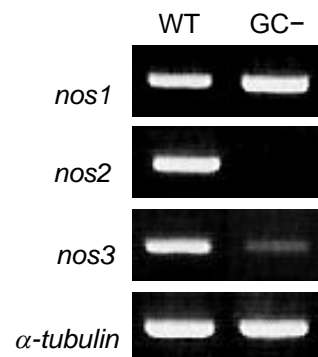


図 3. 正常精巢 (WT) と生殖細胞を含まない精巢 (GC-) における 3 種の *nanos* 遺伝子の発現。α-tubulin はポジティブコントロール。

蛍光標識した精原幹細胞の培養系は増殖

因子のアッセイを容易にする。そこで、この *nos2* のプロモーターで EGFP を発現するトランスジェニックの作成を進めた。ゼブラフィッシュの BAC クローン CH211-31P3 が *nos2* のプロモーター領域を含んでいたため、これを用いて *nos2* の転写開始点付近に *EGFP* 遺伝子を組み込み、ベクターバックボーンに *tol2* トランスポゾンカセットを導入した。この DNA コンストラクトを *tol2 transposase* mRNA とともに 1 細胞胚へ顕微注入した。顕微注入胚は生育が悪く、成長した 26 匹から子供をとって導入遺伝子の有無を調べたが、導入遺伝子を持つものは見つからなかった。再度顕微注入実験を行い、現在 72 匹が生育中である。

(3) がん化精巣由来の精原幹細胞の培養

精巣が肥大化した、いわゆるがん化した精巣が研究期間中に見つかった。組織観察により、この精巣では未分化型精原細胞が過増殖していることが認められた。そこで、従来の GDNF, bFGF, IGF1 を添加した培養液で培養したところ、2 ヶ月以上培養できることがわかった(図 4 A, B)。これは従来の 2 倍程度の長さであり、当初目標とした長期の精原幹細胞培養系を達成できた。現在、(1)で見つめられた精原幹細胞増殖因子を種々の組み合わせで培養液に添加しその効果を最終的に検証している段階である。

さらに、この精原幹細胞への遺伝子導入法の検討を進めた。10-20 日程度培養した後、エレクトロポレーションと専用試薬を組み合わせた Nucleofector 法により遺伝子導入を行った。*CMV* プロモーター-*EGFP* 遺伝子を導入し、蛍光によりその導入効率を調べたところ、10%程度の効率で精原幹細胞に遺伝子導入できることがわかった(図 4 C, D)。以上の結果から、がん化精巣由来精原幹細胞を用いることで、遺伝子改変に対応可能な培養系が確立できたと判断する。

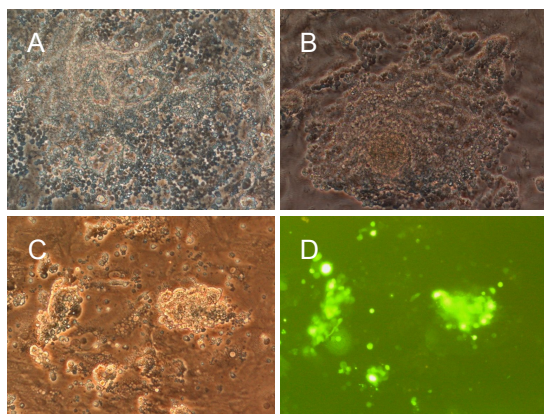


図 4. がん化精巣由来精原幹細胞の培養とその遺伝子導入。A. 培養 7 日目、B. 培養 2 ヶ月。C, D. 10 日間培養した後、*CMV::EGFP* を導入し、培養 4 日後の明視野像 (C) と蛍光像 (D)。

(4) がん化精巣維持法の確立

がん化精巣が精原幹細胞培養系に適することがわかったため、その組織の継代維持法を検討した。ゼブラフィッシュではすでに *rag1* 欠損変異体が単離されており、移植組織への拒絶反応が低いことが予想されたため、この変異体への移植を行った。がん化精巣を断片化し、それぞれを皮下へ移植したところ、拒絶反応は認められず、3 ヶ月程度で一部の断片が再肥大化することがわかった(図 5)。一方、定着せずに消失してしまう断片があることも認められた。その違いを比較検討したところ、精巣組織の最外層を含んだ断片が再肥大化することがわかった。

