

ウサギ顕微受精胚からの胚性幹細胞樹立の検討

中野美穂¹、杉本浩伸²、荒田隆志³
岸上哲士^{1,3}、松本和也^{1,3}、佐伯和弘^{1,3}、細井美彦^{1,3}

要 旨

胚性幹 (Embryonic stem : ES) 細胞は、体を構成するほぼすべての細胞へ分化することができる細胞である。そのため、ES 細胞は再生医療の細胞移植材料として研究されてきた。細胞移植モデル動物は、飼育しやすく外科手術が容易で生理学的にヒトに近いことが求められる。そこで、ウサギは中型動物で大人しく室内飼育が可能なことから広くヒトモデル動物として研究に利用されてきた。さらに、マウスよりも体が大きく外科手術や術後の経過の観察も容易であることから、間葉系幹細胞を用いた目の角膜再生実験や骨形成促進実験、さらに軟骨細胞を用いた気管狭窄改善実験や関節軟骨再生実験などでヒトモデル動物として用いられてきた。これらのことから、ウサギ ES 細胞の樹立が可能となれば有用な細胞移植におけるヒトモデル動物及びシステムの構築になると期待できる。

本実験ではウサギ卵子細胞質内精子注入法 (Intra-cytoplasmic sperm injection : ICSI) により得られた胚からの ES 細胞の樹立を試みた。樹立は、透明帯と栄養外胚葉を除去し内部細胞塊 (Inner cell mass : ICM) をフィーダー細胞上へ播種し培養を行った。

その結果、ES 細胞様の初期コロニーが出現し未分化な遺伝子マーカーの発現も観察された。このことから、交配卵と同様に顕微受精胚からも ES 細胞が樹立可能であることが示された。以上のことから、これらの ES 細胞の樹立技術は、再生医療における細胞移植モデルのツールとして応用できると考えられる。

1. 緒 論

ES 細胞は、受精卵の将来胎児になる部分である ICM を体外環境で培養することで得ることができる。このようにして得られた ES 細胞は、高い自己複製能に加え未分化な状態を保ち、3 胚葉系譜への分化能を有している。近年、このような特徴から、ES 細胞は再生医療分野において細胞移植治療の応用が期待され研究が行われてきた。しかし、それを得るために必要な受精卵を獲得することは容易ではない。

ICSI は、精子を卵子に直接注入する技術であり、臨床など多くの分野で利用されている。ICSI の技術を用いることにより、体外受精が成立しなかった卵子においても受精に利用することができる。また、この技術は、受精卵の獲得が困難な実験動物において効率的に受精卵を獲得する手段として有用である。

本実験では、生理学的にヒトに近いウサギを用いて、効率的に受精卵を獲得することができる ICSI 技術により得られた受精卵から ES 細胞の樹立を試みた。

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 医療法人 定生会 谷口病院 〒598-0043 大阪府泉佐野市大西 1-5-20

3. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 材料と方法

ICSI 胚の作出

(1)精子処理

NZW 種成熟雄ウサギから精液を回収し、M2+0.3% BSA (M2) で約 30 倍希釈処理を行った。

(2)卵子の回収

NZW 種成熟雌ウサギに過剰排卵処理として、妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 80 単位を筋肉へ投与し、72 時間後にヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) 60 単位を耳介から静脈内投与した。hCG の投与から 14 時間後に安楽死させ、卵管灌流法により卵子卵丘細胞複合体を回収、0.1% ヒアルロニターゼに約 1 分間暴露し、M2 中でピペッティングすることで卵丘細胞を除去した。裸化した卵子は CMRL+20%FBS (CMRL)、37℃、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で使用時まで保存した。

(3)顕微授精法

精子懸濁液より精子を採取した。生存精子は、インジェクションピペット内に吸引した後、精子尾部にピエゾパルスを与えることで不動化処理を行った。1 個の精子をインジェクションピペット内に尾部から吸入し、ホールディングピペットを用いて第一極体が 12 時から 6 時の方向になるように未受精卵を固定した。インジェクションピペットを卵子の透明帯に接着させて、ピエゾドライブを駆動させながら透明帯を通過させ、さらにインジェクションピペットを卵子細胞質内に挿入し、再び弱いピエゾドライブユニットの駆動によって卵子細胞質膜を破り、精子を注入した。その後、CMRL、38.5℃、5%O₂、5%CO₂、90%N₂ 下で胚盤胞期胚まで培養した。

