

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570177

研究課題名（和文） 胚性幹細胞を用いた効率的なトランスジェニックニワトリの作成技術の確立

研究課題名（英文） Establishment of embryonic stem cell culture for high efficient generation of transgenic chick

研究代表者

Si u Shan Mak (MAK SIU SHAN)

独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究室・研究員

研究者番号：40442967

研究成果の概要（和文）：

本研究はキンカチョウの多能性細胞培養法の確立を目的とする。キンカチョウの胚はニワトリ胚に比べて若いステージであることがわかった。また孵卵前のキンカチョウとニワトリの卵では細胞の特性と挙動に大きな違いが見られた。一定培養条件下では、キンカチョウの単離細胞は幹細胞マーカーを発現するが、ニワトリは発現しなかった。今回我々は初めて、鳥類の桑実胚期後胚の詳細な分子解析と、初期胚培養法および無血清フィーダーセルフリー条件での幹細胞様細胞培養法について報告した。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we set out to establish pluripotent cell culture in the zebra finch species. We found that finch eggs were laid at an earlier stage than chick. There were significant differences between the unincubated eggs of these two species in terms of cell identity and cell behaviour *in vitro*. As a consequence dissociated finch cells, but not chick cells, produced cells that expressed various stem cell markers under a defined culture condition. We reported for the first time, a detailed molecular analysis of post-morula avian embryos and a methodology for culturing such early embryos and a feeder-free serum-free culture condition that could obtain stem cell-like cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：組換え、胚性幹細胞

1. 研究開始当初の背景
鳥類を用いた研究は、遺伝子座を特定して遺伝子を導入する技術がないため非常に困難

である。遺伝子導入技術が発展しない理由として、主に以下の2つの問題が考えられる。

(1) 多能性細胞を行うためのクローン培養システムが十分に確立されていない。

(2) 鳥類ではニワトリが定番の研究モデルとされてきたが、ニワトリはサイズが大きく、性的に成熟するまでの期間が長い（ため、効率的でない。）

結果的に、鳥類の導入遺伝子を用いて遺伝子機能の詳細な解析を行うには限界がある。我々はこれらの問題に対処するため、キンカチョウ種の多能性細胞培養を試みることにした。まずキンカチョウの初期発生について調べるため、実験用の卵を絶えず供給してくれる健康なキンカチョウのコロニーを作るところから研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究はウイルスを用いない鳥類トランスジェニック作製技術を確立することを目的としている。

トリES細胞の取得および培養方法は他の複数のグループから既に報告されているが、この方法では、細胞の多能性が培養1-2週間後には急激に低下する。トリES細胞研究および鳥類トランスジェニック作製技術を進展させるためにトリES細胞の安定維持法を確立し、さらに将来的な応用を見据えてニワトリとフィンチを用いて複数種の鳥類からトリES細胞を作製する。

3. 研究の方法

(1) 研究所内でキンカチョウのコロニーを樹立

(2) キンカチョウの初期胚の特徴付けとES細胞の多能性の確認

(3) トリES細胞の最適な培養方法の確立：

複数の哺乳動物ES細胞の培養法(2iおよび3i培養)をトリES細胞に応用すること。最近新たに確立された哺乳動物ES細胞の培養法(3i method)^{1,2}をトリES細胞に応用した。

・ 3種類の阻害剤(3iとは、FGFR阻害剤のSU5402、ERK阻害剤のPD184352/PD0325901、GSK3阻害剤のCHIR99021)により多能性維持を改善

・ マトリゲルコーティングにより幹細胞増殖を促進

・ 細胞単離および細胞継代条件を改善

これらの検討からトリES細胞の培養に最適な条件を確立した。

1. The ground state of embryonic stem cell self-renewal, Ying et al. *Nature* 453, 519-523, 2008

2. Capture of Authentic Embryonic Stem Cells from Rat Blastocysts, Buehr et al. *Cell* 135(7), 1287-1298, 2008

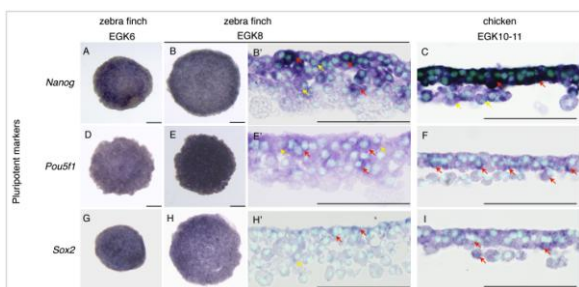
4. 研究成果

我々の実験結果より、後期のニワトリ胚に比べてキンカチョウの初期胚は、形態学的にマウス胚のE4.5前の着床前期に近いと考えられる。我々は、キンカチョウがEGK6-8ステージ(一般的に知られているEGK10ニワトリ胚より早い段階)で胚を形成するのを観察したが、鳥類の胚をこのような自然に誕生した初期胚の段階で採取するのは初めてであったため、これらの胚を特定するところから実験を開始した。

