

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14571

研究課題名(和文) マウス卵巣における細胞種特異的なin vitro遺伝子機能解析システムの開発

研究課題名(英文) Development of cell type-specific in vitro gene function analysis system in mouse ovary

研究代表者

佐々木 恵亮(SASAKI, Keisuke)

東京農業大学・生命科学部・研究員

研究者番号：10737159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス卵巣において細胞種毎の遺伝子機能を解析する研究ツールを開発することを目的に、改変型レンチウイルスベクターを用いた卵特異的な遺伝子導入法の確立を試みた。研究助成事業中に卵だけに特化した遺伝子導入はならなかったものの、その原因をいくつかに絞り込むことができた。また、新生仔マウス卵巣の細胞を分散した後改変型レンチウイルスにより遺伝子導入を行い、そこから体外で卵巣を再構成する卵巣再構築培養法を確立した。さらに、新生仔由来の卵巣より分取した卵母細胞にウイルス感染処理を施し、別個体より分取した未感染の卵巣体細胞とともに再構築卵巣を形成させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、レンチウイルスを改変することで少なくとも卵巣細胞に対する感染性が変化することがわかった。これを利用して今後細胞種特異的な遺伝子導入法を確立できる可能性がある。また、新生仔マウス由来の卵母細胞と体細胞をそれぞれ別個体から分取し、それらから体外で卵巣を再構成する卵巣再構築培養法を確立できた。今後この培養法を改変して卵母細胞のみ、あるいは、卵巣体細胞のみに遺伝子導入を行い、正常な卵形成を支持できない疾患モデルマウス等のレスキュー法として応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop a research tool to analyze the cell type-specific gene function in mouse ovary, an attempt to establish an oocyte-specific gene delivery system using modified lentiviral vector was subjected. Although this tool has not been completely established so far, the causes of the failure were narrowed down in several points. Moreover, reconstituted ovarian culture system has been established. Dispersed ovarian cells from newborn mice were transduced to modified lentivirus, and were aggregated to form reconstituted ovary in vitro. This method was able to apply for ovarian reconstitution by transduced non-growing oocytes and non-transduced ovarian somatic cells.

研究分野：生殖生物学

キーワード：レンチウイルスベクター 遺伝子導入 卵巣 卵母細胞 顆粒層細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代を生み出すことのできる唯一の細胞である。産仔へと至る機能的な卵の形成過程では様々な生命現象が起こり、このいずれもが正常な卵形成に必須であるにもかかわらず、その機構には不明な点が多く残されている。卵巣は卵母細胞をはじめとし、体細胞である顆粒層細胞、莖膜細胞等によって構成され、正常な卵形成には卵母細胞と体細胞の相互制御による卵胞の形成・発達が不可欠である。卵巣機能に関与する遺伝子解析の場では主にノックアウトマウスを用いられているが、卵形成過程における細胞種毎の遺伝子機能を体外で迅速に解析するのは困難であった。これまでに、始原生殖細胞を含む胎仔期のマウス雌性生殖巣を体外で約4週間培養し、産仔へと至る機能的な卵子を得ることができている(Morohaku et al., 2016 Proc Natl Acad Sci USA)。この体外卵作出系は複雑な卵形成過程の体外での再現を可能にしたため、卵形成機構を体外で迅速に解析するための基盤が整備された。

一方で、マウス雌性生殖細胞への遺伝子導入は汎用的に実用化された手法が確立されておらず、既存の様々な方法は効率的、あるいは、技術的な問題を抱えていた。この問題を解決するため、レンチウイルス(LV)ベクターを用いた手法を模索してきた。LVベクターは発生工学研究においても有効な技術であるが、受精前の卵母細胞への実施例は存在しなかった(Okada et al., 2007 Nat Biotech)。研究代表者の先行研究によって、LVベクターは新生仔マウス由来の卵母細胞、間質系の細胞等に対して感染することがわかった。しかしながら、卵巣は多様な細胞種により構成されるため、卵形成を支持する遺伝子の細胞種毎の機能を解析することはできていなかった。

