

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26650076

研究課題名(和文)ES細胞を利用した鳥類遺伝子組換え技術の構築

研究課題名(英文)Establishment of quail embryonic stem-like cells

研究代表者

中野 幹治 (NAKANO, Mikiharu)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：30636006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニワトリ(6ヵ月)よりも性成熟までの期間が圧倒的に短いウズラ(6週間)をモデル動物として、鳥類において多能性幹細胞を用いた遺伝子組換え技術の確立を試みた。これまでのニワトリの研究を基に、複数のウズラ系統を用いて樹立を試みた結果、長期間に亘ってES様の形態を維持したウズラ胚性幹(qES)様細胞の樹立に成功した。この細胞は、JAK-STATシグナルによってその多能性を維持しており、生殖細胞系列を含めたキメラ形成が可能であった。しかしながら、そのキメラ形成率は、細胞株間で大きく異なっており、本研究の期間では、遺伝子組換え体の作出技術の確立には至っていない。

研究成果の概要(英文)：To produce transgenic animals using ES cells, ES cells must be capable of germline transmission. We previously established novel germline-competent chicken ES cell lines using chicken leukemia inhibitory factor (chLIF); however, they possessed very little capacity to differentiate into germline cells. In this study, we have selected the Japanese quail as a model animal by the advantages of short generation time. Using quail ES (qES) cell lines derived from various strains, we examined the optimal culture conditions and analyzed the effect of gene modification on chromosomal abnormalities. We demonstrate that qES-like (qESL) cells cultured have the capacity for long-term successive subculture and the competency for chimeric formation after injection into recipient embryos. To confirm the signaling pathways required for maintenance of self-renewal and survival of qESL cells, they were cultured in the presence of JAK inhibitor.

研究分野：発生生物学

キーワード：ウズラ ES細胞 遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

ウズラやニワトリは、基礎研究における優れたモデル動物であり、高い生産性を有する産業動物でもある。そのため個体レベルの遺伝子組換え技術は、基礎研究と産業利用の両方に有効である。鳥類ではこれまでにウィルスベクターもしくは培養した始原生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) を利用して遺伝子組換え体が作出されてきた。一方で、鳥類でこれまでに報告されてきた胚性幹 (embryonic stem, ES) 細胞の多くは、生殖細胞系列への分化が認められておらず遺伝子組換え体の作出には利用できなかった。申請者はこれまでの研究で、新たなニワトリ ES 細胞株の樹立に成功し、生殖細胞系列へ分化可能であることを確認した。本研究ではこの培養系をウズラに応用することで遺伝子組換え体の作出を可能とする鳥類多能性幹細胞の培養系構築を試みる。

2. 研究の目的

申請者が樹立したニワトリ ES 細胞では、遺伝子組換え後に高頻度の染色体異常が引き起こされるという問題があり、未だ遺伝子組換え個体の作出には至っていない。本研究ではこの問題を解決するために、これまでの研究成果に基づき、ニワトリに比べて性成熟の早いウズラの ES (quail ES, qES) 細胞を利用することで、遺伝子操作および生殖系列キメラ作出条件の検討と効率化を目指す。そしてウズラでの研究成果をニワトリに還元することで、鳥類においてジーンターゲットを含めた遺伝子組換え体の作出技術を確認することが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

研究(1) ES 細胞の樹立と特徴解析 本研究では、複数のウズラ系統を用いて ES 細胞を樹立し、遺伝子組換え個体の作出に向けて適切な細胞株の樹立を試みる。qES 細胞の培養は、ニワトリ ES 細胞の培養方法を基盤とし、主要な添加物としてニワトリ由来の LIF (chicken leukemia inhibitory factor, chLIF) を使用する。ニワトリでは、LIF がマウス ES 細胞の培養のように、細胞の未分化維持機構で重要なシグナルを担うサイトカインであることが示されている。またウズラとニワトリの LIF はアミノ酸レベルで 90% を超える相同性を示すことから、本研究では qES 細胞の培養にも chLIF を使用する。

研究(2) 遺伝子組換えと核型解析

ニワトリの ES 細胞では、遺伝子組換え後に高頻度の染色体異常が引き起こされるという問題があり、ES 細胞から遺伝子組換え個体を作成するうえで妨げとなっていた。本研究では、ES 細胞株は、遺伝子組み換え操作の前後で核型解析を行い、正常核型を維持している細胞株を選抜してキメラ作出に用いる。しかしウズラおよびニワトリは、共に染色体数

