

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650229

研究課題名（和文） ラット Nanog 遺伝子を用いたラット ES 細胞の開発

研究課題名（英文） Development of rat ES cells carrying rat Nanog reporter gene

## 研究代表者

杉山 文博 (SUGIYAMA FMIHIRO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：90226481

研究成果の概要（和文）：申請者は生殖系列移行ラット ES 細胞の樹立研究のため、ラット Nanog 遺伝子制御下で蛍光タンパクおよびピューロマイシン耐性遺伝子を発現する BAC 遺伝子改変ラットの作製に成功した。さらに、Long Evans ラット ES 細胞を用いた前記 BAC 遺伝子導入において外来性 BAC が相同組換えによりゲノムに導入されていることが明らかとなり、ラット ES 細胞での相同組換え方法において BAC の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the establishment of germline-competent rat ES cells, BAC transgenic rats carrying Venus gene and puromycin-resistant gene under the control of rat Nanog gene were generated successfully. Furthermore, we showed that the BAC DNA was inserted into a single endogenous Nanog allele in rat ES cells, suggesting the usefulness of BAC homologous recombination in rat ES cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ラット、ES 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ES 細胞 特にマウス由来の細胞は個体レベルにおける遺伝子機能解析や再生医療の基礎研究のために必須な実験資材である。我々はノックアウトマウスを毎年約 20 系統以上作製し、そのための近交系マウス ES 細胞も独自で開発してきた。それら ES 細胞はナショナルバイオリソースに寄託し、多くの研究に役立っている。特に、ノックアウトマウス作製には ES 細胞の効率的な生殖系列移行能力が極めて重要である。

(2)ラット ES 細胞 は樹立が困難であったが、

マウス ES 細胞研究より複数の細胞内シグナル分子のインヒビターを用いることにより樹立が可能となってきた。しかし、ラット ES 細胞はマウス ES 細胞より倍加時間が遅く、形態や接着性等も異なり、ノックアウトラット作製のため生殖系列移行能力の高い ES 細胞樹立方法を更に検討する必要がある。

(3)Nanog はマウス ES 細胞に多能性という独自の性質を与える主要な因子として発見された。ES 細胞における Nanog 発現は動的であり、発現抑制は分化へのコミットメントへ傾くこと、エピプラスト幹細胞から ES 細

胞への可塑性において Nanog 発現が重要であることがマウスの研究から明らかとなってきた。従って、多能性を保有するラット ES 細胞樹立の検討においてラット Nanog 遺伝子発現をモニターすることは極めて有用な手段となることが予測される。

## 2. 研究の目的

(1) 医学・生物学研究において ES 細胞は重要なバイオリソースである。リソースから入手可能なマウス ES 細胞はあるが、ラット ES 細胞はない。最近ラット ES 細胞樹立やノックアウトラット作製が僅かに報告され始めたが、ノックアウトラット作製のためには生殖系列移行能力が高い ES 細胞が必要であり、更にラット ES 細胞の特徴を十分に理解する必要である。

本計画は、ラット多能性細胞が可視化及び薬剤選別可能なラット Nanog 遺伝子改変ラットを作製し、多能性細胞の可視化を初期胚から成体まで組織レベルで検討し、ラット Nanog 遺伝子発現を基盤とした可視化と薬剤選別を利用し ES 細胞樹立やキメララット作製方法の検討を行い、ノックアウトラット作製のため最適なラット ES 細胞生殖系列移行の環境を整備するための検討を行う挑戦的研究である。

## 3. 研究の方法

(1)ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラットを作製

過排卵処置した WIAR (Wistar Imamichi (WI) の近交系)ラット受精卵に断片化したラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子をマイクロインジェクションし、偽妊娠させた WI ラットの卵管に移植する。出産した子孫は genotyping を行い、ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ファウンダーラットを同定する。

(2)ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラットにおける外来性ラット

Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子発現

ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラットにおける外来性

Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子の発現を Venus の蛍光により初期胚、胎児、成体と経時的に組織レベルで解析し、上記内在性 Nanog 遺伝子発現と比較検討する。

(3) ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラット胚盤胞を用いたラット ES 細胞樹立

過排卵処置後自然交配させたラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラット

より胚盤胞を回収し、マウス胎児線維芽細胞上で培養・継代する。培養液には細胞内シグナル分子インヒビター (GSK3 インヒビター: CHIP99021、MEK インヒビター: PD0325901) を添加し、ES 細胞の多能性を Venus 蛍光のモニターしながら、ES 細胞の樹立を検討する。

(4) Long Evans ラット胚盤胞からのラット ES 細胞樹立と相同組換えによるラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子導入 ES 細胞の樹立

過排卵処置後自然交配させた野生型 Long Evans ラットより胚盤胞を回収し、マウス胎児線維芽細胞上で培養・継代する。培養液には細胞内シグナル分子インヒビター (GSK3 インヒビター: CHIP99021、MEK インヒビター: PD0325901) を添加し、ES 細胞樹立した。

その後、断片化したラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子をエレクトロポレーションにてラット ES 細胞に導入し、Venus 蛍光にてクローニングを実施した。

相同組換えの確認は Nanog BAC DNA をプローブと細胞分裂中期の染色体標本を用いた染色体 FISH 解析によって確認された。

## 4. 研究成果

(1)ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> 遺伝子改変ラットを作製

細菌人工染色体 (BAC) に導入された Long Evans ラットの Nanog ゲノム (78 kb の 5' 遺伝子制御領域、4 つのエクソンと 3 つのイントロンを含む 7 kb、さらにその 3' 側に 108 kb の領域を含む合計 193 kb の Nanog ゲノム領域) の第 1 エクソンに非侵襲的に細胞を可視化するため Venus 遺伝子、さらに IRES を挟みその下流にピューロマイシン耐性遺伝子の挿入を Red/ET 遺伝子組換えシステムにより実施し、Nanog/Venus-puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子を構築した (図 1)。

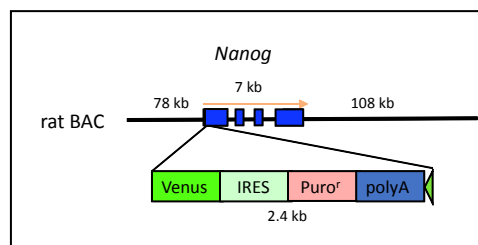


図1. ラット Nanog BAC DNA を相同組み換えたラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> 遺伝子

(2)ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラットにおける外来性ラット

この直鎖化した Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子は過排卵処置後自然交配した WIAR

ラットの受精卵前核へ常法に従い導入した。出産・離乳後 PCR により蛍光タンパクにプライマーを設定し Genotyping を実施した結果、3 匹の Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC ファウンダーラットを同定された。しかしながら、Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC の生殖系移行が確認されたラインは 1 ラインのみであった。そこで、この系統の子孫における外来遺伝子が未分化細胞特異的に Venus を発現させるか検討するため、Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC ラット胚盤胞内部細胞塊を解析した。結果、図 2 に示すように、強い Venus 蛍光が胚盤胞内部細胞塊で観察され、栄養外胚葉では確認されず、Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子が個体レベルで機能することが明らかとなった。

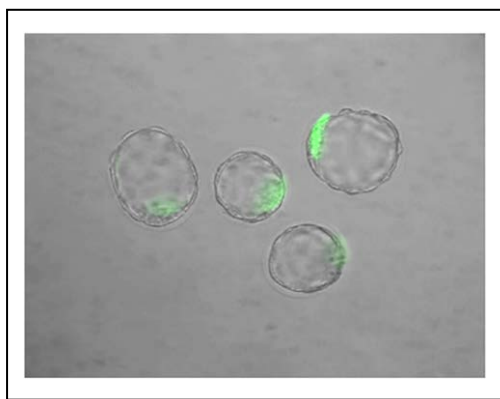


図2. Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラット胚盤胞内部細胞塊における Venus 遺伝子発現

この結果は Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラットは未分化細胞を非侵襲的に可視化できる有用な生物資源であることが示唆された。

### (3) ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラット胚盤胞を用いたラット ES 細胞樹立

次にこの Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC ラット胚盤胞より ES 細胞の樹立を試みた。透明帯を除去したラット胚盤胞は、GSK3 インヒビター (CHIP99021) や MEK インヒビター (PD0325901) および白血病抑制因子 (LIF) が添加されたラット ES 細胞用培養液を用い、マイトマイシン C 処理したマウス胎仔線維芽細胞上で培養された。栄養外胚葉接着後内部細胞塊をメカニカルに剥離させ、分離した内部細胞塊は軽度トリプシン処理したのちマイトマイシン C 処理したマウス胎仔線維芽細胞上に播種した。この方法にて Long Evans ラット胚盤胞より ES 細胞を樹立したところ、図 3 に示すようにラット ES 細胞の樹立に成功した。しかしながら、同様の培養液および樹立方法において Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子改変ラット胚盤胞より ES 細胞樹立を実施したが、内部

細胞塊を播種後、ES 細胞様のコロニー形態が認められなかった。

これらのことは、現在使用されているラット ES 細胞樹立方法は多様なラット系統に対し普遍的な方法ではなく、効率に生殖系列移行する ES 細胞樹立のため更に改良を加えて行く必要があることが明らかとなった。そのひとつとして多能性をモニター可能な本システムは ES 細胞樹立方法や培養液改善方法を検討するため有用であることが再認識された。

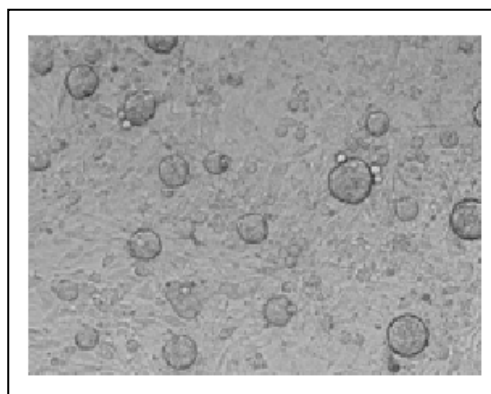


図3. Long Evans ラット胚盤胞から樹立した野生型のラット ES 細胞

### (4) ラット Long Evans 由来のラット ES 細胞を用いた Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子導入 ES 細胞の樹立と BAC 相同組換え

ラット ES 細胞に最適な培養組成を検討するため ES 細胞の未分化能状態を蛍光タンパクにて可視化可能な ES 細胞を作製するため、先の実験にて樹立した Long Evans ラット由来の ES 細胞に Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC DNA 断片をエレクトロポレーション法により導入した。

導入した ES 細胞のコロニーは Venus の蛍光をもとにクローニングを行い、安定して Venus 蛍光を発現する複数のクローンを得た。それらクローンの内、無作為に選別された 1 クローンのみを用いて更に詳細な解析が試みられた。図 4 はそのクローンの蛍光実体顕微鏡観察像である。左が明視野、右が Venus 蛍光像であり、強い Venus 蛍光がラット ES 細胞コロニー全体に検出された。

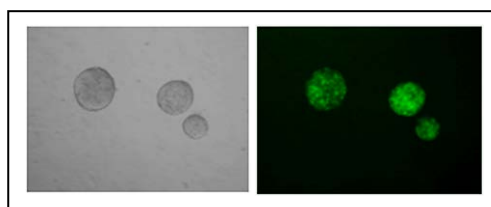


図4. Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子導入 Long Evans ラット胚盤胞から樹立した野生型のラット ES 細胞と Venus 蛍光

このラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子導入 ES 細胞における Venus 蛍光が未分化細胞においてのみ生じているのか検討するため、ES 細胞培養液より未分化維持に係わる CHIP99021、PD0325901 および LIF を除き ES 細胞を培養し、Venus 蛍光の発現を観察した。結果、図 5 に示すように ES 細胞の丸く立体的なコロニー形態が不定型で扁平なコロニー形態へと変化し始め、一部のコロニーは円形を留めていたが、Venus 発現はどのコロニーにおいても激減し検出限界であり、その後完全に消失した。

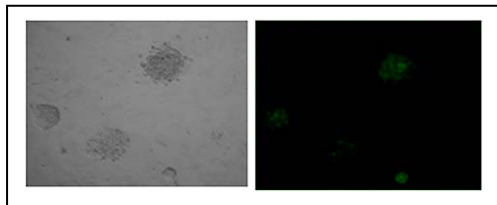


図5. 分化誘導を行った Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子導入 Long Evans ラット ES 細胞と Venus 蛍光

これらの結果より Long Evans ラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 導入 ES 細胞は未分化状態と分化状態を非侵襲的に蛍光モニター可能であり、有用な生物資源となることが示唆された。

マウス ES 細胞において BAC DNA の導入はプラスミド DNA の導入より高頻度に相同組換えを引き起こすことが報告されている。そこで上記 Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 導入 ES 細胞の特徴のひとつを明らかにするため、Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC をプローブとして用いた染色体 FISH 解析を試みた。染色体標本は細胞分裂中期のものを用いた。ラット染色体の正常染色体数は 42 本であり、Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 導入 ES 細胞の 90% の細胞は正常な染色体数 42 本を保有していた。ES 細胞において内在性 Nanog 遺伝

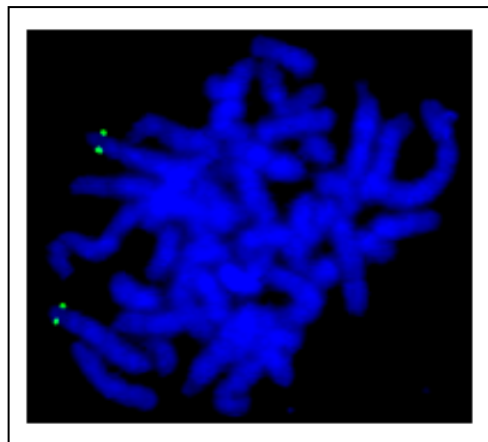


図6. Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC をプローブに用いた Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 導入 Long Evans ラット ES 細胞の染色体 FISH 解析

子は 2 コピー存在する。Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC が無作為に染色体に挿入された場合、FISH 解析では 3 個以上のシグナルが検出されるが、相同組換えが生じた場合、2 個のシグナルのみの検出となることが推察される。図 6 に示すように、Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC ES 細胞では 2 つの第 4 染色体長腕のテロメアに近い部位に各一つのシグナル (合計 2 つのシグナル) が観察され、それ以外のシグナルはどの標本でも観察されなかった。

ラット Nanog は第 4 染色体 q42 (222552995-222560653) に位置する遺伝子である。従ってこの結果は Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC ES 細胞では導入された外来性の Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC が内在性の片側の Nanog 遺伝子と相同組換えを引き起こしたことを示すものであり (図 7)、ラット ES 細胞での相同組換え方法において BAC の有用性を期待される興味深い結果を得ることができた。

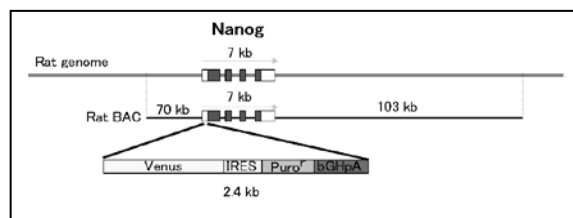


図7. Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC 遺伝子を用いた Long Evans ラット ES 細胞 Nanog 遺伝子の相同組換え

本研究によって作製されたラット Nanog/Venus-Puro<sup>r</sup> BAC ラットはナショナル・バイオリソースプロジェクトに寄託するため準備中である。

## 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 1 件)

- (1) Hasegawa Y, Daitoku Y, Sekiguchi K, Tanimoto Y, Iijima S, Mizuno S, Ema M, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K. Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. 2013, Exp Anim, 62(4): in press、査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

- (1) 飯島沙織, 他, 内在性ラット Nanog 遺伝子発現モニター可能な BAC ベクターの作製、日本実験動物科学・技術 九州 2012、平成 24 年 5 月 24 日、別府コンベンション

センター、別府市

(2) 関口 溪人, 他、Rosa26 遺伝子座への CAG/EGFP-tdsRed 遺伝子挿入による新規 Cre-reporter マウスの開発、日本実験動物科学・技術 九州 2012、平成 24 年 5 月 24 日、別府コンベンションセンター、別府市

(3) Iijima S, et al., Establishment of germline-competent ES cells from NZB/BINJ mice. International Society for Stem Cell Research, 2012/6/13, Pacific Yokohama, Yokohama.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 文博 (SUGIYAMA FMIHIRO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：90226481