

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20116003

研究課題名(和文) 培養系を用いたショウジョウバエGSC/ニッチ・システムの解明と分化系の開発

研究課題名(英文) Reconstruction of Drosophila GSC/niche system in vitro and analysis of GSC differentiation

研究代表者

仁木 雄三(NIKI, YUZO)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：00134164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 68,600,000円、(間接経費) 20,580,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエのGSC/ニッチ・システムをin vitroで再構築した。雌雄のニッチ細胞の安定的な細胞株を作成し、雌雄のニッチ細胞由来の細胞株で発現する遺伝子群と発現量をマイクロアレイにより解析し、生殖幹細胞の未分化維持・分裂に關与するキャップ細胞やハブ細胞で特異的に高発現する遺伝子群が存在することがわかった。またインスリン遺伝子など従来ニッチ細胞では発現していないと思われていた遺伝子も発現し、GSCの維持に機能していることが示唆された。GSCとニッチ細胞株を共培養し、成長因子の定量的な機能的解析を行った。さらに、GSCとニッチ細胞を共培養し、GSCの分化や脱分化を誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in the reconstitution of GSC/niche system in Drosophila. We established stable cell lines originated from female and male niche cells (cap cells and escort cells in female, and hub and cyst cells in male). Using these cell lines, we identified highly expressed genes in each cell line and found that there are many unique genes specifically expressed in each niche cell line. Furthermore, we found that Drosophila insulin-like genes are also expressed in the niche cells. We constructed co-culture system of GSCs and niche cells and analyzed roles of growth factors. Furthermore, we succeeded in artificial induction of the differentiation and dedifferentiation of GSCs by coculturing with niche cells.

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：ショウジョウバエ 生殖幹細胞 細胞培養 ニッチ 再構築 分化

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の成体の組織において、生涯を通じて、血液、皮膚、生殖細胞などが継続的に生産され続けているのは、それぞれに自己再生能と分化能を持つ未分化な幹細胞が存在しているためである。これらの幹細胞はニッチと呼ばれる特別な微小空間で維持されていることが明らかになりつつある。ショウジョウバエの生殖幹細胞 (GSC) とニッチ細胞は、雌雄ともに形態的に容易に同定できるため、GSC/ニッチ・システムの最も優れたモデル系として知られている。現在までに、個体 (in vivo) を用いた遺伝学的手法と分子生物学的手法を駆使して、GSC の維持に関する分泌因子およびシグナル伝達経路、GSC とニッチ細胞間の細胞接着等が明らかにされてきた。しかし、GSC/ニッチ・システムは、卵巣や精巣の先端部の極めて限られた空間に存在するため、種々の分泌因子の機能に関する定量的な解析や、周囲の体細胞の影響を排除してニッチ細胞の機能を解析することが困難であった。

これらの問題にアプローチするには、ほ乳類で盛んに開発が進められてきている in vitro 系の構築が、ショウジョウバエで必要不可欠であるが、1980 代以降ほとんど進展していない。例えば、初期胚由来の初代培養では、大量の胚を採取する必要があり、培養化された細胞を同定することが難しく、その後の解析も困難である。当研究室では、これまでに GSC の細胞株の樹立に成功している。その後、細胞培養技術を改良し、100 細胞以下の少数の細胞からも、細胞株を樹立する方法、「微少細胞培養法」を考案した。この微少細胞培養法により、単一胚から予定生殖巣形成域や単一幼虫の生殖巣からニッチ細胞など特定の細胞由来の細胞株を樹立することが可能になってきた。そのため種々の改変遺伝子 (トランスジーン) をもつ個体からも容易に、かつ効率的に細胞株が作成できる可能性が生じ、GSC/ニッチ・システムの研究に飛躍的な発展をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

(1) GSC/ニッチ・システムの in vitro での再構成：種々の改変遺伝子をもつ系統の GSC やニッチ細胞等を組み合わせ、GSC/ニッチ・システムを in vitro で再構成する系を確立する。この系を用いて、GSC の細胞分裂時の詳細な挙動を明らかにする。また、GSC とニッチ細胞の機能性差、GSC 分化に関わるニッチ細胞以外の体細胞の役割についても明らかにする。

(2) in vitro 再構成を用いたニッチの場の機能解析：ニッチの場における分泌因子や細胞外マトリックス等の役割を GSC/ニッチ・システムの in vitro 再構成系で明らかにする。特に、in vivo での解析から GSC 維持に関わることが明らかとなっている分泌因子の機

能を定量的に明らかにする。

(3) ニッチ細胞で発現する遺伝子の機能解析：GSC/ニッチ・システムの in vitro 再構成系により、ニッチ細胞で発現しているが、in vivo では機能解析が困難な遺伝子 (他の体細胞でも機能を持ち、突然変異により致死となるもの等) のニッチ細胞における機能を明らかにする。

(4) GSC 形成に関わる遺伝子の探索と機能解析：始原生殖細胞 (PGC) とニッチ細胞の組み合わせにより、GSC/ニッチ・システム再構成系を樹立し、この系において、PGC から GSC が形成される過程に関わる遺伝子を特定する。

(5) 遺伝子改変個体の作成技術開発：GSC/ニッチ・システムの再構成系により長期的に培養している GSC より配偶子を得る技術を開発する。また、GSC の遺伝子ターゲティングを行う技術も開発し、両者を組み合わせ、遺伝子改変個体を作成する。

3. 研究の方法

(1) ニッチ細胞の細胞株の樹立：GSC の分裂や分化を制御する GSC/ニッチを in vitro で再構築するためには、成虫の体細胞性幹細胞やニッチ細胞の細胞株を樹立する必要がある。メスのニッチ細胞であるキャップ細胞やエスコート細胞を識別できる Gal4 系統を用い卵巣小管の前端部だけを培養し、安定的な培養株を作成する。また、キャップ細胞は成虫では分裂しないためニ幼虫期の卵巣からキャップ細胞由来の細胞株を樹立する。同様にオスのハブ細胞およびシスト幹細胞由来の細胞株を樹立する。

(2) それぞれの細胞株で発現する遺伝子群の発現パターンの解析：得られた安定的な細胞株から mRNA を抽出し、マイクロアレイにより、ニッチ細胞で特異的に発現する遺伝子群を同定するとともに発現量の定量的な解析を行う。さらに、雌雄のニッチ細胞共通に発現量の高い 'ニッチ遺伝子群' をリストアップする。

(3) 上記のマイクロアレイの結果から、実際に、生殖巣や培養細胞でこれらの遺伝子が発現しているかどうかを明らかにするため in situ hybridization 法や抗体を用いた間接抗体法により調べる。また、幼虫および成虫の生殖巣での発現パターンを調べ、GSC/ニッチ・システムの成立過程でのこれらの遺伝子の発現パターンの推移も明らかにする。

(4) 純化したニッチ細胞と GSC を共培養し、GSC が維持・分裂されるかどうか、また、特定の成長因子やその阻害剤を添加することにより、GSC の挙動の変化を調べる。

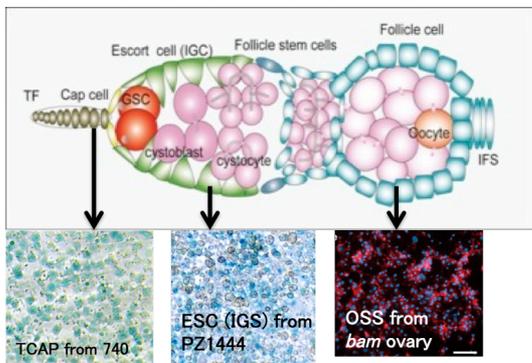
(5) ニッチ細胞と GSC との細胞間相互作用：特にニッチ細胞がどのように GSC を認識するのかをタイムラプスにより、詳細に調べるとともに、各種阻害剤による効果を調べる。

(6) ニッチ遺伝子の機能的や役割を明らかにするため Gal4/UAS システムにより、組織特異的な Gal4 driver と UAS-gene RNAi により転写阻害実験を行い、配偶子形成への影響を調べる。

4. 研究成果

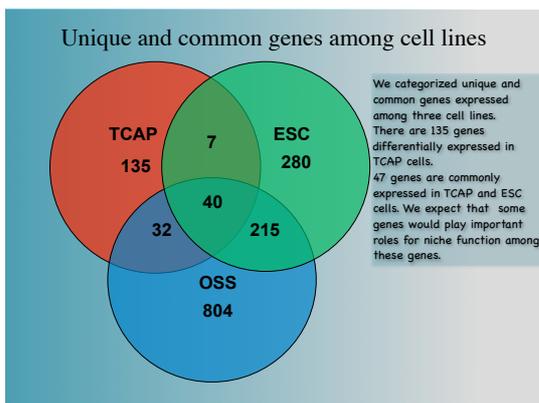
(1) ニッチ細胞由来の細胞株の樹立：雌雄ともに GSC/ニッチを構成するすべての細胞種から細胞株の樹立に成功した。図はメスの卵巣小管の模式図と樹立してキャップ細胞、エスコート細胞および濾胞幹細胞由来の細胞株を示している。

樹立した安定的なニッチ由来の細胞株



いずれの細胞株も細胞の増殖能は非常に高く、培養条件にもよるが通常、10 数時間程度で倍加する。また、扁平で接着性が高く、哺乳類の上皮性の細胞と似ている。細胞同士は非常に密に接触しあう。微速度撮影で細胞を連続的に観察すると細胞密度が低いときは盛んに細胞質突起を出しながら移動している。

(2) ニッチ細胞株で発現する遺伝子群の同定：各細胞株から mRNA を抽出し、マイクロアレイによるニッチ細胞で発現する遺伝子群の同定に成功した。そして、それぞれの細胞株間で、発現する遺伝子群を類別した (下図)。

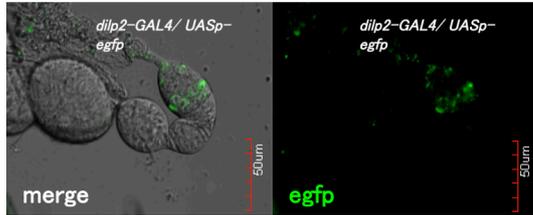
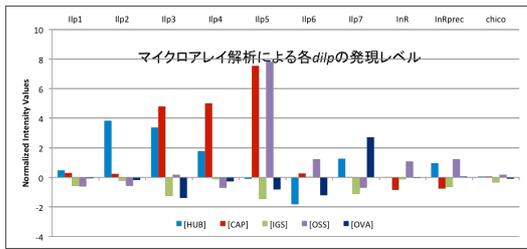


その結果、それぞれの細胞で特異的に発現する遺伝子群と全ての体細胞で共通に発現している遺伝子群が存在していることが分かった。例えば、キャップ細胞由来の TCAP 細胞株で特異的に発現している遺伝子数は 135 個あり、エスコート細胞由来の ESC 細胞株で特異的に発現している遺伝子数は 280 個ある。オスのハブ由来の細胞株 HUB とシスト幹細胞由来の CYST 細胞株でも同様に発現している遺伝子群をマイクロアレイにより明らかにした。そして、HUB 細胞株と TCAP 細胞株でも高発現している遺伝子群は 30 前後であることがわかった。おそらく、これらの遺伝子の内、いくつかは GSC の維持・分裂に重要な役割を果たしていることが予想される。現在、これらの遺伝子群の機能を明らかにするために、Gal4/UAS システムにより、RNAi 転写阻害実験により、GSC の維持や分裂に影響があるかどうかを検討している。

(3) GSC の維持・分裂に関与する成長因子の役割：GSC の維持・分裂には Dpp が腫瘍な役割を果たしていることが報告されている。しかし、Dpp が維持・分裂の両方に機能しているかどうか明確ではない。そこで、GSC と TCAP 細胞を共培養し、Dpp のホモログである BMP4 を培地に添加して、その効果を調べた。その結果、pMAD の活性でアッセイした結果、Dpp シグナル伝達をする GSC の頻度は大幅に高まるが、分裂頻度は高くないことが分かった。また、Dpp シグナル伝達の阻害因子を添加すると Dpp シグナル伝達の頻度は低下するが、GSC の分裂は阻害されなかった。これらの結果から、Dpp は GSC の未分化維持因子であり、分裂促進因子では無いことを明らかにした。この共培養系を用いることにより、その他の成長因子の役割を定量的に調べることが可能となり、今後の成長因子やシグナル伝達の研究に非常に有効な手段となることが期待される。