そこで、再肥大化した精巣をもう一度、最外層を含むように断片化し移植したところ、再び肥大化することが認められ、継代維持できることがわかった。これにより、ゼブラフィッシュで必要なときにがん化精巣を用いることが可能となった。

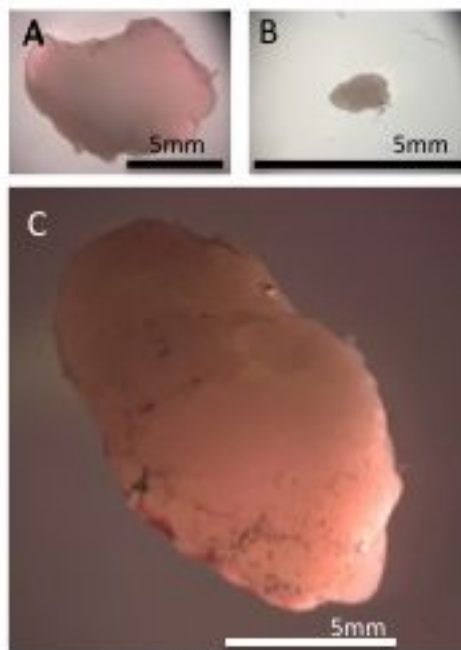


図 5. がん化精巣断片の移植。A. 断片化前のがん化精巣、B. 断片化後のがん化精巣断片、C. がん化精巣断片を移植した後 3 ヶ月のがん化精巣。

引用文献

1. Kiger et al. *Science* 294, 2542-2545 (2001); Tulina, Matunis. *Science* 294, 2546-2549 (2001).
2. Yamashita et al. *Science* 301, 1547-1550 (2003).
3. Morrison, Spradling. *Cell* 132, 598-611 (2008).
4. Kanatsu-Shinohara et al. *Cell Stem Cell* 3, 533-542 (2008).
5. Hamra et al. *J Biol Chem* 282, 721-730 (2007).
6. Meng et al. *Nat Biotechnol.* 26, 695-701(2008); Doyon et al., *Nat Biotechnol.* 26, 695-701(2008).

7. Kanatsu-Shinohara et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8018-8023 (2006).
8. Suster et al. *Methods Mol Biol* 561, 41-63 (2009).
9. Kawasaki et al. *Biol. Reprod.* 83, 533-539.
10. Gerecht et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 11298-11303 (2007).
11. Hayashi et al. *J Cell Biol* 187, 473-480 (2009).
12. Wong, Collodi. *PLoS One* 8, e71332 (2013).
13. Sada et al. *Science* 325, 1394-1398 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Kawasaki, T., Saito, K., Sakai, C., Shinya, M., Sakai N. Production of zebrafish offspring from cultured spermatogonial stem cells. *Genes to Cells*, 査読有, 17, 2012, 316-325. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01589.x

〔学会発表〕(計 4件)

河崎敏広、酒井千春、酒井則良。精原細胞の分化に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体の解析。日本動物学会第82回大会。2011年9月21-23日。旭川市。

Kawasaki, T., Sakai, N. Establishment of long-term culture condition for zebrafish spermatogonial stem cells. 45th Annual Meeting of the Society of the Study of Reproduction. 2012年8月12-15日. State College, USA.

河崎敏広、酒井則良。ゼブラフィッシュ精原幹細胞培養系を用いた遺伝子改変動物作製法の開発。日本動物学会第84回大会。2013年9月26-28日。岡山市。

Kawasaki, T., Sakai, N. Maintenance and amplification of testicular tumors by subcutaneous grafting in zebrafish. World Congress of Reproductive Biology. 2014年9月2-4日. Edinburgh, UK.

〔図書〕(計 1件)

酒井則良。遺伝学の謎 第19章生殖系幹細胞の謎。悠書館 2014, 200 (189-200)。

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：魚体内での他家組織の継代維持法
発明者：酒井則良、河崎敏広
権利者：大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
種類：特許
番号：特願 2014-163587
出願年月日：平成 26 年 8 月 11 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/FishDev/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井則良 (Sakai, Noriyoshi)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・准教授

研究者番号：50202081