

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660239

研究課題名(和文)小規模施設でも遺伝子組換えヤギを作出できる精巢媒介性核移植法の開発

研究課題名(英文)Testis mediated gene transfer that a small laboratory can do the genetic modification in goat

研究代表者

高須 正規 (Tasaki, Masaki)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：00503327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は小規模施設でも遺伝子改変ヤギを作製することを可能とする精巢媒介性核移植法の開発を目的とした。

本研究では、3つのこと、すなわち、ヤギにおける精巢細胞の分離ならびに短期培養を確立したこと、精巢幹細胞へのトランスフェクションが極めて困難なこと、精巢への改変細胞移植法の基礎的知見が明らかになった、が明らかになった。これらを考慮し、研究を進めることでヤギにおける精巢媒介性核移植法が確立できる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop testis-mediated gene transfer that a small laboratory can do the genetic modification in goat.

In this study, we clarified 3 important fact: we developed isolation and short term culture of the testicular cells, DNA transfection into testicular cells is very difficult, and we obtained basic information about the cell transplantation technique into intact testis. Consequently, we found that the testis-mediated gene transfer in goat will be established when we keep researching on these.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：バイオリアクターヤギ 遺伝子改変

1. 研究開始当初の背景

ヤギの遺伝子改変は有用産物を乳中に分泌させる動物工場を目的に世界中で行われている。実際、遺伝子組換えヤギによって生産されたアンチトロンビンが FDA によって医薬品として承認される等、すでに実用段階に入っている。

ES 細胞の存在しない反芻家畜の遺伝子改変は、体細胞に目的とする遺伝子を導入し、除核した卵子と改変細胞を融合させる体細胞核移植法で行われている。しかし、これを実施するためには、高額な機器と飼育施設、導入遺伝子コンストラクトの作製、体細胞への遺伝子導入、体細胞核移植、クローン胚の移植、特殊動物の管理といった一連の作業を遂行できる施設ならびに人材が必要であるため、国もしくは州の重点課題として行われている。

このように、遺伝子改変ヤギのもつポテンシャルは高い。しかし、ヤギにおける遺伝子改変がげっ歯類のように比較的容易に行えるとは言い難く、上記制約が当該分野の学術的、産業的発展を妨げている。

2010 年にブタのトランスジェニックを行っているドイツミュンヘン大学へ留学した折、その有用性と発展性を強く感じ、帰国後、学んだ技術を基に、動物工場構想のため、体細胞核移植法で GFP 遺伝子改変ヤギの作製を試みた。体細胞核移植法で改変動物の作製はノウハウさえあれば実施可能ではあるものの、ハードだけでなくソフト面でも大掛かりな体制で挑まねばならないことを改めて実感し、遺伝子改変ヤギの各種実験への利用を改変マウス並みに普及させるためには、小規模施設でも改変ヤギの作製が可能な方法を開発する必要があると考えた。

2. 研究の目的

上記問題を打破するために、マウスで 10% の割合で組換え産子が得られることが知られている精巣媒介性核移植法をヤギで確立し、小規模施設でも実施可能なヤギ組換え法の開発を目指す。

精巣媒介性核移植法は精巣に直接注入するという極めて簡便な遺伝子組換え方法である。また、ここで得られたノウハウを他の家畜にも応用できる可能性が高いため、本法が汎用性の高い簡便な改変技術となる可能性が高い。

これまで限られた大規模施設でしかできなかった家畜の遺伝改変を教員 1 名ないし 2 名と学生で構成されている獣医畜産系研究室、都道府県の畜産研究所、ベンチャー企業で可能になることによって、

遺伝子組換え家畜が身近なものとなり、ヒトやげっ歯類とは生理学的に大きく異なる反芻動物の研究がさらに進むなど、各種動物特有の生理を明らかにし、広く学術に貢献できる。さらに、本研究が達成されれば、高付加価値畜産物の生産など、新たな畜産業の創出が可能になる。

3. 研究の方法

(1) 精巣へのプラスミドの直接注入
まず、3 頭の雄ヤギを用いて、直接プラスミドをヤギの精巣網へ注入した。超音波診断装置でガイドしながら、微量点滴器を用いて 1 ml/1 sec で注入した。

注入から一定期間を空けた後、電気射精法で精液を採取し、GFP 遺伝子の有無を確認した。

しかし、精液中には GFP 陽性精子が認められなかったため、去勢にて精巣を摘出し、組織学的に遺伝子導入細胞の有無を確認した。

(2) 巣細胞の分離ならびに培養

ヤギ牧場から子ヤギ 5 頭を購入し、去勢法にて精巣を採取した。この精巣を酵素処理し、細胞をバラバラにした。一部の細胞は定法に従って -80 で保存し、その後の実験に用いた。

まず、分離直後の精巣細胞中にどれくらいの未分化性を保った細胞が存在するのかを明らかにするために、アルカリフォスファターゼならびに OCT, PLZF などの未分化マーカーで染色した。

また、精巣細胞は温度に対してシビアな条件を示すことが知られているので、31、35、37 で培養し、未分化性保持の有無を確認した。

さらに、ES や iPS などの未分化細胞の培養に用いられている StemPro に KCR を添加して、1 週間培養した。

(3) 精巣細胞への遺伝子導入

ヤギの精巣から分離した細胞へ遺伝子を導入するために、さまざまな方法を試みた。

エレクトロポレーション

さまざまなパルス条件を設定し、バラバラにした精巣細胞へ遺伝子導入を試みた。

リポフェクション

Liopfectamin 2000 ならびに 3000 などといった試薬、DNA 濃度など、様々な条件を振って遺伝子導入を試みた。

(4) 放射線照射によるインタクトな精巣細胞の破壊

精巣細胞をインタクトな細胞に移植すると、もともとあった細胞と外来細胞が

競合することから、効率よく移植細胞が定着しない。このため、通常、プスルファンや放射線照射によって移植する精巢内の細胞を破壊する必要がある。

異なる線量における精巢細胞の破壊
アダルト個体に対して、6Gy と 12Gy を照射した。通常、6 週間後には照射による影響がなくなると言われているため、照射から 6 週後に精巢を摘出し、精巢構造を組織学的に考察した。

まず、HE 染色を行い、全体構造を確認した。次に、免疫染色にて、未分化細胞の存在を確認した。

(5) 来細胞の精巢への注入

超音波診断装置を用いて、外来細胞を精巢へ注入する方法を検討した。

4. 研究成果

本研究では、3 つのこと、1) ヤギにおける精巢細胞の分離、31 ならば短期的に精巢幹細胞を培養できること、しかし、2) 様々な条件でエレクトロポレーション、リポフェクションを行っても、精巢幹細胞へのトランスフェクションは極めて困難なこと、3) 精巢への細胞移植法の確立が可能となった。

これらを考慮し、研究を進めることでヤギにおける精巢媒介性核移植法が確立できる可能性が考えられた。

(1) 精巢へのプラスミドの直接注入

直接、外来遺伝子を精巢に注入したものの、遺伝子は確認できなかった。

このため、2 つある精巢の内、1 つを摘出、分離し、in vitro で遺伝子改変を行った後、インタクトな精巢へ注入する方法に切り替えた。

そこで、まず、短期的な精巢幹細胞の培養法を検討した。次に、分離細胞への遺伝子導入を試みた。さらに、精巢への細胞移植法、すなわち、外来の精巢細胞を超音波ガイド下で生体精巢に注入する方法の確立を行った。

(2) ヤギの精巢幹細胞の分離、培養

ヤギの精巢幹細胞は、31、35、37 いずれにおいても活発な増殖は見られなかった。

ただし、37 では明らかに未分化性を失っており、分化が進んでいたものの、31 ではいずれも未分化性を保持した状態で細胞が存在していた。これらのことから、さらなる改良が必要ではあるものの、ヤギの精巢細胞は低温で培養する必要が考えられた。

(3) 精巢細胞への遺伝子導入

ヤギの分離細胞へ外来遺伝子を導入する方法を試みた。様々な条件でエレクトロポレーションならびにリポフェクションをおこなったものの、高率な遺伝子導入は不可能であった。

(4) 放射線照射によるインタクトな精巢細胞の破壊

放射線照射後、6 週間で精巢を組織学的に観察したところ、いずれの線量においても、立体構造が保たれてはいるものの、未分化な細胞が消失していた。

このことから、放射線照射によって、インタクトな精巢細胞を破壊できることが明らかになった。

(5) 外来細胞の精巢への注入

これまで、プラスミド溶液を注入していた方法で、精巢細胞の精巢網への注入を試みた。その結果、外来細胞が存在し、超音波ガイドで 1ml/sec ならば、障害なく精巢を定着させられる可能性が考えられた。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕ホームページ等

本研究に関する事項を掲載した。
<http://www1.gifu-u.ac.jp/~thrgnol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須 正規 (TAKASU, Masaki)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：00503327

(2) 研究分担者

高島 康弘 (TAKASHIMA, Yasuhiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

(3) 連携研究者

なし