(4) ニッチ細胞で発現するインスリン遺伝子：インスリンは進化的に保存されたペプチドホルモン的一种で、恒常性の維持など様々な生命現象に重要な役割を果たしていることが知られている。ショウジョウバエのインスリン様遺伝子は *Drosophila insulin-like protein (DilP)* と呼ばれ、1-8 の 8 種類がある。最近になり、GSC の維持や分裂にも重要な役割を果たしていることが示唆されている。インスリンは、成体の脳細胞で作られ、血流により、体内の組織に供給されていると考えられている。しかし、我々のマイクロアレイの結果、ニッチ細胞で、インスリン遺伝子が高発現しているという結果が得られた。

本当にニッチ細胞で DilP が発現しているかどうかを明らかにするため、dip-Gal4/UAS-egfp で卵巣小管を観察すると明らかにニッチ細胞で GFP のシグナルが見ら



れた。

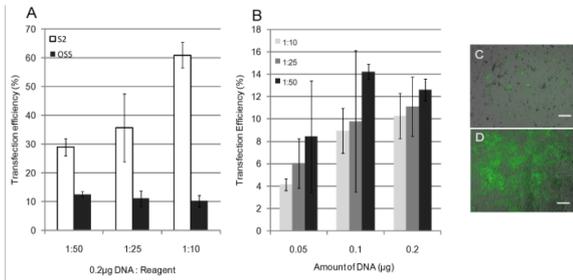
また、in situ hybridization 法により、ニッチ細胞株でそれぞれの Dilp 遺伝子の発現パターンも調べた。これらの結果は、インスリンが脳から供給されるという従来の考え方を大きく変える可能性がある。GSC の維持や分裂には、脳よりも GSC に直接接しているニッチ細胞からのインスリンがより重要ではないかと考え、それぞれにインスリン遺伝子を Gal4/UAS システムにより、RNAi 転写阻害実験により、明らかにしつつある。

(5) in vitro での分化・脱分化誘導：エスコート細胞やシスト細胞は、GSC の娘細胞であるシストプラストや精原細胞の分化過程に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、ESC 細胞と GSC を共培養し、分化遺伝子である bam 遺伝子を強制発現して、果たして GSC が分化するかどうかを調べた。その結果、TCAP 細胞と共培養した場合に比べ、4 シストや 8 シストに移行する GSC の割合が大幅に増加した。つまり、in vitro でシストプラスト特有の不完全分裂を誘導することに成功した。さらに、興味深いことにエスコート細胞とオスの GSC を共培養した場合でもオスの GSC は 4 シストや 8 シストに移行した。この結果は、エスコート細胞は雌雄を問わず、GSC の分化を誘導することがわかった。

一方、オスの GSC を含む細胞株では、GSC が未分化の状態ですべて自己再生的な分裂と分化過程の特徴である不完全分裂を繰り返すことがタイムラプスによる画像解析で明らかになった。そして、興味深いことにこれら分化過程にある 4 シストや 8 シストの精原細胞が脱分化し、再び GSC になっていく現象も発見した。つまり、in vitro で分化・脱分化を繰り返しているのである。このような柔軟な分化・脱分化の可変現象は、マウスでは知られていたが、ショウジョウバエでは始めてに知見である。

(6) 培養細胞への遺伝子導入と RNAi による転写抑制阻害法：現在までにショウジョウバエ培養細胞への遺伝子導入法は、哺乳類の培養

細胞に比べ、未開発であり、安定的で高頻度の導入法は知られていない。我々は piggyBac ベクターを改変し、heat-shock プロモータと GFP 遺伝子を組み込んだベクターを作成し、種々の遺伝子導入キットを用い様々な条件で遺伝子導入を試みた。その結果、非常に高頻度で遺伝子を導入する方法を開発した。



さらに siRNA を用い、ノックダウン法も開発した。これらの手法を用いることにより、今後、任意の遺伝子の導入や発現抑制実験が in vitro でも可能になっていくだろう。

