

## 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24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790379

研究課題名（和文）トランスポゾンを用いた精子幹細胞での遺伝子操作による遺伝子改変動物作製法の開発

研究課題名（英文）Production of gene-modified animal by transposase-mediated gene transduction into spermatogonial stem cells.

研究代表者 高島 誠司 (Takashima, Seiji)

京都大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号：40396891

研究成果の概要（和文）：

DBA/2 マウス及び各種系統のラットより精子幹細胞を樹立した。また、フィーダー細胞として C166 血管内皮細胞を用いることで、C57BL/6 マウスからの精子幹細胞樹立にも成功した。PiggyBac システムが精子幹細胞への遺伝子導入に有効であるかを、蛍光色素 EGFP の強制発現コンストラクト導入を例として検証したところ、長期間にわたり安定且つ強力な EGFP 発現を示す精子幹細胞株が得られた。

研究成果の概要（英文）：

For the production of gene-modified animal, germline stem cells were established from DBA/2 mice and various lineages of rats. Germline stem cells derived from C57BL/6 mice were also established by using C166 endothelial cells as a feeder. To assess whether PiggyBac-mediated gene transduction could be applicable to germline stem cells, EGFP expression vector was transduced into germline stem cells via PiggyBac system. As a result, PiggyBac mediated transduction could produce stable transfectants that expressed strong EGFP, suggesting that transposase-mediated gene transduction is effective for germline stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 90,000  | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物、トランスポゾン

## 1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞研究は、幹細胞機能を評価する実験系が確立されておらず、他の幹細胞研究に比較しあまり進展していなかった。しかし、1994年の精子幹細胞移植法の開発 (Brinster RL, et al., PNAS. 1994) によりようやく精子幹細胞の機能評価が可能となった。これをもとに、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ -integrin 発現を指標とした精子幹細胞の濃縮法 (Shinohara T, et al., PNAS. 1999) 及び *in vitro* 長期培養法 (Kanatsu-Shinohara M, et al., Biol Reprod. 2003) が開発された。こうして幹細胞研究に必須の基盤技術が確立された。

精子幹細胞は、生体の中で個体の遺伝情報を子孫に伝えることのできる数少ない細胞の一つであり、生殖工学の観点から非常に有用な細胞として期待されている。既に申請者のグループによりマウス精子幹細胞を用いたトランスジェニック (Kanatsu-Shinohara M, et al., Biol Reprod. 2005) およびノックアウトマウス (Kanatsu-Shinohara M, et al., PNAS. 2006) が作製されており、精子幹細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製が可能であることが証明されている。こうした背景から申請者は、遺伝子機能抑制動物をより安価で簡便且つ迅速に作製するべく、RNAi 法を用いたノックダウン動物作製に取り組んできた。

しかしながら、精子幹細胞へ導入できる RNAi コンストラクトのコピー数は低く、期待したフェノタイプが得られないこと問題となっている。申請者は従来のプラスミドベクターに代えて、レンチウイルスベクターを用いこの問題克服を試み、濃縮による高タイトルのウイルスを感染させることにより精子幹細胞における *Dnmt1* 遺伝子のノックダウンを達成した (Takashima S, et al., Biol Reprod. 2009)。ところが、同手法で *Trp53* のノックダウンマウスを作製したものの、期待した形質を有する *Trp53* ノックダウンマウスは得られなかった。このことから申請者は、*Trp53* のような発現量の高い遺伝子をノックダウンするには、RNAi コンストラクト導入効率を改善する新しい手法を応用する必要があると考えた。

近年、『PiggyBac システム』 (Wang W, et al., PNAS. 2008) という新しい遺伝子導入技術が注目を浴びている。PiggyBac システムは、蛾の一種 *Trichoplusia ni* のトランスポゾンに応用したもので、特定の DNA 配列で挟まれた DNA フラグメントを PiggyBac transposase の作用によりゲノム DNA に挿入するという機序で遺伝子導入を行う。この方法で胚性幹細胞に遺伝子を導入した場合、申請者の用いているプラスミドによる遺伝

子導入 (Kanatsu-Shinohara M, et al., PNAS. 2006) と比較し、5000 倍の導入効率を達成している (Lacoste A, et al., Cell Stem Cell 2009)。申請者は、この手法が RNAi コンストラクト導入コピー数を増加させ、遺伝子ノックダウン動物作製を可能にすると考えた。

## 2. 研究の目的

申請者の研究目標は、マウスを含め種々の動物種に応用可能、且つより安価に短期間で行うことができる遺伝子改変個体作製法を開発することである。そのためには、精子幹細胞への遺伝子導入効率を改善する必要がある。このことを可能にする新技術として、申請者は PiggyBac システムの応用が有効であると考えた。しかしながら、精子幹細胞への遺伝子導入における PiggyBac システムが有効か否かは検討されていなかった。

そこで本研究では、上記のアイデアが有効であるか否かを明らかにすべく、マウス・ラット精巣より精子幹細胞を樹立し、PiggyBac システムによる遺伝子導入が精子幹細胞でも有効であるかを検討することとした。更に、遺伝子改変動物作製のモデルケースとして、癌抑制遺伝子 *Trp53* のノックダウンマウスおよびラットの作製を試みることにした。

## 3. 研究の方法

### ・精子幹細胞の樹立 (動物)

TgN (act-EGFP) Osb4 (Sprague-Dawley (SD) 背景) ラットは大阪大学の岡部勝教授より譲渡されたものを使用した。また、このラットに Wistar, Donryu, Brown Norway (BN), 及び Lewis の各背景の野生型ラット (日本 SLC) を掛け合わせ、F1 子孫として使用した。  
(精子幹細胞の培養)

生後 7~10 日齢のラットより精巣を摘出、トリプシン・コラゲナーゼ処理にて分散させ、精巣細胞を調製した。これを細胞低接着性ディッシュ (Nalge Nunc International KK) に  $10^6$  cells /  $9.6 \text{ cm}^2$  で播種した。7~10 日培養後、浮遊細胞を除去し、精子幹細胞を含む接着細胞をラミニン ( $20 \mu\text{g/ml}$ ; BD Biosciences) でコートしたディッシュに移し、 $3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  の細胞密度で培養した。この過程で精巣体細胞は徐々に淘汰され、精子幹細胞のコロニーが出現した。出現した精子幹細胞は Accutase (Sigma) にて 10 分間インキュベートし分散させ、ラミニンコートディッシュ、或いはマイトマイシン C (Sigma) により増殖を停止させたマウス胎児繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast :

MEF)、或いはマウス卵黄嚢由来血管内非細胞株 C166 フィーダー上に継代した。継代は 5~7 日ごとに行った。培地の組成は、Stem Pro 34 培地 (Invitrogen) へ、25µg/ml インスリン (ナカライテスク)、100 µg/ml transferrin、60 µM putrescine、30 nM sodium selenite、6 mg/ml D- (+) -glucose、30 µg/ml pyruvic acid、1 µg/ml DL-lactic acid、2 mM L-glutamine、 $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol、 $10^{-4}$  M ascorbic acid、10 µg/ml D-biotin、30 ng/ml beta-estradiol、60 ng/ml progesterone、3 µg/ml heparin (以上、Sigma Aldrich)、MEM vitamin solution、MEM nonessential amino acids solution (共に Invitrogen)、20 ng/ml mouse epidermal growth factor (BD Biosciences)、10ng/ml human FGF2、10 ng/ml mouse FGF9、15 ng/ml recombinant rat GDNF (以上 Peprotech)、及び  $10^3$  units/ml ESGRO (murine leukemia inhibitory factor ; Millipore) を添加し使用した。低接着性ディッシュからラミニンコートディッシュ/MEF feeder プレートに継代した後は、上記の培地に更に 0.06% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories) 及び vitamin A-deficient B27 (Invitrogen) を添加し培養した。培養開始から約一ヶ月後以降は、ESGRO を除去し、FBS を 0.2% として培養を継続した。この際、MEF feeder 上で培養する場合は、培地に 5mg/ml で bovine serum albumin (MP Biomedicals Inc) を加え、FGF2、FGF9、GDNF の濃度をそれぞれ 50、30、45 ng/ml に増加させた。

#### ・PiggyBac システムによる遺伝子導入

あらかじめ MEF フィーダーを播種しておいた 12 well plate に精子幹細胞を  $1.5 \times 10^5$  cells/600 µl medium/well で播種した。翌日、Fugene6 試薬 (Roche) を用い、PiggyBac 発現ベクター『pCAG-PBase』及び EGFP 発現ベクター『pPB-Ubc-EGFP-pA』あるいは RNAi 発現ベクター『pPB-U6-shTrp53-CMV-EGFP-pA』を細胞へ導入した。

#### 4. 研究成果

まず、マウス及びラットの精子幹細胞の樹立を行った。新生児マウス・ラット精巣をトリプシン・コラゲナーゼ処理にて分散させ、胎児繊維芽細胞上 GDNF、LIF、EGF、FGF-2 存在下で培養し精子幹細胞を樹立した。マウスに関しては、遺伝子改変マウス作製へ応用可能である事が示されている DBA/2 系統、ラットに関しては Sprague-Dowley、Wistar 系統のほか、Donryu、Lewis、Brown Norway などと SD との F1 hybrid から GS 細胞を樹立した。また、マウス胎児卵黄嚢由来血管内皮細胞株 C166 をフィーダー細胞として用いる

ことにより、これまで長期培養に成功していなかった C57BL/6 系統マウスからも精子幹細胞を樹立することに成功した。

これらの細胞を用いて、PiggyBac システムによる遺伝子導入の可否を検討した。精子幹細胞へリポフェクション法により PiggyBac 発現ベクターと pPB-Ubc-EGFP-pA (PiggyBac の作用で Ubc-EGFP-pA 配列がゲノムに挿入される) を導入したところ、EGFP を強力に発現する精子幹細胞が得られた。この細胞は一ヶ月以上に渡り強い EGFP 発現を保ちつつ安定的に増殖していた。一方、pPB-Ubc-EGFP-pA のみを導入した場合、一過性の EGFP 発現は確認されるものの、継代とともに EGFP 陽性細胞は消失した。このことから、PiggyBac による遺伝子導入は、導入遺伝子の強力且つ安定な発現を示す細胞株を得る手段として有効であることが示された。

上記実験と並行し、Trp53 に対する RNAi を発現するコンストラクトを PiggyBac システムにより導入できるベクターを構築した。現在、これまでに樹立したマウス精子幹細胞株に、PiggyBac システムをもちいて Trp53 RNAi を導入している。今後、Trp53 RNAi が導入された精子幹細胞を不妊マウス精巣内へ移植し精子を形成させ、子孫作製を試みる予定である。

#### 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 4 件)

1. Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Takehashi, M., Morimoto, H., Shinohara, T. (2011). Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier. *Cell Stem Cell* 9, 463-475. (査読有り、doi: 10.1016/j.stem.2011.08.011)

2. Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Ishii, K., Shinohara, T. (2011). Dynamic Changes in EPCAM Expression during Spermatogonial Stem Cell Differentiation in the Mouse Testis. *PLoS One* 6, e23663. (査読有り、doi: 10.1371/journal.pone.0023663)

3. Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Shinohara, T. (2010). Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 6210-6215. (査読有り、doi:

10.1073/pnas.0914448107)

4. Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Morimoto, H., Takashima, S., Ogura, A., Shinohara, T. (2010). Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. J. Reprod. Dev. 56, 145-153. (査読有り、doi: 10.1262/jrd.09-153N)

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad\\_school/introduction/1504/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1504/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高島 誠司 (Takashima, Seiji)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40396891