## 2. 研究の目的

上記のような研究背景から、卵巣において細胞種特異的に遺伝子機能を解析できるツールが存在すれば、生殖細胞研究は一層発展すると期待される。LVはウイルスの外殻であるエンベロープの構造によって感染生物種や細胞種が制御されるため、「エンベロープを改変することで卵巣における特定の細胞種にのみ感染するLVを開発できないか?」と考えた。LVの細胞種特異的感染性をコントロールできれば、体外卵作出系と組み合わせることで卵形成過程を可視化しつつ細胞種毎の遺伝子機能が解析できる非常に強力なツールとなり得る。したがって、本研究では『マウス卵巣における細胞種特異的な遺伝子導入システムを用いた新規技術の開発』を目的とし、とくに卵母細胞に焦点を当てた解析を進めてきた。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス卵巣の再構築培養法の確立

新生仔マウス由来の卵巣をコラゲナーゼおよびトリプシン-EDTAで処理することで細胞を分散し、血清やサプリメント等の細胞凝集培養の条件を検討した。さらに、Transwell-COLインサートメンブレンを用いた気層液相境界培養による従来の体外卵作出系を改変し、再構築卵巣に適した培養システムの検討を行った。

### 2) LVベクターによる卵母細胞特異的な遺伝子導入

LVの作製では通常293T細胞にLVベクターおよび複数のLV構成因子発現ベクターをトランスフェクションし、培養上清よりウイルス粒子を回収する。本研究では、リガンド-レセプターの関係を利用し、LVを特定の細胞種にリクルートさせた。卵巣において卵母細胞特異的に発現する膜受容体c-KITに対するリガンドSCFをLV外殻であるエンベロープに付随させることで、この改変型ウイルスはc-KITにリクルートされ卵母細胞に優先的に感染する。作製する各種SCF-LVの作製には上記のプラスミドDNAに加えて膜貫通型のSCF発現ベクターも遺伝子導入し、これによってウイルスエンベロープ上にパントロピックな感染力を有するVSV-G(G-LV)、あるいは、SCFを付随させたLV(SCF-LV)を得た。作製したLVのウイルスゲノムにはサイレンシングの影響を受けにくい*EFla*、卵母細胞で活性を持つ*Kit*および*Stella*プロモーターによってレポーター遺伝子GFP、あるいは、mCherryを発現するカセットを組み込み、それらの蛍光によって細胞種特異性を検証した。

本研究では分散した卵巣全細胞に対して種々のLVを感染させ、その後卵巣再構築培養法に移行することで遺伝子導入の成否をレポーター遺伝子の発現により判断した。

## 4. 研究成果

### 1) マウス卵巣の再構築培養法の確立

マウス卵巣に直接的なウイルスベクターの感染を行う場合、卵巣髄質側へのウイルス感染は皮質側に比較的起こりにくいことがわかっており、卵巣細胞に広くウイルス感染を試みるためには卵巣を一度完全に細胞分散する必要がある。そのため、単一細胞レベルにまで分散した卵巣を試験管内で再構成した再構築卵巣の形成、並びに、再構築卵巣用いた体外卵作出系を確立した。酵素処理による新生仔マウス由来の卵巣の分散後、非接着丸底ディッシュで48時間10%FBSおよび10 µg/ml含有α-MEMにて培養することで卵巣全細胞の凝集塊である再構築卵巣が効率的に形成された。形成された再構築卵巣は改変型体外卵作出系による培養へと移行することで卵胞形成を支持することができた。とくに、凝集培養後の4日間を低血清条件(2%FBS含有

$\alpha$ -MEM)で、その後の6日間を高血清条件(10%FBS含有 $\alpha$ -MEM)で培養することで卵胞形成が促進された。最終的に、再構築卵巣より単離した卵胞を10%FBSおよび2%PVP含有 $\alpha$ -MEMで培養することで成長期に移行した卵母細胞を得ることのできる培養系を確立できた。

また、別々のマウス個体から得た卵母細胞と卵巣体細胞による再構築キメラ卵巣の培養系にも着手した。磁気細胞分離法を用いることでc-KIT陽性細胞として卵母細胞を、同様にc-KITおよびCD31両陰性細胞群として間質系細胞を除去した卵巣体細胞をそれぞれ分取することができた。B6D2F1系統マウスより卵母細胞を、ICR系統マウスより卵巣体細胞を得ることによりB6D2F1-ICRに由来するキメラ卵巣の再構築培養が可能となった。再構築キメラ卵巣は構造的に脆く、得られる卵胞構造は貧弱という問題点はあるものの、その後の成長培養に耐えうる卵胞を得ることができた。これにより、単離した卵母細胞のみにウイルス感染処理を施し、その後卵巣体細胞と凝集培養を行うための技術が確立できた。

## 2) LV ベクターによる卵母細胞特異的な遺伝子導入

はじめに、パントロピックなVSV-Gを持つG-LVは間質系の体細胞を中心に一部の卵母細胞や顆粒層細胞に感染することを確認した。続いて卵特異的な遺伝子導入の可否を検証するため、VSV-Gを持たないSCF- $\Delta$ G-LV、VSV-Gの細胞外ドメインを欠失させたVSV-GSを持つSCF-GS-LV、完全なVSV-Gを持つSCF-G-LVを作製し、卵巣細胞への遺伝子導入を試みた。その結果、SCF-G-LVは卵母細胞および間質系の卵母細胞への感染能を示したが、完全なVSV-Gを持たないSCF- $\Delta$ G-LVおよびSCF-GS-LVは卵巣におけるいずれの細胞へも感染しなかった。これらの結果から、LVを用いたマウス卵巣細胞への遺伝子導入には少なくとも完全なVSV-Gエンベロープが必要であることがわかった。

この問題の原因がLVゲノムにおけるプロモーターと卵母細胞との相性にある可能性を検証すべく、卵巣において卵母細胞特異的に転写活性を示す*Kit*および*Stella*プロモーターによってレポーターを発現するSCF-LV、SCF-GS-LVおよびSCF- $\Delta$ G-LVを作製して卵巣細胞への遺伝子導入を試みた。しかしながら、プロモーターの変更によっても卵母細胞特異的なレポーター陽性成長期卵母細胞は得られなかった。

卵母細胞特異的な遺伝子導入が起こらなかった原因のひとつとして、細胞種間におけるVSV-Gによる遺伝子導入の嗜好性、あるいは、毒性の問題が存在することが示唆された。これを解決するため磁気細胞分離法を用いてCD31陽性の間質系細胞を除いた卵巣細胞への感染実験、また、単離した卵母細胞のみに対して感染を行い、非感染体細胞とのキメラ卵巣の再構築培養を行ったが、GFP/mCherry陽性の成長期卵母細胞を得ることはできなかった。これまでに過剰量のVSV-Gシュードタイプの組換えウイルスは一部の細胞種に対して毒性を示すことがわかっている。したがって、遺伝子導入を受けた卵母細胞は成長期に移行する前にウイルス感染の毒性により死滅していると考えられた。本研究で作製したLVにおけるVSV-Gは量的には一般的であると思われるが、細胞死が頻繁に起こる出生前後の卵母細胞においては遺伝子導入時のVSV-Gの許容量が少ない可能性もある。

本研究の結果から、マウス卵母細胞へのLVによる遺伝子導入には完全なVSV-Gエンベロープが不可欠ではあるものの、その付与量をコントロールすることが効率的な卵特異的な遺伝子導入および卵母細胞の生存に重要であることが示唆された。また、SCFの存在は卵胞形成前の卵母細胞の生存に必須であるため、ウイルス由来のSCFが卵母細胞の生存性に影響した可能性も考えられる。そのため、SCF-c-KIT以外のリガンド-レセプターを利用したアプローチが今後問題解決の糸口となるかもしれない。

### <引用文献>

Kanako Morohaku, Ren Tanimoto, Keisuke Sasaki, Ryouka Kawahara-Miki, Tomohiro Kono, Katsuhiko Hayashi, Yuji Hirao, Yayoi Obata. Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(32): 9021-6

Yuka Okada, Yuko Ueshin, Ayako Isotani, Tomoko Saito-Fujita, Hisako Nakashima, Kazushi Kimura, Akira Mizoguchi, Masatsugu Oh-Hora, Yoshiko Mori, Masato Ogata, Robert G Oshima, Masaru Okabe, Masahito Ikawa. Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer. Nat Biotechnol, 2007, (2): 233-7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki Keisuke, Hara Satoshi, Yamakami Reina, Sato Yusuke, Hasegawa Saki, Kono Tomohiro, Morohaku Kanako, Obata Yayoi	4. 巻 86
2. 論文標題 Ectopic expression of DNA methyltransferases DNMT3A2 and DNMT3L leads to aberrant hypermethylation and postnatal lethality in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 614-623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木恵亮、高岡沙綾、尾畑やよい
2. 発表標題 卵母細胞特異的ノックダウンシステムの確立
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木恵亮、尾畑やよい
2. 発表標題 卵母細胞特異的遺伝子ノックダウンシステムの開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会フォーラム「有性生殖における染色体・クロマチン・核動態」
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----