が 78 本と多くマイクロ染色体の正確な判別が困難であるため、本研究ではギムザ染色によって比較的判別が容易なマクロ染色体 (1-8 番染色体および ZW 型性染色体) の数と形態を観察し染色体異常が検出された細胞株を除去する。

4. 研究成果

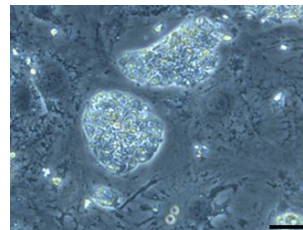
(1) qES 細胞の培養における系統の影響

申請書のこれまでの研究において、ニワトリ ES 細胞の樹立では、培養に使用したコマーシャル系統 (WL, BPR など) の違いによって樹立効率に大きな影響は見られなかった。本研究では、名古屋大学で維持されている遺伝的に標準化された長期閉鎖系ウズラを利用して、qES 細胞の元となる胚盤葉細胞の培養に変化が生じるかを検証した。その結果、使用した 5 系統のうち (rbTKP, WE, AWE, L, AMRP) のうち、rbTKP 系統を除く 4 系統で培養開始から 2 週間を経過しないうちに大半の細胞が形態に変化を生じ、分化してしまうことが明らかになった。

表 1 ウズラ胚盤葉細胞の培養効率

| | 0-day | 2-day | 6-day | 8-day | 15-day | % (15-day) |
|-------|-------|-------|-------|-------|--------|------------|
| rbTKP | 9 | 9 | 9 | 9 | 7 | 77.8 |
| WE | 9 | 9 | 5 | 4 | 3 | 33.3 |
| AWE | 9 | 12 | 3 | 3 | 2 | 22.2 |
| L | 12 | 12 | 9 | 7 | 4 | 33.3 |
| AMRP | 24 | 24 | 13 | 8 | 3 | 12.5 |

一方、rbTKP 系統を使用した場合は、マウスの ES 細胞に似た形状の細胞コロニーが長期間にわたって培養可能であった。長期間培養を行った細胞コロニーは、未分化のマーカーであるアルカリフォスファターゼ (AP) 染色に対して陽性を示すと共に、多能性のマーカーの一つである Nanog を発現しており、ES 様の状態を維持したまま培養可能であることが明らかとなった (図 1)。



50 μm

図 1 長期間培養 qES 様細胞 (培養 45 日、継代 14 回)

rbTKP 系統以外のウズラ系統では、2 週間以上に亘って分化形態に変化せずに細胞コロニーを維持できる割合が極めて低かったため、以降の実験には rbTKP 系統由来の qES 細胞を供試した。また、qES 様の細胞は、いずれの系統であっても、ニワトリ ES 細胞の培養系には必須ではなかった ROCK 阻害剤や GSK3β 阻害剤が長期間培養には必須であった。なお、ES 細胞様の形態を維持したまま培養可

能であった細胞株については、rbTKP 系統以外であっても未分化および多能性のマーカーは発現が維持されていた。

(2)qES 細胞の維持機構について

qES 様細胞の未分化状態がマウス ES 細胞のような JAK-STAT シグナルに依存したナイーブ型の特徴を有しているのか、霊長類のような FGF2 シグナルに依存したプライム型の特徴を有しているのかは、以降の生殖系列キメラを作出するうえで極めて重要となる。そのため、各シグナルの阻害剤を培養系に添加して細胞コロニーの未分化状態に変化が現れるかを検証した。その結果、qES 様細胞は FGF シグナルの阻害剤を添加した際にはコロニー形態に変化はなく AP 染色に対して陽性を示したのに対し、JAK シグナルの阻害剤に対してはその添加によってコロニーの形態が変化し、AP 染色に対しても陰性であった (図 2)。

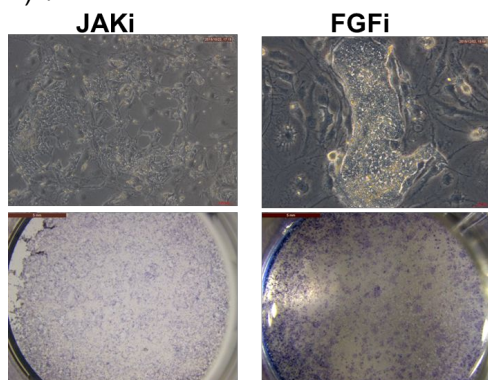


図 2 各阻害剤添加時の qES 様細胞の変化

また、マウスやラットの ES 細胞で広く使用されている 2i 培養法の内、FGF-MAPK シグナル阻害剤は qES 様細胞の培養維持に必須ではないことも明らかとなった。これらの結果から、本研究における qES 様細胞が、ナイーブ型の ES 細胞と同様に JAK-STAT シグナルによってその未分化状態を維持しているが、その維持機構はマウスやラットとは異なる点が生じていることが明らかになった。

(3)qES 細胞を用いたキメラ体の作出

本研究では、鳥類の遺伝子組換え体の作出に利用可能な ES 細胞の培養を目的としているため、樹立した qES 様細胞を用いてキメラ体の作出を試み、in vivo における多能性の評価を行った。その結果、胚盤葉期の胚に qES 細胞を移植することでキメラ体の作出が可能であった (図 3)。

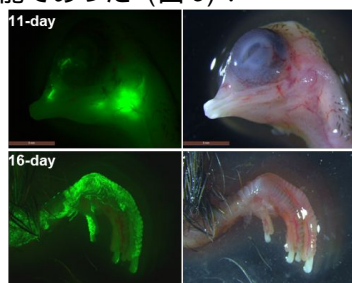


図 3 qES 様細胞を移植したキメラ胚

qES 様細胞を移植した胚からは、遺伝子導入前であれば羽装色のキメラが、遺伝子導入後の細胞株からは、体組織の様々な部位で GFP の蛍光が観察されるキメラ体が作出可能であり、その中には生殖腺のキメラも含まれていた。さらに、生殖線キメラの一部には、生殖細胞系列に特異的な Vasa タンパクを発現している細胞 (PGC) において導入遺伝子の局在が重なる細胞が観察されており (図 4)、本研究で培養した qES 細胞が生殖細胞系列にも分化可能であることが明らかとなった。

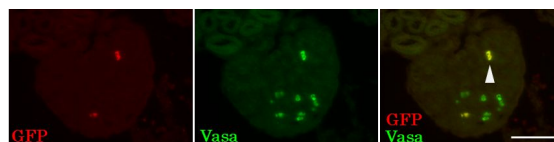


図 4 生殖線キメラの組織切片染色

本研究では、上記の様に qES 様細胞が生殖細胞系列を含めた多能性を維持していることは確認できたものの、残念ながら qES 様細胞を移植したキメラ体から生殖系列伝播を確認するには至らなかった。一方、本研究で樹立した qES 様細胞は、キメラ体の作出効率において、細胞株によって大きく異なっていることが明らかになった。また本研究では、ニワトリ ES 細胞で懸念事項であった異常核型を有した細胞株を極力排除したうえでキメラ体の作出に使用したが、キメラ体作出の段階では、異常核型の存在よりもその細胞株ごとの特徴に依存して効率に違いが生じていた (表 2)。

表 2 細胞株とキメラ形成率

| 株 | 性別 | 正常核型の割合 | 胚数 | 9 日胚数 | キメラ数 (キメラ形成率) | 性腺キメラ数 |
|-------|----|---------|----|-------|---------------|--------|
| rb5G | ZZ | 46.7% | 36 | 27 | 6 (22.2%) | 1 |
| rb6G | ZZ | 8.3% | 38 | 27 | 1 (3.7%) | 0 |
| rb16G | ZW | 80.0% | 27 | 21 | 3 (14.3%) | 0 |
| rb22G | ZZ | 82.0% | 30 | 16 | 0 (0.0%) | 0 |

これらの結果から、qES 様細胞を用いて遺伝子組換え体を作成するには、長期間の培養が可能となった段階で、キメラ体の作出効率が高くなる細胞株を選抜したうえで、正常核型の選抜と凍結保存による正常核型細胞株の保持が必要であると考えられる。

以上のように、本研究では、当初の予定であった qES 細胞を利用した遺伝子組換え体の作出方法の確立には至ることができなかった。しかしながら、本研究によって得られた知見から、鳥類における多能性幹細胞を用いた生殖細胞伝播の可能性と遺伝子組換え体の作出に向けて、そこに至るために必要な道筋を明らかにすることが可能であった。

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)

〔学会発表〕(計 4 件)

Mikiharu NAKANO, Establishment of quail ES-like cells, 2016 Poultry Science Association(New Orleans), 2016

Mikiharu NAKANO, Establishment of quail ES-like cells, Avian Model Systems 9(Taipei), 2016

中野幹治, ウズラ胚性幹細胞の樹立に関する研究, 日本家禽学会秋季大会(北海道江別市), 2015

中野幹治, ウズラ胚性幹細胞の樹立に関する研究, 日本実験動物学会(北海道札幌市), 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 幹治 (NAKANO Mikiharu)

名古屋大学大学院・生命農学研究科付属鳥類バイオサイエンス研究センター・研究員

研究者番号: 30636006

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()