ES 細胞の樹立

(1)ICM の単離と播種

0.6×10^5 cells/cm² のフィーダー細胞を播種しておいた 4well ディッシュの 10%FBS-DMEM をアスピレーターで除去し、PBS (-) 500 μ l を加え洗浄後、再度除去し、500 μ l の 20%KSR-DMEM/F12 を加えた。さらにこれに 8ng/ml bFGF を添加した。ハッチしたウサギ胚盤胞期胚を 20%KSR-DMEM/F12 8nl へウサギ脾臓抗モルモット血清 2nl を添加した培地に入れ 37℃、5%CO₂ 飽和湿度下で 30 分間培養した。その後、20%KSR-DMEM/F12 8nl へモルモット補体 2nl を添加した培地に入れ 37℃、5%CO₂ 飽和湿度下で 30 分間培養した。培養後、26G 針 [TERUMO, NN-2613S] で透明帯を機械的に除去し、ピペッティングにより栄養外胚葉を除去した後、フィーダー細胞上に播種した。培地は毎日交換した。

(2)継代

播種後 4-6 日目に内部細胞塊由来コロニーが形成されるので、培地をアスピレーターで吸引除去し、ウサギ ES 様細胞解離溶液を 200 μ l 加え、37℃、5%CO₂ 飽和湿度下で 5 分間培養した。その後、10%FBS-DMEM を同量加えて Trypsin を止め、ウサギ ES 様細胞コロニーが小細胞塊になるまでピペッティングし、15ml コニカルチューブに回収し 1500rpm、5 分間、室温で遠心した。遠心後、上清をアスピレーターし、新しい 20%KSR-DMEM/F12 で懸濁して、それぞれ新たなフィーダー細胞上に播種した。毎日培地交換を行い、4-6 日間培養を行うとコンフルエントに達するので、その後、同間隔で継代培養を行った。

樹立したウサギ ES 細胞様細胞の評価

(1)樹立率

供試受精卵数から初期コロニーを得られた受精卵数を割り、樹立高率の検討を行った。

(2)アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性の検定

得られたウサギ ES 様細胞を中性ホルムアルデヒドで室温、15 分間で固定した。染色は Leukocyte アルカリフォスファターゼ染色キット [SIGMA] を用いて行った。

(3)免疫組織化学染色

ウサギ ES 細胞を 10% 中性ホルマリンで固定したものを用いた。免疫染色は定法通り行った。

本実験では抗 OCT-4 抗体、抗 SSEA-1 抗体を用いた。検出に際しては HRP で標識した 2 次抗体を用いた。

(3)胚様体 (Embryoid Bodies; EBs) の形成誘起

継代培養後 3-5 日後のウサギ ES 様細胞を 0.05% Trypsin-PBS (-) を加え、37°C、5%CO₂ 飽和湿度下で 5 分間培養した。その後、10%FBS-DMEM を同量加えて Trypsin を止め、十分にピペッティングを行った。コニカルニカルチューブへ移し 1500rpm、5min、室温で遠心した。上清を除去して 20%KSR-KODMEM で懸濁し、ペトリディッシュに播種した。

播種 2-3 時間後、上清を 15ml コニカルチューブに回収し、1500rpm、5min、室温で遠心後、新しいペトリディッシュで浮遊培養させた。これによって前培養を行い、フィーダー細胞を除去した。培地に対して 0.5% になるように DMSO [Wako, 045-24511] 添加し、以後 2 日毎に培地を交換した。

3. 結果

本実験で得られたウサギ ES 細胞の形成率を以下の表に示した。供試胚数 11 個を樹立に用いた結果、初期コロニーを形成した胚数は 8 個、さらに継代可能な ES 細胞を得られたのは 4 個であった (表 1)。

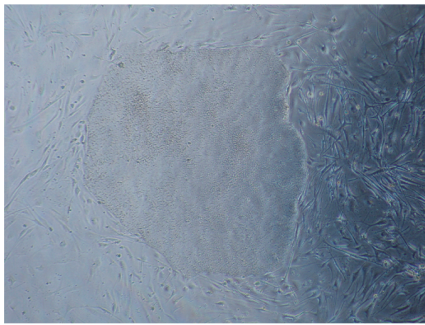
表 1. ウサギ ES 細胞の形成率

供試胚数	初期コロニー形成数 (%)	ES 細胞樹立数 (%)
11	8 (72)	4 (36)