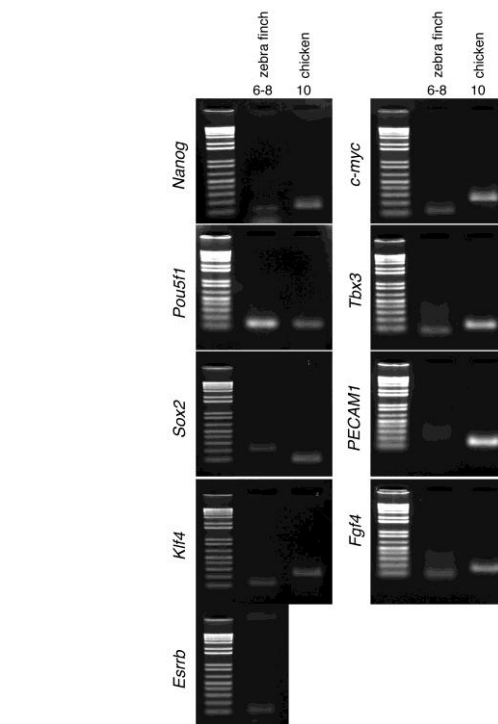
キンカチョウ胚の初期胚盤葉段階の特徴を明らかにするため、免疫組織化学的染色を行い、キンカチョウ特有のプロンプを用いてIn situハイブリダイゼーション(図1)およびRT-PCR(図2)解析を進めてきた。キンカチョウの初期胚は、多能性関連遺伝子*Nanog*, *Pou5f1*, *Sox2*などを発現していたが、マウスのepi-stem cell (mEpiSc)マーカーである*Fgf5*の発現は見られなかった(図3)。ま

た、SSEA-1, EMA-1等の多能性マーカーやアルカリホスファターゼを用いた解析を行った(図4)。転写因子群 GATA6, GATA4, SOX3 もまた初期胚において検出された(図5)。キンカチョウ胚は、一般に実験使用されている主な鳥類(ニワトリ、ウズラなど)の胚よりもステージが若く遥かに小さいため、研究には特別な技術が必要であった。キンカチョウ胚を数々の分子解析と組織培養に用いるため、胚を効率良く分離する方法を確立した。

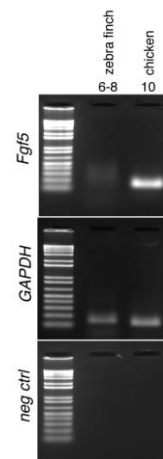
さらにキンカチョウの初期胚盤葉細胞は、1i / 2i (単独あるいは2つの阻害剤)存在下において無血清培地とフィーダーセルフリー条件での培養が可能で、*Nanog*と*Pou5f1*の二重染色陽性(図6左)およびアルカリホスファターゼ陽性(図7左)の細胞塊を形成した。一方、同条件で培養されたニワトリEGK10胚盤葉由来の細胞塊は、アルカリホスファターゼもESCマーカーも共に陰性を示した(図6、7右)。キンカチョウとニワトリでこのように結果が異なるのは、産卵時の成長度合いが違うためだと考えられる。我々は当初の予定通り、キンカチョウES細胞培養法を確立した。鳥類に哺乳動物ES細胞の培養法(1i, 2i培養)が適用できることを、キンカチョウを用いて証明したのである。これは哺乳類以外の動物を用いて胚性幹細胞の研究を行う重要な手がかりとなる。



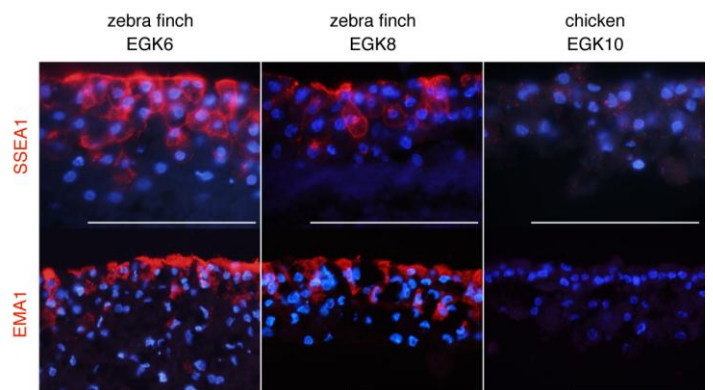
(図1)



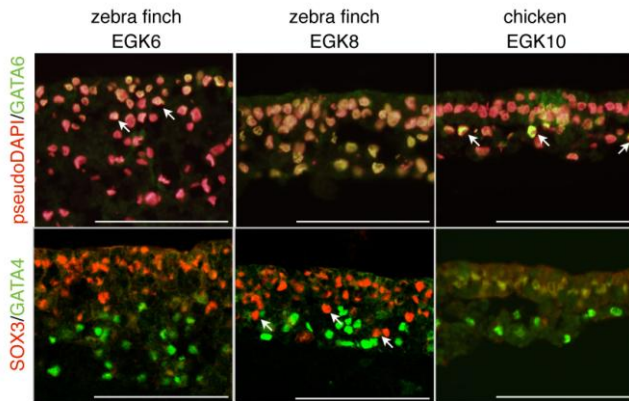
(図2)



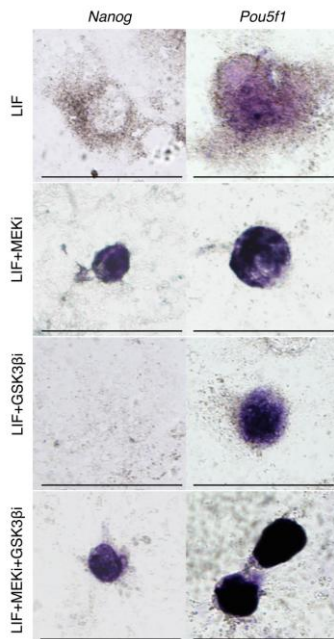
(図3)



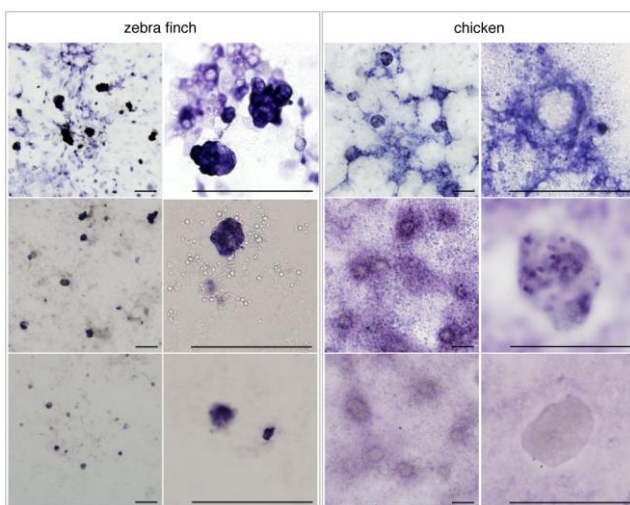
(図4)



(図 5)



(図 6)



(図 7)

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)

論文投稿準備中

[学会発表] (計 4 件)

1. Siu Shan Mak

「Towards establishing the zebra finch as a chimeric avian model」

BBSRC-JST UK-Japan Joint Program Meeting (2013. 3. 7-9)

Rusutsu (北海道虻田郡留寿都村)

2. Siu Shan Mak

「A study on early pre-gastrula stages of the zebra finch blastoderm and its pluripotent potential」

GIBH departmental meeting (2012. 11. 30)

GIBH, Guangzhou (中国広州市)

3. Siu Shan Mak

「Characterising the zebra finch blastodermal cells」

Avian Model Systems (7th International Chick Meeting) (2012. 11. 14-18)

名古屋大学 (愛知県名古屋市)

4. Siu Shan Mak

「Establishing the zebra finch as a model system for developmental studies」

CDB リトリート (2012. 9. 25-26)

ユニトピアささやま (兵庫県篠山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

S i u S h a n M a k (MAK SIU SHAN)

独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究室・研究員

研究者番号：40442967

(2) 研究分担者

R a j L a d h e r (RAJ LADHER)

独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究室・特別主管研究員

研究者番号：70392173