(7) 遺伝子改変個体の作成技術開発：長期的に培養した GSC が本来の機能を保持しているかどうかを証明するためには、細胞移植法により、適当な宿主に戻して、調べる必要がある。しかし、ショウジョウバエ培養細胞への移植法は開発されていない。そこで、fGS/OSS 細胞株を用い、初期胚の胚盤葉期の卵後極あるいは予定生殖巣形成域が形成されるステージ 11 の胚背部に移植して、fGS 細胞が生殖巣に入り、in vivo で分裂するかどうか、また分化遺伝子である bam を強制発現して、卵母細胞へ分化するかどうかを調べた。その結果、fGS 細胞は成体の卵巣内の bam GSC とほぼ等しい割合で、成体の卵巣に生着し、卵母細胞へ分化することがわかった。つまり、正常な分化能は、長期的に培養し続けても失われていないことが証明できた。今後は、正常に子孫を形成できるかどうかを検討する必要がある。

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 3 件)

① Hiroshi Uetake, Kenji Oka, and Yuzo Niki (2011) Stable transformation and cloning mediated by piggyBac vector and RNA interference knockdown of Drosophila ovarian cell line. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal 47, 689-694. 査読あり

② Sato, T., Ogata, J. and Niki, Y. (2010) BMP and Hh signaling affects primordial germ cell division in Drosophila. Zoological Science 27, 804-810. 査読あり

③ Nelson C. Lau, Nicolas Robine, Raquel Martin, Wei-Jen Chung, Yuzo Niki, Eugene Berezikov and Eric C. Lai (2009) Abundant primary piRNAs, endo-siRNAs and microRNAs in a Drosophila ovary cell line. Genome Research 19, 1776-1785. 査読あり

[学会発表] (計 20 件)

① Yuzo Niki, T. Sato, H. Uetake, H. Watanabe and Y. Iizumi (2012) Cellular and molecular analyses of a stable Drosophila germline stem cell niche reconstructed in vitro. The 58th/60th NIBB Conference -Germline -Specification, Sex, and Stem Cells- (Okazaki) 7 月 17-21 日 Okazaki Conference Center

② Yuzo Niki, T. Sato and Y. Iizumi (2012) in vitro analyses of cellular interactions among germline stem cells, cap cells and escort cells in Drosophila. The 53rd Annual Drosophila Research Conference (Chicago USA) 3 月 8-12 日 Sheraton Chicago Hotel & Towers

③ Jun Ogata, Satoshi Sonehara, Tomohiro Yokokura, and Yuzo Niki (2011) Ecdysone signaling during spermatogenesis in Drosophila. The 34th Annual Meeting of the MBSJ (Yokohama) 12 月 13 日 パシフィコ横浜

④ Ouchi Toshihiro, Shuichi Endo, and Yuzo Niki (2011) in vitro analyses of male germline stem cells and their niche cells in Drosophila. The 34th Annual Meeting of the MBSJ (Yokohama) 12 月 13 日 パシフィコ横浜

⑤ Hidenori Watanabe, Hiroshi Uetake, and Yuzo Niki (2011) Microarray Gene Expression Profiling of Germline Stem Cell Niche and Ovarian Somatic Cells in Drosophila melanogaster. The 34th Annual Meeting of the MBSJ (Yokohama) 12 月 13 日 パシフィコ横浜

⑥ Takuya Sato and Yuzo Niki (2011) Reconstruction of a stable Drosophila germline stem cell niche in vitro. The 1st Cold Spring Harbor Asia conference on Developmental Biology (Suzhou, China) 10 月 11-15 日 Suzhou Dushu Lake Conference Center

⑦ 緒方洵・曾根原 哲・横倉友博・仁木雄三 (2011) ショウジョウバエ精子形成におけるエクジソンシグナル伝達. 第 47 回節足動物発生学会大会 6 月 10-11 日 琵琶湖リゾートクラブ

⑧ 大内寿洋・遠藤秋一・仁木雄三 (2011) ショウジョウバエ精子幹細胞およびニッチ細胞の培養. 第 47 回節足動物発生学会大会 6 月 10-11 日 琵琶湖リゾートクラブ

⑨ 渡辺秀教・植竹 裕・仁木雄三 (2011) ショウジョウバエの卵巣由来培養細胞を用いた網羅的ニッチ遺伝子解析. 第 47 回節足動物発生学会大会 6 月 10-11 日 琵琶湖リゾートクラブ

⑩ Hidenori Watanabe, Hiroshi Uetake and Yuzo Niki (2011) Gene Characterization of Germline Stem Cell Niche and Ovarian Somatic Stem Cells in Drosophila melanogaster. (2011) 第 44 回日本発生生物学会 (沖縄) 5 月 18 日

⑪ Hiroshi Uetake and Yuzo Niki (2010) Genetic manipulation and cloning of culture cells derived from ovarian somatic stem cells in Drosophila. 第 43 回日本発生生物学会 (京都) 6 月 20 日 京都・国立京都国際会館

⑫ Jun Ogata, Tomohiro Yokokura, Yuzo Niki (2010) Role of 20-hydroxyecdysone during spermatogenesis in Drosophila. 第 43 回日本発生生物学会 (京都) 6 月 20 日 京都・国立京都国際会館

⑬ Yusuke Iizumi and Yuzo Niki (2010) Initiation of oogenesis in Drosophila in vitro. 第 43 回日本発生生物学会 (京都) 6 月 20 日 京都・国立京都国際会館

⑭ 仁木雄三 (2009) ショウジョウバエ GSC/ニッチ・システムの in vitro 系の構築. 第 80 回日本動物学会 (静岡) 9 月 17 日 静岡県静岡市静岡グランシップ

⑮ 佐藤卓也・仁木雄三 (2009) ショウジョウバエの始原生殖細胞の分裂に関与する成長因子. 第 45 回日本節足動物発生学会大会 (大洗) 6 月 6 日 茨城県那珂湊市ホテルニュー白亜紀

⑯ 植竹裕・仁木雄三 (2009) ショウジョウバエ卵巣由来の体細胞幹細胞株へ遺伝子導入法の開発. 第 45 回日本節足動物発生学会大会 (大洗) 6 月 6 日 茨城県那珂湊市ホテルニュー白亜紀

⑰ Hiroshi Uetake and Yuzo Niki (2009) Genetic manipulation of cultured somatic and germline stem cells in Drosophila. 第 42 回日本発生生物学会 (新潟) 5 月 28 日 新潟県新潟市朱鷺メッセ

⑱ Takenori Arai and Yuzo Niki (2009)

Pole cells of *Drosophila* in culture. 第42回日本発生生物学会（新潟）5月28日 新潟県新潟市朱鷺メッセ

⑱ Jun Ogata and Yuzo Niki (2009) Live imaging of cellular interactions with primordial germ cells and gonadal soma. 第42回日本発生生物学会（新潟）5月28日 新潟県新潟市朱鷺メッセ

⑳ Yusuke Iizumi, Takafumi Yamaguchi, Ding Xiao Dong and Yuzo Niki (2009) Developmental analysis of the number of incomplete cytokinesis and its effect on the formation of egg chamber of *Drosophila*. 第42回日本発生生物学会（新潟）5月28日 新潟県新潟市朱鷺メッセ

〔図書〕（計 5 件）

① Yuzo Niki, Takuya Sato, Takashi Yamaguchi, Ayaka Saisho, Hiroshi Uetake and Hidenori Watanabe (2014) *Drosophila* Germline Stem Cells for In Vitro Analyses of PIWI-mediated RNAi. in "PIWI-interacting RNAs" M. C. Siomi, (Ed): Methods and Protocols the Methods in Molecular Biology Vol. 1093, 13-23. Humana Press

② 仁木雄三 (2010) ショウジョウバエ配偶子幹細胞/ニッチの試験管内での再構築と分化誘導 細胞工学 27, 680-681 (学研メディカル秀潤社)

③ 仁木雄三 (2010) 配偶子幹細胞の細胞株化の紆余曲折 細胞工学 27, 675-679 (学研メディカル秀潤社)

④ Y. Niki (2009) Culturing Ovarian Somatic and Germline Stem Cells of *Drosophila*. Current Protocols in Stem Cell Biology 10, 2E.1.1-2E.1.9. John Wiley & Sons Inc.

⑤ Y. Niki (2008) in vitro approach of germline stem cells in fly and mouse In "Stem Cell Applications in Disease and Health" (Eds. W.B. Burnside et al.) 127-149. Nova Science Publishers, Inc. New York

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

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）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://niki.sci.ibaraki.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
仁木 雄三 (NIKI YUZO)
茨城大学・理学部・教授
研究者番号：00134164

(2) 研究分担者
なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()
研究者番号：