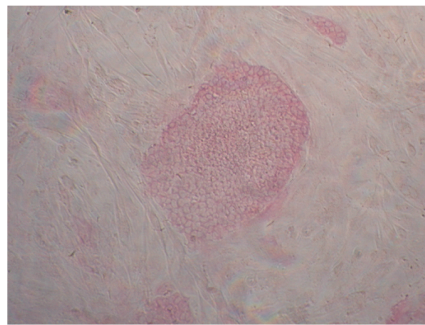
次に、得られた ES 細胞が既に報告されている ES 細胞の特徴である ALP 活性、未分化マーカー遺伝子 Oct-4 と SSEA-1 の発現を有しているのかを免疫組織化学的手法を用い検討を行った。

その結果、ALP 活性、Oct-4 と SSEA-1 の発現が確認された (図 1)。

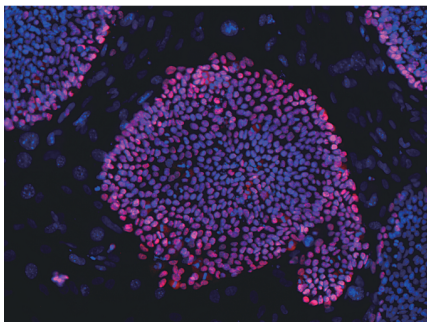
(a) 位相差像



(b) ALP 染色像



(c) OCT-4 抗体を用いた免疫染色



(d) SSEA-1 抗体を用いた免疫染色

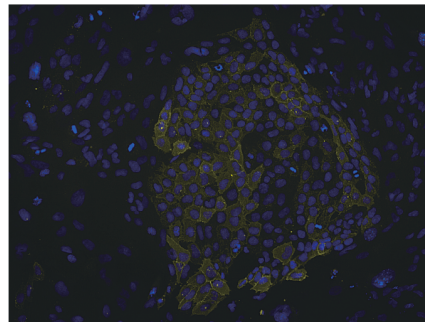


図1 ウサギ ES 様細胞の免疫組織化学的手法を用いた検討
(a) 位相差像、(b) ALP 染色像、
(c) OCT-4 抗体を用いた免疫染色
(d) SSEA-1 抗体を用いた免疫染色

次に、得られたウサギ ES 細胞が分化能を有しているのか EB 形成を誘起し検討を行った。その結果、培養 3 日目に EB 構造の形成が確認された。(図 2) それを接着培養させたところ、軸索構造を有した神経様細胞の形成が確認された。(図 3)

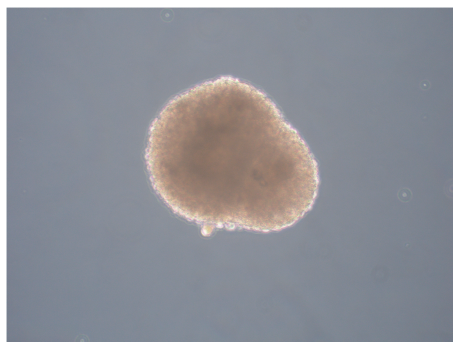
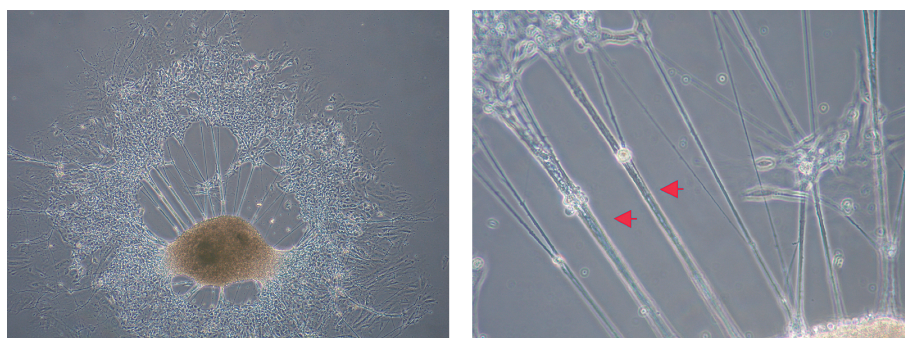


図2 浮遊培養 3 日目



◀ 軸索構造

図3 得られた神経様細胞

考 察

本実験では、生理学的にヒトに近いウサギを用いて、効率的に受精卵を獲得することができる ICSI 技術により得られた受精卵である顕微受精卵から ES 細胞の樹立を試みた。

