

## ウサギ始原生殖細胞の培養と Embryonic germ cell (EG 細胞) の樹立の試み

掛 川 亮<sup>1</sup>、寺 村 岳 士<sup>2</sup>、竹 原 俊 幸<sup>3</sup>、松 本 和 也<sup>1</sup>、  
佐 伯 和 弘<sup>1</sup>、吉 田 佳 世<sup>4</sup>、森 田 隆<sup>4</sup>、入 谷 明<sup>1</sup>、  
佐 川 典 正<sup>2</sup>、細 井 美 彦<sup>1</sup>

### 要 旨

マウスでは始原生殖細胞 (Primordial germ cell; PGC) の培養系の研究が進んでおり、*in vitro* における PGC の培養が可能である。そのため、PGC はゲノムインプリンティングの消去、精子・卵子形成の過程の研究材料としてよく用いられている。また、PGC をある環境下で培養することで胚性生殖細胞 (Embryonic germ cell; EG 細胞) を樹立することができる<sup>(1)(2)</sup>。ウサギでは *in vitro* での PGC の培養系は整っておらず、EG 細胞も樹立されていないため、ウサギでも *in vitro* での PGC 培養系の確立、EG 細胞の樹立によって、より正確な発生メカニズムを解明する手がかりになるかもしれない。

本研究ではマウス EG 細胞樹立条件を基にウサギにおける *in vitro* での PGC 培養及び EG 細胞の樹立を試みた。まず、マウス EG 細胞樹立と同じ条件でウサギ PGC を培養したところ、ウサギ PGC 由来コロニーが得られた。そこで、次に、培養系の改良を目的にウサギ PGC 培養には LIF、bFGF、Forskolin の有効性を検討した。その結果、LIF、bFGF、Forskolin を添加することによってアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性陽性コロニー数が増加し、ウサギ PGC 培養においても有効であったことが示唆された。また、得られたコロニーを免疫化学的手法によって評価したところ、マウス EG 細胞と同様に ALP 活性、OCT-4、SSEA-1 の発現が確認された。さらにこれらの細胞の分化能を評価するため胚様体、テラトーマ形成の確認を誘起したところ、マウス EG 細胞と同様に胚様体様構造の形成は見られた。しかし、SCID マウスへの移植を行なった結果、テラトーマの形成は確認されなかった。

今回得られた細胞は、未分化細胞マーカーである ALP、OCT-4、SSEA-1 を発現し、胚様体様構造の形成能を有していたがテラトーマの形成能は示さなかったことから、PGC から EG 細胞への過渡期の細胞ではないかと考えられる。

### 1. 結 論

PGC はマウスで 7 day post coitam (dpc) 胚後端部の尿膜基部に数十個程度の ALP 活性陽性細胞集団として出現する<sup>(3)</sup>。その後、PGC は急速に増殖しながら 9.5dpc では腸間膜、10.5dpc では生殖巣原基 (生殖隆起) へと移動し、13.5dpc までにその数は約 25000 にもなる<sup>(4)(5)</sup>。13.5dpc になると PGC は一旦分裂が停止し、雄では体細胞分裂期に入り精巣を形成し、雌では減数分裂期に入る。また、PGC では移動期から定着期にかけてインプリンティング遺伝子の脱メチル化が起きる。マウスのインプリンティング遺伝子には *Igf2r*、*H19* などがあり、インプリンティング遺伝子によって脱メチル化の開始時期はことなるが、*Igf2r* では、11.5dpc から急激に脱メチル化が始まり、13.5dpc までには完全に脱メチル化が終わる<sup>(6)</sup>。

マウス EG 細胞は PGC を、成長因子を添加した培地で培養することにマウス ES 細胞と似た形態の細胞

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. 三重大学大学院医科学研究科 〒514-8507 三重県津市江戸橋 2 丁目 174 番地

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

4. 大阪市立大学大学院医学研究科 〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3

として出現する<sup>(1)(2)</sup>。PGC 自身はキメラ形成能を示さないが、EG 細胞はキメラ形成能を持ち、生殖細胞系列にも寄与することが確認されている。マウス EG 細胞はマウス ES 細胞と形態的な特徴だけでなく、増殖能、分化能などの性質についても類似点が認められる。異なる点としてはマウス EG 細胞を樹立する際、使用する胚の発生段階によってインプリンティングの消去が一部の遺伝子でおきており、形成されるマウスに形態学的な異常をもたらす<sup>(7)</sup>。

現在までにマウスでは PGC の増殖能を向上させる因子として、gp130 を介して PGC の生存率、増殖性に関与している LIF、様々な細胞に対し遊走や増殖を促進する bFGF、細胞内 cAMP レベルを増加させる Forskolin、Stem Cell Factor (SCF)、レチノイン酸などが報告されている<sup>(1)(8)(9)</sup>。

ウサギではマウスのように PGC の *in vitro* 培養に関する報告がなされておらず、EG 細胞も樹立されていないのが現状である。

## 2. 材料と方法

**マウス EG 細胞、ウサギ PGC 由来細胞の樹立：**8.5-12.5dpc マウス胚から生殖細胞に相当する部分を回収した。回収した部位をトリプシン-EDTA を用いて解離したのち、マイトマイシン C 処理した STO 細胞上に播種し、20ng/ml bFGF、20  $\mu$ M Forskolin 添加 mouse EG (mEG) 細胞培地で培養した。mEG 細胞培地は、Knockout DMEM [GIBCO] 78ml に、KSR [Knockout Serum Replacement for Embryonic Stem Cells; GIBCO] 20ml、L-Glutamine 水溶液 6ml、Non-Essential Amino Acids Solution [GIBCO] 1ml、2-Mercaptoethanol [GIBCO] 182  $\mu$ l、Sodium pyruvate [GIBCO] 0.5ml 加え、フィルター滅菌後、ESGRO [CHEMICON] 1000U/ml 加えて作製した。L-Glutamine 水溶液は超純水 100ml に対し、L-Glutamine [SIGMA] 2.292 g 加え調製した。培地は毎日交換した。培養 6 日目に新たな STO 細胞上に継代培養し、マウス EG 細胞を樹立した。ウサギもマウスと同様に 9.5dpc 胚から生殖細胞に相当する部分を回収し、mEG 細胞培地、LIF 非添加 mEG 細胞培地、10、20ng/ml bFGF 添加 mEG 細胞培地、20ng/ml bFGF、20、40  $\mu$ M Forskolin 添加 mEG 細胞培地で培養した。

**アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色：**得られたマウス EG 細胞、ウサギ PGC 由来細胞を 99% エタノールで -20℃、5 分、70% エタノールで -20 度、5 分の条件で固定した。染色は AS-BI 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。

**免疫染色：**得られたマウス EG 細胞、ウサギ PGC 由来細胞を 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。

**胚様体形成の誘導：**マウス EG 細胞をコンフルエントな状態になるまで培養を行い、トリプシン-EDTA を加えて個々まで解離し、回収した。その後 10% FBS-DMEM を加えてペトリディッシュに播種した。培地は 2 日毎に交換した。ウサギ PGC 由来細胞を細く引いたガラスパスツールピペットを用いて回収し、10% FBS-DMEM を加えたペトリディッシュに播種した。培地は 2 日毎に交換した。

**テラトーマ形成の誘起：**1 週間浮遊培養行い形成されたマウス胚様体様構造、ウサギ胚様体様構造を SCID マウスの腎臓被膜下に移植した。移植 2 週間後、移植した腎臓を摘出し、Tissue-Tek O.C.T.Compound、Tissue-Tek Cryomold を用いて凍結ブロックを作製した。

**HE 染色：**凍結ブロックより凍結切片を作成後、10% 中性ホルマリンを用いて固定した。その後、定法を用いて HE 染色を行った。

### 3. 結 果

LIF、bFGF 添加によるウサギ ALP 活性陽性コロニー数の変化を検討の結果、LIF 添加、非添加区の両区において 10ng/ml bFGF、20ng/ml bFGF と濃度依存的に ALP 陽性コロニー数が増加する傾向にあった。また、LIF は添加、非添加時において ALP 陽性コロニー数が大きく変化しなかったが、bFGF と共に添加することによって、ALP 活性陽性コロニー数が増加する傾向にあった。LIF 添加、20ng/ml bFGF において最も多くの ALP 陽性コロニーが得られた (図 1)。

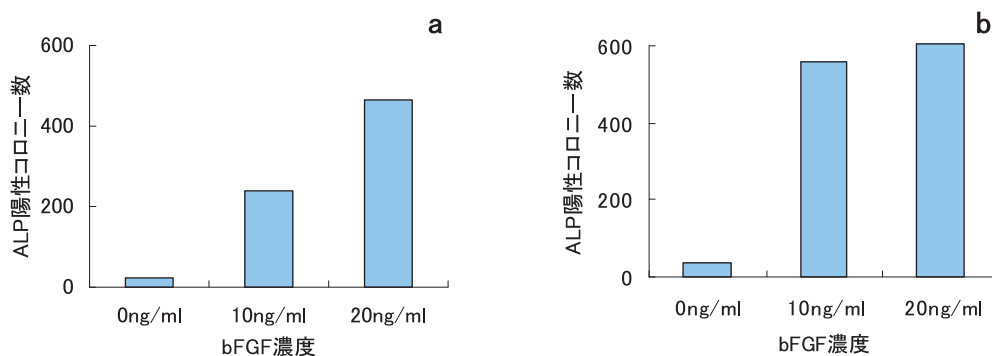


図 1. LIF、bFGF 添加によるウサギ ALP 陽性コロニー数の変化  
(a) LIF 非添加、(b) LIF 添加

Forskolin 添加によるウサギ ALP 活性陽性コロニー数の変化は、LIF、bFGF 添加による検討を基に、LIF、20ng/ml bFGF 添加の条件に加え 0、20、40  $\mu$ M の Forskolin を添加して検討した。その結果 20ng/ml Forskolin 添加において多くの ALP 陽性コロニーを得ることができた。Forskolin 添加によっても ALP 陽性コロニー数が増加する傾向が見られたが 40ng/ml Forskolin 添加では 20ng/ml Forskolin 添加より ALP 陽性コロニー数が減少する傾向が認められた (図 2)。

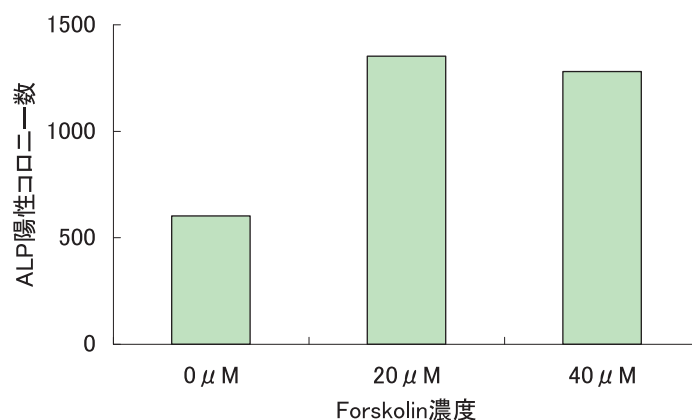


図 2. Forskolin 添加によるウサギ ALP 陽性コロニー数の変化

今回得られたウサギ PGC 由来細胞の免疫化学的手法を用いて評価した結果、未分化細胞マーカーである ALP 活性、OCT-4、SSEA-1 を発現していることが明らかとなった（図 3）。

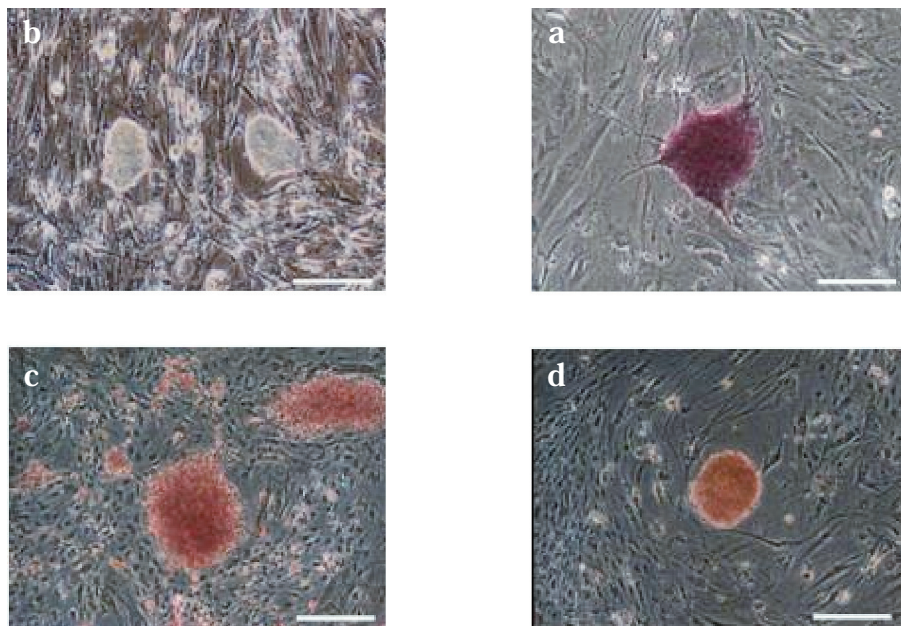


図 3. ウサギ PGC 由来細胞の免疫化学的手法を用いた評価  
 (a) 位相差像、(b) ALP 染色像、(c) OCT-4 抗体を用いた免疫染色、  
 (d) SSEA-1 抗体を用いた免疫染色 Scale bar = 100  $\mu$ m

ウサギ PGC 由来細胞は非接着培養によって胚様体様構造を形成したが、SCID マウスの腎臓被膜下への移植を行ってもテラトーマの形成は認められなかった。（図 4）。



図 4. ウサギ PGC 由来細胞由来胚様体様構造  
 Scale bar = 200  $\mu$ m

#### 4. 考 察

ウサギを用いて PGC の *in vitro* 培養、EG 細胞の樹立を試みた結果、LIF 添加、20ng/ml bFGF、20  $\mu$ M Forskolin 添加の条件において最も多くの ALP 活性陽性コロニーを得ることができた。このことから、マウス同様<sup>(1)(9)</sup>、ウサギにおいても LIF、bFGF、Forskolin が PGC の生存数、増殖性の向上に有効である



と考えられた。今回の研究で設定された培養系により、ウサギにおいても *in vitro* での PGC の培養が可能である事、さらに、成長因子の添加によって生存率、増殖性を向上させることが可能であると考えられる。

LIF 添加、非添加における ALP 陽性コロニー数は大きな差が認められなかった。マウスにおいて移動期の PGC には gp130 を介した増殖の効果は少ないが、定着期の PGC では効果があるという報告がある<sup>(10)</sup>。今回用いたウサギ 9.5dpc 胚は形態的にマウス 8.5dpc 胚に相当する形態をしていること、本実験では腸間膜と尿膜基部を回収していることから移動期の PGC である可能性が高い。そのため、マウスのように LIF 添加、非添加で大きな差がなかったと考えられる。しかし、bFGF と共に添加することによって ALP 陽性コロニー数が増加したことから、LIF シグナル経路と bFGF 経路に何等かの関連があるのかもしれない。

一方で、bFGF、Forskolin 両方を添加することによって相加的に ALP 活性陽性コロニー数が増加したことから、これらのシグナル伝達経路は並行して機能している可能性が考えられる。

Forskolin は 20 $\mu$ M の濃度で添加することによって ALP 陽性コロニー数の増加に効果があったが、40 $\mu$ M では ALP 陽性コロニー数が減少した。本実験では Forskolin を作製する際に、溶媒として DMSO を用いている。DMSO は未分化細胞において中胚様由来細胞、内胚様由来細胞の分化誘導因子としてよく用いられており、今回はその影響により ALP 陽性コロニー数が減少したものと考えられる。

今回の培養で得られたウサギ PGC 由来細胞は ALP 活性、OCT-4、SSEA-1 を発現しており、胚様体様構造も形成する、マウス EG 細胞に類似した性質を持つ細胞株であった。しかし、SCID マウス腎被膜に移植したところテラトーマの形成は確認できなかった。

*In vitro* での分化能力に関してマウス EG 細胞とは異なる性質を有していたことから、我々が分離、培養した細胞は PGC から EG 細胞への過渡期にある細胞である可能性が考えられた。マウスでは、LIF を添加し、SCF を発現する支持細胞、細胞内 cAMP レベルを増加させる Forskolin などを添加することによって効率よく EG 細胞が得られており、<sup>(10)</sup> PGC から EG 細胞への変化には cAMP やレチノイン酸レセプターを介した経路が関与しているという可能性が示唆されている。

今回の研究において、マウスと同様の成長因子が PGC の生存率、増殖性に影響を及ぼしたことから、ウサギに関しても cAMP やレチノイン酸レセプターを介した経路が関与しているのかもしれない。しかし、ウサギに関しては cAMP レベルを増加させるだけでは EG 細胞の樹立にまでには至らず、得られた細胞は継代するにつれて分化が進んでいるように見られた。今後はウサギ PGC 由来細胞に対して分化を抑制できる因子の検討と共にマウスでも報告されている、レチノイン酸やオンコスタチン M など他の成長因子も検討する必要があり、その際に、*in vitro* の PGC の増殖性についても考慮して成長因子の影響を検討する必要があると考えられる。

## 参 考 文 献

- 1 . Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B. L (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, pp. 841-847.
- 2 . Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., Donovan, P. J. (1992) Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359, pp. 550-551.
- 3 . Ginsberg, M., Snow, M. H. L., and McLaren, A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110, pp. 521-528.
- 4 . Mintz, B., Russell, E. S. (1957) Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J. Exp. Zool*, 134, pp. 207-230.
- 5 . Tam, P. P., Snow, M. H. (1981) Proliferation and migration of primordial germ cells during

- compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, pp. 133-147.
- 6 . Sato, S., Yoshimizu, T., Sato, E., Matsui, Y. (2003) Erasure of methylation imprinting of *Igf2r* during mouse primordial germ-cell development. *Molecular reproduction and development*, 65, pp. 41-50.
  - 7 . Labosky, P. A., Barlow, D. P., Hogan, B. L. (1994) Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (*Igf2r*) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*, 120, pp. 3197-3204.
  - 8 . Koshimizu, U., Watanabe, M., Nakatsuji, N. (1995) Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. *Developmental Biology*, 168, pp. 683-685.
  - 9 . Dolci, S., Pesce, M., DeFelici, M. (1993) Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on *in vitro* proliferation of mouse primordial germ cells. *Molecular reproduction and development*, 35, pp. 134-139.
  10. Koshimizu, U., Taga, T., Watanabe, M., Saito, M., Shirayoshi, Y., Kishimoto, T., Nakatsuji, N. (1996) Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells *in vitro* and derivation of embryonic germ (EG) cells. *Development*, 122, pp. 1235-1242.
  11. 岡田益吉、長濱嘉孝、中辻憲夫. 生殖細胞の発生と性分化、(2000) 共立出版.

## 英文要旨

Culture of Rabbit Primordial Germ Cells and induction  
of Embryonic Germ Cell-like cells.

Ryo Kakegawa<sup>1</sup>, Takeshi Teramura<sup>2</sup>, Toshiyuki Takehara<sup>3</sup>, Kazuya Matsumoto<sup>1</sup>,  
Kazuhiro Saeki<sup>1</sup>, Kayo Yoshida<sup>4</sup>, Takashi Morita<sup>4</sup>, Akira Iritani<sup>1</sup>,  
Norimasa Sagawa<sup>2</sup> and Yoshihiko Hosoi<sup>1</sup>

## Abstract

Embryonic germ (EG) cells are undifferentiated stem cells isolated from cultured primordial germ cells (PGC). Murine EG cells share several characteristics with embryonic stem (ES) cells, including morphology, pluripotency, and the capacity for germline transmission. So, the EG cells are an alternate way of ES cells for genetic modification through homologous recombination in animals of which ES cells have not established or there are many difficulty in cultures or handling. And also the cells are valuable source for the study of genomic imprinting occurred in germ cell development. To date, EG cells have been isolated in some animals including humans, but still not in rabbit. To optimize the conditions for the culture of rabbit EG cells and the establishment of rabbit EG cells, we cultured the PGCs *in vitro* with various combinations of leukemia inhibitory factor [LIF], basic fibroblast growth factor [bFGF]) and forskolin on inactivated STO feeder layers. As a result, these factors improved the PGC proliferation in early cultures also in rabbit and were effective to induce EG like colonies. After histochemical/immunocytochemical evaluation of the EG like colonies, the cells expressed alkaline phosphatase activity, OCT-4 and SSEA-1. But the EG like cells did not developed teratoma when injected in kidney capsule of SCID mice, although formed embryoid bodies *in vitro*. From these characteristics, we supposed that the present cells were between PGCs and EG cells.

---

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

2. Graduate School of Medicine, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan

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

4. Department of Molecular Genetics, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Osaka 545-8585, Japan