

マウス ES 細胞(C57BL/6×129 ter)からの生殖細胞への分化誘導の検討

武内 大輝¹、寺村 岳士²、川田 延幸¹、
松本 和也³、佐伯 和弘³、佐川 典正²、細井 美彦³、入谷 明³

要旨

胚性幹細胞(ES 細胞)は分化多能性を有したまま、自己複製を行う細胞であり、再生医療の材料として注目されている。ES 細胞から生殖細胞への分化誘導は、生殖細胞形成機構の解明に繋がるだけでなく、組織再生研究の観点からも有益であると考えられる。

本研究では、マウス ES 細胞を浮遊培養系と接着培養系で分化誘導し、マーカー遺伝子(Oct4、Nanog、Mvh、Stella、Fragilis)の発現量推移の違いの観察を目的とした。浮遊培養系による分化誘導において、Stella 遺伝子の発現は低下していたが、Mvh 遺伝子の発現は上昇傾向にあった。接着培養系において、Stella 遺伝子の発現は減少した後、再び上昇に転じており、Mvh 遺伝子の発現は分化誘導後 8 日目あたりまで上昇した後、減少に転じる傾向が確認された。

Stella は母性由来因子であり、卵巣で特に強い発現を示すことが報告されており、Mvh 遺伝子は精巣で特に強い発現を示すことが報告されていることから、浮遊培養系においては精子への分化誘導の傾向が、接着培養系においては卵子分化誘導の傾向が示唆された。

1. 結論

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝達するための重要な役割を担っている。多くの動物種の生殖細胞は、母性因子によって運命を決定されることが確認されている。しかし、哺乳類では母性由来の生殖細胞質の存在は観察されない。生殖細胞の形成には胚体外組織からのいくつかの誘導因子を必要とし、胚の着床直後に生殖細胞が形成される⁽¹⁾。

ショウジョウバエでは、様々な生殖細胞特異的な関連遺伝子(Oskar, Nanos, Vasa など)が同定されている⁽²⁾。それら遺伝子の中で Vasa 遺伝子は特に生殖細胞に特異的な遺伝子として知られている。Vasa 遺伝子は ATP 依存性 RNA ヘリカーゼをコードする DEAD box ファミリーの 1 つであり、線虫、ツメガエル、ゼブラフィッシュ、マウスでもホモログが取られている⁽³⁾。尚、これら Vasa ホモログ遺伝子のすべては生殖細胞系列で特異的に発現している^(4,5)。

近年、浮遊培養系による精子の分化誘導⁽⁶⁾、接着培養系による卵子の分化誘導が報告された⁽⁷⁾。ES 細胞からの生殖細胞誘導の際、他の系譜の細胞と生殖細胞とを特異的に見分けるマーカーが重要であるが、Vasa 遺伝子はその中心的なマーカー遺伝子であり、分化誘導時間に対する詳細なプロファイルの決定は重要であると考えている。

2. 材料と方法

ES 細胞の樹立：出生より 4 週齢以降の B6129ter F1 マウスに 7.5IU の PMSG、hCG を施し、過剰排卵を誘起した。hCG 投与から 6 週齢以降の雄マウスと交配させ、受精後 1 日で 3mg/ml BSA 含有 M2 medium を用いて卵管を灌流することで胚盤胞期胚を回収した。これらの卵子を mKSOM 培養液内に移し、37°C・5%CO₂、5%O₂ で胚盤胞期胚まで培養した。

原稿受付 2006 年 6 月 20 日

1. 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. 三重大学大学院医学研究科, 〒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

胚盤胞期胚を 0.5%Pronase (Roche) で透明体を剥離した後、抗マウス脾臓・モルモット抗血清 20%を含む DMEM(10%FBS 添加)培地で 30 分間培養した。続いてこれら胚を 20%モルモット補体を含む DMEM 培地に移し、抗原抗体反応によって胚体外胚様を除去した。単離した内部細胞塊はマイトマイシン C (Sigma) 処理をしたマウス胎児性繊維芽細胞上で培養した。以下の樹立は定法通りに行い、得られた ES 細胞はセルバンカー (日本全薬工業) に懸濁し、 -80°C で保存した。

アルカリフォスファターゼ解析: コンフルエントになる前の ES 細胞を 99%エタノールで固定した。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。

核型解析: ES 細胞は $10\mu\text{g/ml}$ のコルセミド (Sigma) で培養し、細胞分裂中期に同調させたものを使用した。これらの細胞を 0.56%KCl で低張処理し、酢酸メタノールで固定したものを標本とした。以下の染色は定法通り行った。

浮遊培養: ES 細胞を培養し、コンフルエントになったら、0.25%Trypsin /0.04%EDTA-PBS(-)加え個々まで乖離させ、回収した後 10%FBS-DMEM を加えて 35mm ペトリディッシュに細胞数が $1.6\times 10^6\text{cell/ml}$ になるように播いた。培地は 2 日毎に交換した。

接着培養: ES 細胞を培養し、コンフルエントになったら、0.25%Trypsin /0.04%EDTA-PBS(-)加え個々まで乖離させ、回収した後 10%FBS-DMEM を加えて、ゼラチンコート処理をした 35mm 細胞培養用ディッシュに細胞数が $1.6\times 10^6\text{cell/ml}$ になるように播いた。培地は 2 日毎に交換した。

免疫染色: コンフルエントになる前の ES 細胞と、接着誘導サンプルの 2、6、12 日目を用いた。4%パラホルムアルデヒドで固定したものをを用いた。免疫染色は定法通り行った。本実験用いた抗体は抗 Oct-4 抗体、抗 SSEA-1 抗体、抗 Mvh 抗体である。尚、SSEA-1 は HRP 標識で行った。

RT-PCR: 誘導した細胞は、トリプシン処理後に速やかに液体窒素で凍結し、totalRNA 精製のためのサンプルとした。精製は TRizol Reagent (Invitrogen) を用いて行き、cDNA 合成は SuperScript III First-strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen) を使用した。尚、PCR には以下のプライマーを使用した。

Oct-4	F	5'-TGGAGACTTTGCAGCCTGAG-3'
	R	5'-CATACTCTTCTCGTTGGGAATA-3'
Nanog	F	5'-AACTCTCCTCCATTCTGAAC-3'
	R	5'-ATTTACCTGGTGGAGTCAC-3'
Mvh	F	5'-TGCCTTTGCTCCGCACCAT-3'
	R	5'-TCTCGTCCTGCTAATAACAATG-3'
Stella	F	5'-CAGCCGTACCTGTGGAGAAC-3'
	R	5'-AGCCCTGGGGCCTCACAGCTT-3'
Fragilis	F	5'-TGCTCCGCACCATGAACCAC-3'
	R	5'-GTGAAGCACTTCAGGACCGG-3'

半定量解析: 解析には BIO RAD 社の画像解析ソフトである Quantity One @を使用して、各遺伝子の半定量を行った。

3. 結果

今回の実験では、培養した ICM 48 個から 40 ラインの ES 細胞を樹立した(表 1)。以降これらのラインの内 5 番目を選択し、実験を行った。

表 1 C57BL/6×129ter F1 マウス由来 ES 様細胞株の樹立効率

	培養ICM数	ICMコロニー数(%)*	細胞株樹立数(%)*
C57BL/6×129ter F1	46	40 (86)	40 (86)

*/培養ICM数

使用した ES 細胞はアルカリフォスファターゼ活性が陽性で、OCT4、SSEA-1 の発現が確認できた。10 回の継代後に核型解析を行ったところ、58%が正常核型を維持していた。また SCID マウス大腿部皮下に注入するとテラトーマを形成した。

この ES 細胞株を用い、浮遊培養と接着培養による生殖細胞への分化誘導における経時的な RT-PCR、半定量解析を行った。

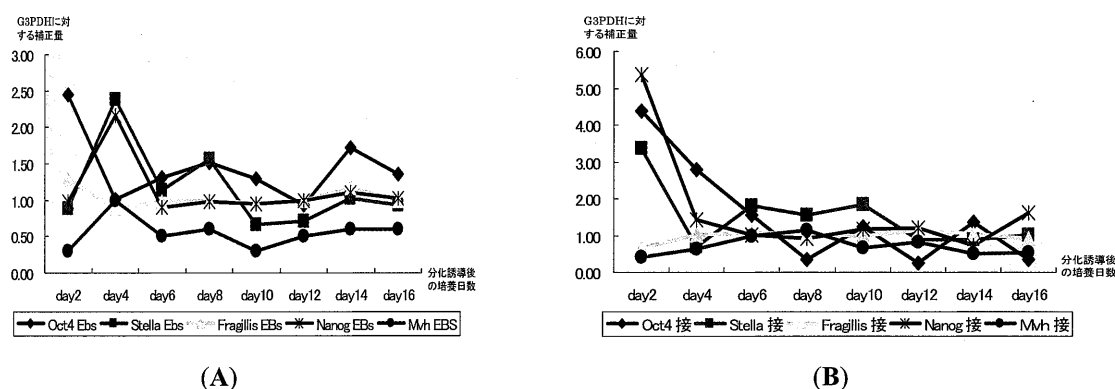


図 1 各マーカー遺伝子の RT-PCR による経時的半定量解析

A : 浮遊培養の各マーカー遺伝子の RT-PCR による経時的半定量解析
B : 接着培養の各マーカー遺伝子の RT-PCR による経時的半定量解析

接着誘導サンプルの半定量解析の結果、*oct4*、*nanog* の発現は一度減少に向かうが、発現は維持された。*stella* の発現は減少していた。*oct4*、*nanog* の発現量の減少に伴い *mvh* の発現量は上昇に向かうが、10 日目を以降は減少に転じた。一方で *fragillis* の発現量にはあまり変化が見られなかった。浮遊培養サンプルの半定量解析の結果、*oct4* の発現の減少に伴い、母性因子である *stella* の発現の低下、*mvh* の発現の上昇が確認された。接着培養系においては *oct4* の発現の減少に伴い、母性因子である *stella* の発現の低下、*mvh* の発現の上昇が確認されたが、*stella* は再び上昇に転じる傾向が、*mvh* の発現は減少する傾向が確認された。また *fragillis* の発現は維持されていた(図 1)。

免疫染色の結果、分化誘導後 OCT4 タンパク質の発現は培養期間が経過するにつれて発現量が減少した。MVH タンパク質の発現は培養期間の経過とともに発現量が上昇し、また初期はシグナルが散在していたが、局在するようになった(表 2)。

表 2 浮遊培養と接着培養における各抗体の免疫染色による解析

	浮遊培養			接着培養		
	Day2	Day6	Day12	Day2	Day6	Day12
OCT4	+++	++	+	+++	++	+
MVH	+	++	+++	+	++	+++

4. 考察

本研究において、B6129ter F1 マウスに由来する新規の ES 細胞株の樹立に成功した。5 番の ES 細胞株について、未分化マーカー遺伝子群である Oct4、Nanog 遺伝子及び SSEA-1 タンパク質の発現が確認された。また teratoma や胚様体の形成が可能であったことから分化多能性を有している可能性が示唆された。

分化誘導後、分化開始とともに未分化維持に関与する遺伝子の発現の減少とともに生殖細胞特異的遺伝子である Mvh 遺伝子の発現が誘起されることが確認された。また両培養系どちらにもいえることではあるが、検体の回収に際し、培地の交換を行っているため、全分化誘導区において細胞数が一定ではないこと、また形態的な差異も多いことに留意が必要である。しかし上記のような条件が、複数の分化細胞を混在させ、Mvh 遺伝子発現細胞の出現に貢献したと考えられる。実際マウスにおいて VASA タンパク質は 9.5~10.5dpc の生殖隆起に到達した始原生殖細胞(Primordial Germ Cells : PGCs)で初めて確認でき、さらに Vasa 陽性細胞群の出現期間は一定ではない。このことから、分化誘導した細胞で Mvh 遺伝子の発現量が最大となる期間が 4~8 日目にはばらつきがあったと示唆される。発現量が最大になった後、減少に転じることは生殖隆起に到達した PGCs の中でもアポトーシス等により死滅する細胞が存在するためであり、再び発現量が上昇に転じたり安定したりすることから、更なる PGCs の発生、PGCs の細胞群の中でさらなる Mvh 遺伝子の発現が行われ、死滅と新規の Mvh 遺伝子発現が行われている可能性が示唆される。また接着培養系における分化誘導細胞の蛍光免疫組織化学的解析は、胚様体においても VASA タンパク質の局在化は報告されており⁽⁸⁾、接着培養による分化誘導細胞においても胚様体と同じような傾向が確認できた。

Fragillis, Stella, Mvh 遺伝子の発現量の間には正確な相関性は確認できないが、Fragillis 遺伝子を最も高く発現する細胞群が Stella 遺伝子を発現し、この発現獲得で PGCs の運命が決定されるとされている。よってこの両遺伝子の発現がなければ PGCs 後の細胞運命が決定しないことから鑑みて、Mvh 遺伝子の発現には一定量の Fragillis, Stella 遺伝子の発現が必要と考えられる。今回の実験においても、Fragillis, Stella 遺伝子が一定量発現しているという報告と合致した。Stella 遺伝子は母性由来因子であり、卵巣で特に強い発現を示すことが、Mvh 遺伝子は精巣で特に強い発現を示すことが知られており、浮遊培養系においては精子への分化誘導の傾向が、接着培養系においては卵子分化誘導の傾向が示唆された。また今回 Teratoma においてもこれら 3 つの遺伝子が発現していた。Fragillis, Stella 遺伝子の発現についてはすでに報告⁽⁹⁾があり、teratoma 内において ES 細胞や胚様体のような分化多能性を持つ細胞群が存在する可能性が示唆される。

浮遊培養系による生殖細胞系列への分化誘導を考える際、胚様体内での PGCs 様細胞の形成は、胚様体という複数種の分化細胞が混在した状態を維持していることから可能になったと考えられる。特に PGCs の形成には BMP シグナル群の刺激が決定的な因子となることから、胚様体内に生じた BMP 産生細胞からの作用により隣接した細胞の生殖細胞への分化が誘起されたと考えられる。接着細胞系による生殖細胞への分化誘導を考えた際もこのようなことが考えられる。今後、PGCs 以降に分化ステージを進行させるために、細胞接着や成長因子、ホルモン産生細胞との包括的な分化誘導が必須であると考えられる。今回得られた接着培養系による知見は、接着培養での分化誘導を考える際、参考になると考えられる。接着培養による培養系においては、培養した細胞は形態的変化の観察、細胞の単離、成長因子の効果が均一になるといった利点がある。生殖細胞のような複雑な分化過程を経る細胞の分化誘導には接着培養系による誘導系は有効であると考えられる。しかし三次元的な構造を形成できない欠点もあるため、時期特異的に使用することが最適であると考えられる。

今後、生殖細胞の形成を考慮する際、生殖原細胞後の分化に必須である減数分裂に特異的に発現する遺伝子による解析を行う必要があると考えられる。解析後、減数分裂を開始し始めている分化誘導細胞を器官培養系もしくは組織に移植し、解析する必要があると考えられる。

参考文献

- (1) 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.
- (2) Liang, L., Diehl-Jones, W. and Lasko, P. (1994) Localization of *vasa* protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120, 1201-1211.
- (3) Fujiwara, Y., Komiya T., Kawabata, H., Satoh, M., Furusawa, M. and Noce, T. (1994) Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila *vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*91, 12258-12262.
- (4) Tanaka, S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M. and Noce, T. (2000) The mouse homolog of Drosophila *Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841- 853.
- (5) Noce, T., Okamoto-Ito, S. and Tsunekawa, N. (2001) *Vasa* Homolog Genes in Mammalian Germ Cell Development. *Cell Struct. Funct.* 26, 131-136.
- (6) Toyooka Y., Tsunekawa, N., Akasu, R. and Noce, T. (2003) Embryonic Stem cells can form germ cells in vitro, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*100, 11457-11462.
- (7) Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L. K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strass J. F. III, Boiani, M. and Scholer, H. R. (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251-1256.
- (8) Hatano, S., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Tada, T. (2005) Pluripotential competence of cells associated with *Nanog* activity. *Mechanisms of Development* 122, 67-79.
- (9) Gordeeva, O., Zinovieva, R., Smirnova, Y., Payushina, O., Nikonova, T. and Khrushchv, N. (2005) Differentiation of embryonic stem cells after transplantation into peritoneal cavity of irradiated mice and expression of specific germ cell genes in pluripotent cells. *Transplantation Proceedings*, 37, 295-298.

英文抄録

Examination of Floated Culture and Adhesived Culture in Spontaneous Differentiation of Germ Cells from Mouse Embryonic Stem Cells

Hiroki Takeuchi¹, Takeshi Teramura², Nobuyuki Kawata¹,
Kazuya Matsumoto³, Kazuhiro Saeki³, Norimasa Sagawa², Yoshihiko Hosoi³ and Akira Iritani³

Embryonic stem cells (Esc), the cells have pluripotent and self-renewal, is very important technique for developmental engineering and genetic engineering such as gene targeting. Differentiation of germ cells from mouse Esc were to determinate the formation mechanism of germ cells and were very useful for reproductive assistance medicine. This study examined spontaneous differentiation of germ cells from Mouse Esc which was established from C57BL/6×129ter mouse

In this experiment, we established Esc of 16 lines (establishment rate:53%) with a popular method. As it was possible that mouse derived from C57BL/6×129ter Esc was produced by Tetraploid complementation method, we decided that this cells were Esc lines with pluripotency.

Vasa, in which expressed at an early germ cells formation stage and homeobox gene of *Drosophila*, was identified homolog in mouse. (Mouse *Vasa* Homolog;Mvh, 1994.Noce, et al) In this study, we used the early stage which *Vasa* express as a barometer that germ cells was formed.

As the sample of differentiation, we used embryoid body(EBs) that differentiated Esc in floated Culture and cells that differentiated Esc on a cell culture dish. We carried out RT-PCT with total RNA of samples mentioned above (day2, 4, 6, 8, 10, 12), teratoma, and testis, ovary, muscle of C57BL/6 adult mouse. As a result, with progress of differentiation, Mvh expression has risen and expression of *Stella* and *Fragillis*, germ cells related gene, has stated. In teratoma, *Mvh*, *Oct3/4*, *stella*, and *Fragillis* expression has objected. From these genes expression has risen by progress of differentiation, it suggests possibility that the cells like germ cells was generated in this differentiation method. We are examining immnocytochemictry method and analysis on qualitative RT-PCR.

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

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

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