本実験で得られたウサギ ES 様細胞の形成率を検討した結果、供試胚数 11 個のうち 4 個からえられ、その効率は約 36% であった (表 1)。この結果は、本研究室で検討された受精卵での ES 細胞樹立効率と比較して、ほぼ同様であった。得られた ES 細胞が既に報告されている ES 細胞の特徴である ALP 活性、未分化マーカー遺伝子 Oct-4 と SSEA-1 の発現を有しているのかを免疫組織化学的手法を用い検討を行った結果、ALP 活性、Oct-4 と SSEA-1 の発現が確認された (図 1)。これらのことは、得られた ES 細胞が培養を行う上で、未分化な状態を保っていることが考えられる。さらに、得られたウサギ ES 細胞が分化能を有しているのか EB 形成を誘起し検討を行った結果、培養 3 日目に EB 様構造の形成が確認され (図 2)、それを接着培養させたところ、軸索構造を有した神経様細胞の形成が確認された。(図 3) このことから、得られた ES 細胞が少なくとも外胚葉系譜への分化能を有していることが示された。

これらの結果から、すでに報告のある交配卵と同様の方法を用いて、顕微受精卵からも ES 細胞が樹立できることが示唆された。以上の事から、本実験で用いた ES 細胞の樹立技術は、再生医療における細胞移植モデルのツールとして応用できると考えられる。

参 考 文 献

1. Zhen F. Fanga, 1, Hui Gaia, 1, You Z. Huang, b, 1, Shan G. Lia, 1, Xue J. Chena, Jian J. Shia, b, Li Wua, Ailian Liua, Ping Xuc, Hui Z. Shenga, Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos, EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 312 (2006) 3669-3682
2. SHUFEN WANG, XIANGHUI TANG, YUYU NIU, HONGWEI CHEN, BIN LI, TIANQING LI, XIUZHEN ZHANG, ZHIXIN HU, QI ZHOU, WEIZHI JI, Generation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells, STEMCELLS 2007; 25: 481-489
3. Shufen Wang, Yi Shen, Xiaohua Yuan, Kai Chen, Xiangyu Guo, Yongchang Chen, Yuyu Niu,
4. Jian Li, Ren-He Xu, Xiyun Yan, Qi Zhou, and Weizhi Ji, Dissecting Signaling Pathways That Govern Self-renewal of Rabbit Embryonic Stem Cells, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 283, NO. 51, pp. 35929-35940, December 19, 2008

- 5 . Arata Honda_, Michiko Hirose, Atsuo Ogura, Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells, EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 315 (2009) 2033-2042
- 6 . Alan Colman & Oliver Dreesen, Induced pluripotent stem cells and the stability of the differentiated state, EMBO reports VOL 10 , NO 7, 2009
- 7 . James A. Thomson, Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, Science 282, 1145 (1998)

英文要旨

Establish of embryonic stem cell derived from rabbit eggs fertilize
by Intra-cytoplasmic sperm injection

Miho Nakano¹, Hironobu Sugimoto², Takashi Arata³
Satoshi Kishigami^{1, 3}, Kazuya Matsumoto^{1, 3}, Kazuhiro Saeki^{1, 3}, Yoshihiko Hosoi^{1, 3},

Abstract

Embryonic stem cells (ESCs) are capable of differentiating into any cells in the body. In recent years, ESCs have been investigated as cell transplant therapy tool in regenerative medicine. Primates are used as human-model animals, but primates have problems such as high breeding expense and ethical restrictions. On the other hand, rabbits are used in medical research, because they housed indoor; physiologically similar to human; and easy to perform surgical procedures. Especially, rabbits are used as the human-model animal in regenerated cornea and bone formation, as well as improving tracheal stenosis and articular cartilage.

In this study, we used rabbit eggs fertilize by Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) to establish ES cells. ES cell establishment was done by first removing zona-pellucida and trophoblast and then seeding the inner cell mass onto mouse embryonic fibroblasts.

In the result, primary colonies and expression of undifferentiation markers were observed. These results suggest that ES cells can be established from eggs that were fertilized using ICSI. Therefore, these technologies that are used to establish ES cells appear to be applicable to cell transplant therapy tool in the regenerative medicine.

1. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Taniguchi Hospital, Osaka 598-0043, Japan

3. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan