

鳥取大学研究成果リポジトリ

Tottori University research result repository

タイトル Title	細胞系譜追跡の組織化学
著者 Author(s)	森, 徹自; 山田, 久夫
掲載誌・巻号・ページ Citation	組織細胞化学 : じっくり学ぶ組織細胞化学の基礎と応用そして未来 : 175 - 188
刊行日 Issue Date	2014
資源タイプ Resource Type	図書 / Book
版区分 Resource Version	著者版 / Author
権利 Rights	注があるものを除き、この著作物は日本国著作権法により保護されています。 / This work is protected under Japanese Copyright Law unless otherwise noted.
DOI	
URL	https://repository.lib.tottori-u.ac.jp/6576

細胞系譜追跡の組織化学

森 徹自、山田 久夫

関西医科大学 解剖学第一講座

キーワード

細胞系譜追跡(fate mapping analysis)

BrdU (5-bromo-2' -deoxyuridine)

ウイルスベクター(viral vector)

トランスジェニックマウス (transgenic mouse)

Cre-LoxP システム(Cre-LoxP system)

CreER^{T2} システム (CreER^{T2} system)

はじめに

近年、ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞を用いた再生医学研究が盛んに行われている。これまでは再生しない器官と考えられてきた成体の中枢神経系においても、内在性の幹/前駆細胞が存在する事が証明され、再生の可能性が示唆されている。内在性幹細胞の賦活化、あるいは iPS 細胞由来の細胞移植による組織修復を最終目的に研究を行う上で、発生学的なアプローチや基礎データが必須であることは言うまでもない。つまり、幹細胞から最終的な臓器の完成に至るまでの細胞移動をも含めた発生・分化機構が明らかになっている必要がある。そのためには、組織特異的幹細胞の分裂増殖、分化、移動を *in vivo* で追跡する細胞系譜追跡(fate mapping)が第一歩になる。これまでに多くの手技が開発され、その度により精度の高いデータが得られてきている。本稿では、やや古い手技から、遺伝子改変動物を使った手技まで、その原理と長所・短所を含めて概説する。中でも、現在汎用される手技である BrdU、ウイルスベクター、Cre-LoxP システムを用いて、発生過程あるいは成体の中枢神経系に存在する神経幹/前駆細胞の細胞系譜追跡実験の実例を挙げて概説する。成体の脳には、良く知られるニューロン新生領域が 2 か所ある。側脳室周囲の subventricular zone (SVZ) と呼ばれている部位と、海馬歯状回の subgranular zone (SGZ) である。成体 SVZ においては、type B 細胞 (ゆっくり分裂増殖する幹細胞、GFAP 陽性) → type C 細胞 (活発に分裂増殖する前駆細胞、EGF 受容体陽性) → type A 細胞 (分裂能を維持しながら嗅球へ移動する前駆細胞、DCX 陽性) と連続的に分化し、type C 細胞と type A 細胞は分裂増殖しながら嗅球へ長い距離を移動し、その大多数は顆粒ニューロンへと成熟する。SVZ や SGZ の神経幹/前駆細胞は、疾患あるいは外傷によって死んだニューロンを補完して脳の機能回復を目指す再生医療の現場でもその応用が期待され、この細胞の増殖・分化に影響を与える因子とその分子機構の解明が急務となっている。本稿では、主にこの

成体 SVZ における内在性神経幹/前駆細胞の細胞系譜追跡を説明モデルとして、事例を挙げて概説する。

従来の手法

1) マーカー分子に対する免疫染色による方法

Doetsch らは、まず SVZ の細胞構築を、電子顕微鏡による細胞形態とマーカー分子に対する免疫染色によって明らかにした。すなわち、電顕所見とマーカー分子の免疫染色をすり合せ、type B 細胞 (GFAP 陽性)、type A 細胞 (PSA-NCAM、および Tuj-1 陽性) を同定した。type C 細胞については、当時はマーカーが発見されていなかったために電顕所見から同定した。次に、Doetsch らは、抗ガン剤である Ara-C を脳内に長期投与し、分裂速度の速い type C 細胞と type A 細胞を成獣脳内から除去した。神経幹細胞である type B 細胞は、分裂速度が遅いので、Ara-C による影響が少ない。Ara-C 投与停止後、経時的に電顕所見とマーカー分子の発現変化を追跡した。投与停止直後は、SVZ には type B 細胞が多数を占めていたが、その後時間がたつにつれて type C 細胞、続いて type A 細胞が増加してきた。このことによって、type B→C→A の順に細胞が産生されることを組織学的に示すことができた (図 1)。

このように、電顕所見と、マーカー分子に対する抗体があれば、組織学的に容易に細胞系譜を追跡する事ができる。しかし、この方法では個々の細胞の形態学的特徴とマーカー分子が既知である事が大前提である。

<プロトコール>

他稿参照

2) チミジン類似体による増殖細胞標識

正常状態の成体脳内には分裂細胞はほとんど存在しないが、幹/前駆細胞は分裂増殖する。この点に注目して、神経幹/前駆細胞の分化・移動を追跡するのが、チミジン類似体による標識法である。細胞が分裂する前には必ずゲノム DNA の複製が行われる。チミジン類似体を投与すると、複製 DNA に取り込まれた後、分裂後には双方の細胞の核に分配される。古くはトリチウムチミジンによる放射性標識、のちに BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) と抗 BrdU 抗体による標識・可視化が汎用されてきた。生体内における BrdU の標識可能時間は、投与後約 2 時間とされているので、投与直後に S 期に入っている細胞を特異的に標識する事ができる。

これらのチミジン類似体は、容易に血液脳関門を通過する事ができるために腹腔内投与が可能である。特に BrdU については、特異的抗体が市販されているので検出が簡便であり、各種細胞マーカーとの多重免疫染色も可能である (図 2)。さらに、トリチウムチミジンと

BrdU、あるいは別のチミジン類似体である IdU(5-iodo-2'-deoxyuridine) と CldU(5-chloro-2'-deoxyuridine)の組み合わせによる二重標識・染色も可能であり²⁾(図3)、組織化学的解析には非常に柔軟性に富んだ手技であると言える。一般的な投与量(後述)であれば、標識による悪影響(分化能の変化、細胞死など)は小さいと考えられるが、一方でこの考え方に警鐘を鳴らす論文も発表されている³⁾。また、一度取り込まれた標識物質は細胞分裂をくり返す間に希釈されるので、分裂が盛んな細胞を長期間追跡する事は困難であるという欠点がある。

<プロトコール>

本稿では、IdU と CldU による二重染色のプロトコールを示す。

BrdU 単独で用いる場合には、BrdU のみを使用するだけで、手順は同一である。

単価としては BrdU が最も安価。

材料

BrdU ストック液 10mg/ml PBS

IdU ストック液 6mg/ml PBS

CldU ストック液 10mg/ml PBS

これらのチミジン類似体は溶けにくい(特に IdU) ので、丹念にボルテックスをかける。

分注して-20°Cで保存

抗 BrdU 抗体(表1)

手順

①-1 培養細胞への添加

IdU (または CldU) を最終濃度 10 μ M で培地に添加

30分培養後、PBS で3回洗浄

一定時間培養

CldU (または IdU) を最終濃度 10 μ M で培地に添加

30分培養後、必要に応じて PBS で3回洗浄

一定時間培養後、固定、免疫染色へ進む

①-2 動物への投与

腹腔内投与 BrdU の場合 50mg/kg が一般的

IdU (分子量 354.1)、CldU (分子量 262.65) は、BrdU と等モル投与

IdU と CldU の投与間隔は、各自の実験に応じて決定

長期投与の場合は、飲水に混ぜて投与(BrdU 1mg/ml)する事も可能

切片作成

常法に従い、動物を灌流固定、薄切(凍結またはパラフィン切片)

パラフィン切片の場合は、脱パラ後、次のステップへ

②免疫組織化学による検出

前処置として以下の処理を行う

DNA 変性：2 M 塩酸、室温 30 分

中和：0.1 M ホウ砂水溶液 (pH8.5) 15 分×2 回

洗浄：PBS 10 分×3 回

その後、常法に従い一次、二次抗体反応

IdU と CldU の二重染色を行う際には、表 1 の単クローン抗体を使用する

註) チミジン類似体 (BrdU、IdU、CldU) は、増殖速度の速い培養細胞では、添加後 5 分の培養で十分に免疫染色によって検出可能である。生体内の SVZ 神経前駆細胞も増殖速度が速いため、腹腔内投与後 30 分で十分検出可能である。

註) 塩酸によるタンパク質の抗原性低下の問題は、我々の経験ではほとんど発生していない。抗 BrdU 抗体と他の抗体で多重染色する場合、塩酸処理後、一次抗体を混ぜて反応させればよい。

註) IdU と CldU の検出は、抗 BrdU 抗体の交差性に依存し、抗 IdU 抗体や抗 CldU 抗体は存在しない。二重染色する場合には、表 1 の単クローン抗体の組み合わせで行う。

3) ウイルスベクターによる標識

GFP をはじめとする遺伝子産物を *in vitro*、*in vivo* に導入するために用いられるウイルスベクターには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターがある。GFP は細胞内に局在することなく拡散するので、細胞全体の形状を可視化する事ができる (図 4)。また、GFP に核移行シグナルを付加したものを発現するようなベクターをデザインする事で、GFP を核に局在させることも可能なので、細胞数のカウント等には便利である。

それぞれのウイルスベクターには長所・短所があり、自分の目的に合ったベクターを用いる必要がある⁴⁾。

前述の BrdU による標識と異なり、レトロウイルスベクターの長所は、宿主ゲノムに (ランダムに) 組み込まれるために、感染後に分裂を繰り返した幹/前駆細胞由来の子孫細胞においても持続発現が期待できる点にある。「細胞系譜追跡」という観点から最も重要な点は、分裂細胞への感染能力の点であろう。現在用いられているレトロウイルスベクターは、マウスモロニー白血病ウイルス (MoMLV) を基に開発されている (図 5A)。レトロウイルスベクターは、他のウイルスベクターと異なり、非増殖細胞における感染効率は極めて低い。なぜなら、ウイルスゲノムの RNA が宿主細胞内で DNA に逆転写された後、宿主染色体に組み込まれる際に核膜を能動的に通過する事が困難なため、核膜が消失する M 期の細胞で感染

が成立するとされているからである。

ウイルス粒子の作成は比較的容易で、粒子形成に必要な gag (構造タンパク質)、pol (プロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ)、env (エンベロープ) の遺伝子を内在あるいは外来性に発現する細胞に、ウイルスベクタープラスミドを transfection する事で、一過性に複製能のないウイルス粒子が産生される (図 5B)。

一般に幹細胞の増殖速度は非常に遅いので、幹細胞に対してレトロウイルスの使用は適していない場合があることに注意が必要である。さらにレトロウイルスは、長期では DNA メチル化による遺伝子発現抑制が起きてプロモーター活性が低下・消失する事が知られていて、実験結果の過小評価につながる可能性があるので注意が必要である。その点は、次のレンチウイルスベクターの方が、プロモーター活性の低下が少ないと言われている。

レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターの一種であるため、作成方法が簡単である。現在広く用いられているレンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) を基に開発されている。レンチウイルスベクターがレトロウイルスベクターと異なる点は、非増殖細胞にも効率よく感染する事である。これは、ウイルスベクター由来の DNA が核膜を通過する事ができるためである。従って、分裂速度の遅い幹細胞に対しては、レトロウイルスベクターより、非増殖細胞にも高効率で感染するレンチウイルスベクターは適していると言える。その反面、幹細胞から生まれた前駆細胞、あるいはニューロンを含む非分裂細胞にも感染してしまう点に注意が必要である。レンチウイルスベクターの作成方法は、基本的にはレトロウイルスベクターと同様であるが、gag、pol、env に加えて rev (制限遺伝子) を発現するプラスミドをレンチウイルスベクタープラスミドと co-transfection する点だけが異なる。

通常、ウイルスが感染可能な細胞種は、そのエンベロープによって決定されている。ウイルスのエンベロープは、細胞膜上の 1 種類の受容体と結合する事によって、宿主細胞に侵入する。逆にこのエンベロープを人工的に変換したシュードタイプのウイルスベクターを作成する事によって、幅広い動物種の細胞を宿主としてベクターを感染させることが可能になる (表 2)。特に、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus) 由来のエンベロープである G 糖タンパク質 (VSV-G) は、細胞膜上の受容体ではなく脂質結合と細胞膜融合によってウイルス侵入を仲介するため、哺乳類および哺乳類以外の細胞にも感染させる事ができる。更に、VSV-G エンベロープを使ったウイルス粒子は、物理的に強固であるために、超遠心による濃縮が容易であり、現在ではレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを作成する際に汎用されている。

本稿では、VSV-G を用いてレトロウイルスベクターを作成する場合のプロトコールを示すが、他のエンベロープを用いた場合でも操作は同様である。VSV-G の持続的発現は細胞に有害で安定細胞株は存在しないため、レトロウイルスベクタープラスミドと共に co-transfection する。

尚、ウイルスベクターを扱う際には物理的封じ込めレベルなど、各研究施設の規定に従う

こと。

<プロトコール>

レンチウイルスベクター粒子の作成も、基本的にレトロウイルスベクターと同様なので、ここではレトロウイルスベクターのパッケージング・プロトコールを示す。

材料

目的遺伝子 cDNA をレトロウイルスベクタープラスミドに挿入したもの (A) :

レトロウイルスベクターの場合、目的遺伝子下流に poly-A 配列を 付けてはならない。

VSV-G 発現プラスミド (B) :

A のプラスミドと同様に、CsCl 超遠心法、あるいは市販のプラスミド精製キットで精製した高純度プラスミドを使用。

パッケージング細胞 :

GP-293 など、gag と pol を恒常的に発現する細胞

培地 : 10% 仔ウシ血清、100U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン含有 D-MEM

Poly-L-lysine (PLL) コートディッシュ :

HEC293 由来細胞は接着性が弱いので、PLL コートディッシュを用いる

Poly-L-lysine (SIGMA P4825、最終 0.0025% に滅菌水で希釈)

培養用プラスチックディッシュに希釈済み PLL 液を入れて 30 分以上静置

PLL 液を捨てて、滅菌水で 3 回洗浄後、乾燥

トランスフェクション試薬 :

2 x BBS

50mM BES

280mM NaCl

1.5mM Na₂HPO₄

3 つの試薬を水に溶解後、pH を NaOH で 6.95 に調整

フィルター滅菌 (0.22 μ m)

分注して-20 $^{\circ}$ C 保存

2.5M CaCl₂

2.5M CaCl₂ / H₂O

フィルター滅菌 (0.22 μ m)

分注して-20 $^{\circ}$ C 保存

手順

①パッケージング細胞をプレートに播種 (5 x 10⁶/100mm PLL coat dish 程度)、一晚培養

翌日のトランスフェクション時、70～80%コンフルエントがベスト

②リン酸カルシウム法でAとBのプラスミドを同量 co-transfection

以下は100mm ディッシュ 1枚分の量

プラスミド混合水溶液（合計 20 μ g）：450 μ l

2.5M CaCl₂：50 μ l

2 x BES：500 μ l

上記の3液を混合後、室温 10-20 分静置

培地に一滴ずつ垂らして加えた後、ディッシュをゆっくり揺らして混合

③トランスフェクション後、37°C、3%CO₂条件下で培養

④24時間で培地を回収

⑤0.45 μ mのフィルター（ニトロセルロース膜不可。低タンパク質吸着膜を使用。）を通して細胞塊や細胞の死骸を除去

⑥超遠心で濃縮 50,000G、2時間、4°C

⑦上清を捨てる

⑧氷冷 PBS（50 μ l/dish 程度）に氷上で懸濁

力価を下げないために、泡立てないようにピペッティング

さらに濃縮したい場合は再度超遠心後、氷冷 PBS（10 μ l/dish 程度）に懸濁

⑨分注して-80°Cで保存、力価チェック

脳局所へウイルスベクターを注入する際の注意点

ガラスキャピラリーを用いて、脳実質中にウイルスベクターを注入する（図 5C）

脳実質中に注入するウイルス溶液の量は、多くても 0.5 μ l 程度が限度

シリンジポンプを使用して、0.1 μ l/分程度でゆっくり注入

注入後、5分程度静置

ガラスキャピラリーを挿入する時、引き抜く時にはゆっくりおこなう

注入後、皮膚を縫合（手術後、抗生物質投与などは基本的に不要）

遺伝子改変技術を応用した手法

1) Cre-LoxP システムとその応用

前述の BrdU による増殖細胞標識は、投与時に S 期にある細胞を標識できるために、「時間特異的」標識の一例である。しかしながら、ある細胞だけを特異的に標識する事は不可能であるので、標識される親細胞は（多くの場合）不均一な細胞集団であることを認識しておく必要がある。

ウイルスベクターによる標識は、ベクター注入の際に多少なりとも組織に傷がつくことが避けられない。また、げっ歯類のように子宮内で成長する胎児において狙った位置にベク

ターを注入する事は困難である。さらに、標的についても（多くの場合）不均一な細胞集団を標識する事になる。細胞種特異的プロモーターでレポーターを発現させるシステムにすれば、細胞種特異的な標識も不可能ではないが、多くの場合は困難である。

さらに詳細な解析を行うため、非侵襲的、空間（細胞種）・時間特異的に細胞を「永久」に標識するシステムが必要になる。そこで開発されたのが、Cre-LoxP システムを使った遺伝子改変動物の実験系である。これは、バクテリオファージ P1 由来の DNA 組換え酵素である Cre recombinase (Cre) とその認識 DNA 配列である LoxP 配列 (LoxP) を用いたシステムである。Cre は、同一方向に配置された 2 つの LoxP 配列で挟まれた DNA 領域を欠損させる性質を持つ。

例えば、生体内で X 細胞に由来する子孫細胞 Y と Z を追跡する場合を考える。その場合、プロモーター X 制御下に Cre を発現するトランスジェニック (TG) マウス、あるいは、X 遺伝子座へ Cre をノックイン (knock in: KI) した KI マウスと、レポーターマウスを交配する。レポーターマウスとは、Cre による組換え反応後でのみ、ubiquitous プロモーター（全ての細胞で活性を持つプロモーター）制御下に GFP や LacZ などのレポーター遺伝子を発現する遺伝子改変マウス (ubiquitous promoter - LoxP - stop codon - LoxP - GFP) である。組換えが起きなければ、LoxP 配列ではさまれた stop codon によって、下流の GFP 遺伝子の発現は遮断される。組換えが起こった (stop codon の削除) 後は、ubiquitous promoter の働きにより、恒常的に GFP が発現するので、X 細胞が分裂・分化・移動しても、その細胞と子孫細胞が死ぬまで「永久に」GFP で標識される (図 6)。これで空間特異的遺伝子改変が実現可能になる。

もう一つの問題、つまり時間特異的遺伝子改変の目的のためには、対象となる組織および発生段階に特異的なプロモーターが存在するならば、そのプロモーター下流に Cre を発現させる TG マウスを作成する方法が挙げられる⁵⁾。しかし、都合の良いプロモーターは常に存在するとは限らず、任意の時期に Cre 活性を誘導する仕組みが必要な場合がある。活性誘導型 Cre として、現在広く用いられているのが、CreER^{T2} システムである⁶⁾。

エストロゲンレセプター (estrogen receptor : ER) は、通常は細胞質内に存在し、リガンドが細胞膜を通過して ER と結合すると、ER は核へ移行して転写調節因子として機能する。この性質を利用したのが CreER^{T2} システムである。まず、転写調節因子としての機能ドメインを欠く変異型 ER と Cre の融合タンパク質 (CreER) を任意のプロモーター制御下で発現させる。次に、エストロゲンの類似化合物であるタモキシフェンを経口あるいは腹腔内投与することで CreER タンパク質を核移行させて Cre 活性を誘導する。その際、内在性のエストロゲンに反応しないように ER に変異を入れた ER^{T2} が通常用いられている。タモキシフェンを任意のタイミング（発生段階）で投与することで、自由に Cre 活性を誘導することができる。任意の組織特異的プロモーター制御下に CreER^{T2} を発現させる TG あるいは KI マウスを作成すると、非侵襲的に場所（臓器・組織）と時間特異的に遺伝子改変を行うことが可能になる (図 7)。

CreER^{T2}-LoxP システムを用いることで、従来の fate mapping の問題点、すなわち標識物質の希釈や検出限界、標識物質（ウイルスベクター）注入の際の傷害といった様々な問題を解決し、従来の方法をしのぐ精度で fate mapping 実験を行う事ができる。しかしながら、CreER^{T2} システムもまた完璧ではない点もある。最大の問題点は、Cre 活性誘導効率が 100% ではないことである。Cre 活性誘導効率が低い場合、実験結果を過小評価する事になるので、注意が必要である。Cre 活性誘導効率は、CreER^{T2} タンパク質を発現させるプロモーターの強さや、標的とする臓器・細胞など、個々の状況で異なる。脳は血液-脳関門に守られているために、Cre 活性誘導効率が低い組織のひとつである。

2) CreER^{T2}-LoxP システムを用いた fate mapping の実例

以上の説明をより解りやすくするために、実例を挙げて解説する。

本稿の冒頭で触れたとおり、成獣のニューロン新生領域である SVZ と SGZ に存在する神経幹細胞から、生涯にわたって嗅球と海馬のニューロンが産生される。成獣神経幹細胞は、電子顕微鏡所見や GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)、GLAST (L-glutamate/L-aspartate transporter) 等のマーカー発現の観点から、非ニューロン新生領域のアストロサイトと多くの点で共通点を持つ⁷⁾。Cre-LoxP システムを用いて成獣 SVZ 神経幹細胞の fate mapping を行おうとした場合、例えば単純に GLAST プロモーター制御下に Cre を発現するマウス (GLAST-Cre マウス) とレポーターを交配して二重 TG を作成すれば良いというわけではない。胎生期における放射状グリア (radial glia) と呼ばれる細胞は、やはり GLAST などのアストロサイトのマーカーを発現して胎生期の神経幹細胞として機能することでニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトを産生する。また、SVZ の神経幹細胞もまた、放射状グリアの子孫細胞であることが実験的に示されている。よって、GLAST-Cre マウスとレポーターマウスの二重 TG マウスにおいては、基本的に神経外胚葉に由来するすべての細胞 (ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイト) が、発生過程で既にレポーター陽性になってしまう。つまり、成獣脳でレポーター陽性になった細胞は、成獣期の SVZ 幹細胞から生まれた細胞か、あるいは胎生期に生まれた細胞かを区別する事が不可能である (図 8A)。

そこで、Cre の代わりに CreER^{T2} を用いて成獣期にタモキシフェンを投与する事で、胎生期ではなく成獣期の GLAST 陽性神経幹細胞から産生された子孫細胞である嗅球、および海馬ニューロンにおいてレポーターの発現を誘導する事が必須になる⁸⁾。尚、注意すべき点は、この GLAST-CreER^{T2} システムでは、成獣神経幹細胞とその子孫細胞だけでなく、非ニューロン新生領域のアストロサイトでもレポーターの発現が誘導される事である。しかしながら、非ニューロン新生領域のアストロサイトは正常状態ではほとんど分裂しないので、GLAST-CreER^{T2} システムを用いてレポーター陽性になったニューロンは、SVZ 神経幹細胞由来であると言える (図 8B)。

この実例の場合では、レポーターマウスとして、組換えの指標に LacZ をレポーター遺伝子として発現するマウスを使用した (図 9)。GLAST- CreER^{T2} マウスとレポーターマウスを交配し、成獣期でタモキシフェンを投与すると、Cre による組換え反応 (β -gal : β -galactosidase タンパク質の発現) が神経幹細胞において誘発される (図 9A)。幹細胞での組換え (β -gal タンパク質の発現) は子孫細胞である神経前駆細胞や嗅球の介在ニューロンにも受け継がれる。このシステムを用いることで、成獣期における嗅球ニューロン更新の様子を詳細に解析することが可能になった⁹⁾。タモキシフェン投与後 10 日目と 4 ヶ月目では、更新された嗅球ニューロンの数が有意に増加していることが明確に示された (図 9B)。同様に、海馬にも神経幹細胞が存在し、GLAST が発現しているため、嗅球同様、海馬でのニューロン更新の様子が解析できる⁹⁾。

<プロトコール>

CreER^{T2} システムを用いた fate mapping 実験の手順

前述の GLAST- CreER^{T2} の実例に従って、実際の実験を行う際の手順と注意点を述べる。

- ① 常法に従い、CreER^{T2} カセットを GLAST 遺伝子座にノックインした K I マウスを作成する。
- ② K I マウスは、通常ヘテロ接合体で維持する。というのは、CreER^{T2} カセットをノックインした遺伝子のノックアウトになってしまい、正常に維持できない場合があるからである。ただし、GLAST の KO マウスの場合は顕著な異常が報告されていないので、ホモ接合体で維持することが可能であったが、このようにホモ接合体で維持することができれば、遺伝子型判定の手間を省くことができる。ただし、解析に用いるマウスは、ヘテロ接合体を使用すべきである。用いる遺伝子座によっては、ヘテロ接合体でも異常が現れる場合があるので、解析を始める前に確認しておく。
- ③ レポーターマウスを、他の研究者からの供与、あるいは Jackson Lab. などの大手ブリーダーからの購入により入手。レポーターマウスの場合も、ホモ接合体で維持が可能ならば、非常に都合が良い。
- ④ GLAST- CreER^{T2} マウスとレポーターマウスを交配する。両者共にホモ接合体であれば、仔マウスは全て両者のヘテロ接合体となるため、遺伝子型判定が不要であり、すぐに解析を開始することができて非常に都合が良い。
- ⑤ ④ で作成した二重 T G マウスに、タモキシフェンを任意の時期に投与する。タモキシフェンは corn oil に溶解する (1 ヶ月以内に使い切ること)。腹腔内投与あるいは経口投与するのが一般的である。前述のように標的臓器によっては、タモキシフェンによる Cre 活性誘導効率に違いが現れる。Cre 活性誘導効率を最高にするため、投与方法と、投与回数を至適化する。タモキシフェンを過剰に投与するとマウスが死亡するので、注意を要する。残念なことに、投与方法の golden standard は存在せず、それぞれの場合によって経験的に決定する。
- ⑥ 常法に従ってマウスを灌流固定し、組織化学的解析に供する。GFP などのレポータータ

ンパク質と、さまざまな細胞種に対するマーカータンパク質の蛍光二重免疫染色を行う。マーカー遺伝子が LacZ の場合は、抗 β -gal 抗体を用いて免疫組織化学を行うことも可能だが、より直接的な X-gal 酵素組織化学法で、明視野観察を行うことも可能である。

おわりに

このほかにも、詳述しなかった従来の手技としては様々な方法がある。例えば、蛍光色素を単一細胞内へ注入したり、組織片を移植したりする事で、任意の細胞の系譜を追跡する事が、古くから行われている。これらの手技はゼブラフィッシュやニワトリなど母体外発生する実験動物に用いられ、多くの知見が蓄積され、実験発生学の発展に大きく貢献した。しかし、動物種によってその臓器の構造は大きく異なる場合が多い。脊椎動物の中樞神経系では、脊髄レベルではほぼ共通の構造を保っているが、特に前脳ではその形態、機能に大きな違いが表れる。現在はマウスをはじめとする哺乳類が実験動物として使用されているが、色素注入や移植などの胚操作は、子宮内で発生が進む哺乳類では困難である。遺伝子改変動物を作成するには時間とコストがかかる。一方で、ウイルスベクターに Cre-LoxP システムを移植して、アストロサイトの系譜を追跡した濤川らの実験例もある¹⁰⁾。自分の実験の目的に応じて、様々な技術の組み合わせて用いる事が重要である。

引用文献

- 1) Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A 96:11619-11624. 1999.
- 2) Llorens-Martin M, Trejo JL: Multiple birthdating analyses in adult neurogenesis: a line-up of the usual suspects. Front Neurosci 5:76. 2011.
- 3) Duque A, Rakic P: Different effects of bromodeoxyuridine and [3H]thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position, and fate. J Neurosci 31:15205-15217. 2011.
- 4) Warnock JN, Daigre C, Al-Rubeai M: Introduction to viral vectors. Methods Mol Biol 737:1-25. 2011.
- 5) Kobayashi K, Takahashi M, Matsushita N, Miyazaki J, Koike M et al.: Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. J Neurosci 24:3480-3488. 2004.
- 6) 森 徹自, 若林 毅俊, 高森 康晴, 山田 久夫: Cre-LoxP 遺伝子改変システムの改良. 脳 21, 金芳堂, 京都, pp479-484, 2006.
- 7) Mori T, Buffo A, Gotz M: The novel roles of glial cells revisited: the contribution

- of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69:67-99. 2005.
- 8) Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kuhn R et al.: Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54:21-34. 2006.
- 9) Ninkovic J, Mori T, Gotz M: Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *J Neurosci* 27:10906-10911. 2007.
- 10) Namikawa K, Murakami K, Okamoto T, Okado H, Kiyama H: A newly modified SCG10 promoter and Cre/loxP-mediated gene amplification system achieve highly specific neuronal expression in animal brains. *Gene Ther* 13:1244-1250. 2006.
- 11) 森 徹自、山田 久夫: 遺伝子改変手技と組織化学. 組織細胞化学 2009 (日本組織細胞化学会編), 中西印刷、京都, pp.107-118, 2009.

付図説明

図1 既知のマーカー分子を用いた細胞系譜追跡実験

成獣 SVZ における神経幹細胞 (type B) 由来の中間細胞 (type C) と、神経前駆細胞 (type A) のマーカー分子の発現と性質。Doetsch らは、成獣 SVZ の細胞構築を詳細に解析後、細胞を大きく 3 種類に分類した。長期的に Ara-C を脳内に注入する事で、増殖速度の速い type C、type A 細胞を除去した後、経時的に SVZ における細胞構築の経時的变化を調べた。Ara-C 投与により生き残った type B 細胞から、type C 細胞、そして type A 細胞が順に分化する事を示した¹⁾。(註) type C 細胞のマーカーは、論文が発表された 1999 年当時は不明であった。

図2 BrdU 標識された SVZ 前駆細胞の成熟

(A) BrdU 腹腔内投与後 4 時間、3 日、7 日、4 週間の、嗅球における BrdU 陽性細胞の蓄積と放射状の拡散。BrdU 投与後 4 時間では、嗅球中心部の RNS (矢印) では、BrdU 陽性細胞がほとんど検出されないが、時間の経過と共に BrdU 陽性神経前駆細胞が中心部に蓄積し、放射状に外側に拡散する。(B) BrdU 投与後 4 週間の果粒層における BrdU と成熟ニューロンマーカーの NeuN と (C) Calretinin の二重染色像。嗅球で放射状に拡散した後、大多数は GABA 作動性成熟ニューロンに分化する。矢印: BrdU と成熟ニューロンマーカーの二重陽性細胞。G1: 糸球体層、Gr0: 果粒層。Scale bar=300µm (A)、40µm (B)。

図3 IdU と CldU による S 期細胞の標識

IdU 単独陽性細胞 (矢頭)、CldU 単独陽性細胞 (二重矢頭)、IdU/CldU 二重陽性細胞 (矢印)

の 3 種類の細胞の可視化。(A) 生直後ラット脳由来初代培養アストロサイトを、*in vitro* で IdU (マゼンタ) と CldU (緑) によって標識した例。IdU 添加 (30 分間) 4 時間後、CldU 添加 (30 分間) した直後に固定して免疫染色を施した。IdU と CldU との投与間隔を広げると、二重陽性細胞数が減少する (data not shown)。Scale bar = 50 μ m。(B) 成獣マウス SVZ 神経前駆細胞を *in vivo* で IdU (マゼンタ) と CldU (緑) によって標識した例。IdU 投与 9 時間後に CldU を投与して、30 分後に固定、免疫染色を施した。CC: 脳梁、CP: 線条体、SVZ: 脳室下帯、LV: 側脳室。Scale bar = 20 μ m。

図 4 レトロウイルスベクター注入による SVZ 神経前駆細胞の追跡

(A) レトロウイルスベクター注入部位と、神経前駆細胞の移動の模式図。側脳室直近の SVZ にレトロウイルスベクターを注入すると、大部分のベクターは増殖速度の速い神経前駆細胞 (typeC、typeA 細胞) に感染する。(B 上) 注入後 4 週間の嗅球内には、GFP 陽性細胞が果粒層に検出される (矢印)。(B 下) DAPI による核染色。(C) マーカーとの二重染色により、GFP 陽性細胞は NeuN を発現する成熟ニューロンである (矢印)。GFP 陽性細胞の形態に注意。長い突起を外側 (右斜め上) に向けて伸ばしている。OB: 嗅球、EPL: 外網状層。

図 5 レトロウイルスベクターの作成と脳内注入

(A) レトロウイルスベクターの一例として Clontech 社から発売の pLXSN を示す。Multiple Cloning Site (MCS) に GFP をコードする cDNA を挿入したプラスミドを作成する。GFP は、レトロウイルスの LTR によって転写される。尚、このベクターからは、SV40 プロモーターによってネオマイシン耐性遺伝子が発現する。ネオマイシン耐性遺伝子は、プラスミドをパッケージング細胞に導入した後、ウイルス産生株をクローニングする事が可能である。あるいは、パッケージング後のウイルスベクターの力価チェックや、標的細胞への感染後のクローニング (*in vitro* 実験) などに使用する。(B) レトロウイルスベクタープラスミドと、VSV-G などのエンベロープタンパク質を発現するプラスミドを、GP2-293 (Clontech) などのパッケージング細胞に共導入する。培養上清に、パッケージングされたウイルス粒子が放出されるので、培養液ごと回収して超遠心で濃縮する。模式図は Clontech 社のマニュアルから引用。(C) マウスの脳へのウイルスベクター注入の様子。麻酔下で脳定位装置にマウスを固定し、頭蓋骨に空けた小さな穴から脳実質中へシリンジポンプを用いて微量注入する。

図 6 空間 (臓器・組織・細胞) 特異的遺伝子組み換え

プロモーター X 制御下に Cre を発現させる TG マウスと、レポーターマウスを交配して、二重 TG マウスを作成する。二重 TG マウスの生体内において、プロモーター X が活性を示す X 細胞 (青線の細胞) でのみ Cre が発現するので、この細胞集団においてのみ遺伝子組換えが誘導される (緑色の細胞)。レポーターマウス由来の GFP は、ubiquitous プロモーター制御

下で恒常的に発現するので、X 細胞の子孫細胞でも GFP が発現する。プロモーターX の活性が無い他の細胞集団では Cre が発現しないので、遺伝子組換え (GFP の発現) が起こらない。
(文献 11 より一部改変)

図 7 時間特異的遺伝子組換えシステム

Cre と変異型エストロゲン受容体 (DNA 結合部位を欠く) の融合タンパク質である CreER^{T2} は、通常は細胞質中に存在する。タモキシフェンと CreER^{T2} が結合すると、CreER^{T2} は核へ移行し、その結果 Cre 活性 (遺伝子組換え) が誘導される。任意の時期にタモキシフェンを投与することで、自由に Cre 活性を誘導することができる。(文献 11 より)

図 8 GLAST- CreER^{T2}-LoxP システムを用いた fate mapping の必要性

成獣神経幹細胞由来の細胞を解析する場合。(A)胎生期の放射状グリアは、神経幹細胞としての性質を持ち、ニューロン、オリゴデンドロサイト、非ニューロン新生領域のアストロサイト、および成獣神経幹細胞 (ニューロン新生領域) を産生する。非ニューロン新生領域のアストロサイト、放射状グリア、そして成獣神経幹細胞の三者においてマーカー分子の発現が共通してみられる。Cre-LoxP システムを用いて成獣神経幹細胞から産生される細胞を追跡する際、アストロサイトマーカーである GLAST プロモーター制御下に Cre を発現するマウスを用いると、脳内の神経外胚葉由来細胞全てがレポーター陽性 (GFP、緑) になってしまう。(B)成獣神経幹細胞 (GLAST 陽性細胞) から産生される細胞を追跡するためには、胎生期で抑制していたレポーターの発現を、成獣期で人為的に誘導するシステムが必要になる。CreER^{T2} システムを用いることで、はじめて上記の目的が達成される。(文献 11 より一部改変)

図 9 GLAST- CreER^{T2}-LoxP システムを用いた fate mapping の例

成獣 SVZ の神経幹細胞由来細胞の追跡。(A) GLAST- CreER^{T2} と、レポーターマウス (この場合、LacZ をレポーター遺伝子とするマウス) を交配し、成獣期にタモキシフェンを投与する。神経幹細胞から分化した全ての細胞が LacZ 遺伝子産物であるβ-gal タンパク質を発現する (マゼンタ)。(B-a)SVZ の神経幹細胞と、その子孫細胞で、嗅球に移動中の doublecortin (DCX) 陽性 (緑) の神経前駆細胞において、β-gal (マゼンタ) の発現が検出される (merge により白色になる)。(B-b, b' , b' ')タモキシフェン投与後 10 日目では、嗅球内でβ-gal 陽性の NeuN 陽性成熟ニューロン (矢印) はごく少数である。(B-c, c' , c' ') SVZ から嗅球へ、継続的にニューロンが供給されるので、タモキシフェン投与後 4 ヶ月目の嗅球では、β-gal 陽性の NeuN 陽性成熟ニューロン (矢印) が多数を占める。矢頭は、β-gal 陰性の NeuN 陽性ニューロンを示す。(文献 11 より一部改変)

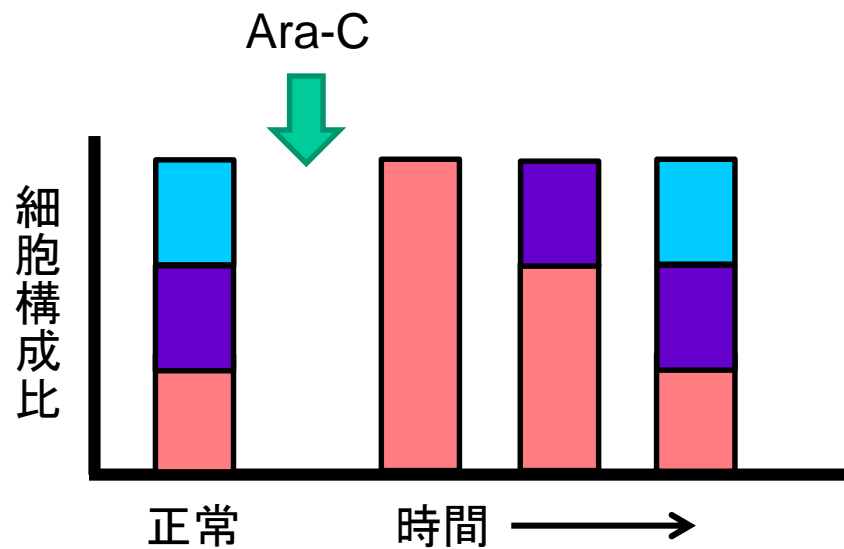
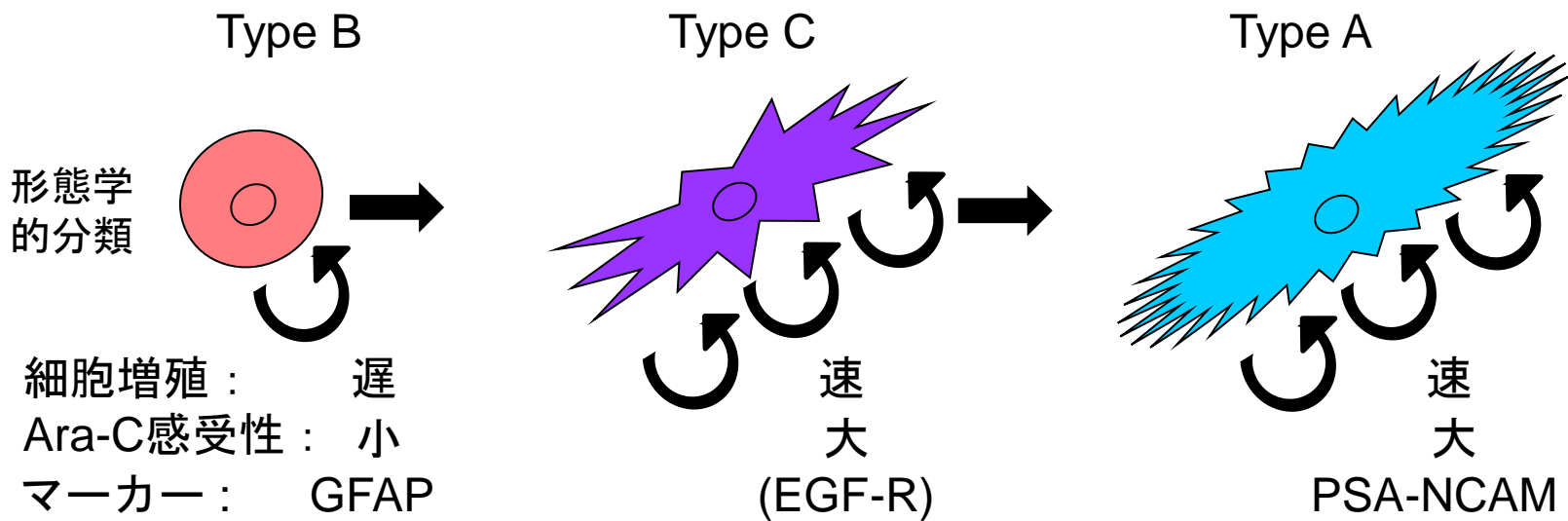
表1 抗 BrdU 抗体とチミジン類似体の交差反応

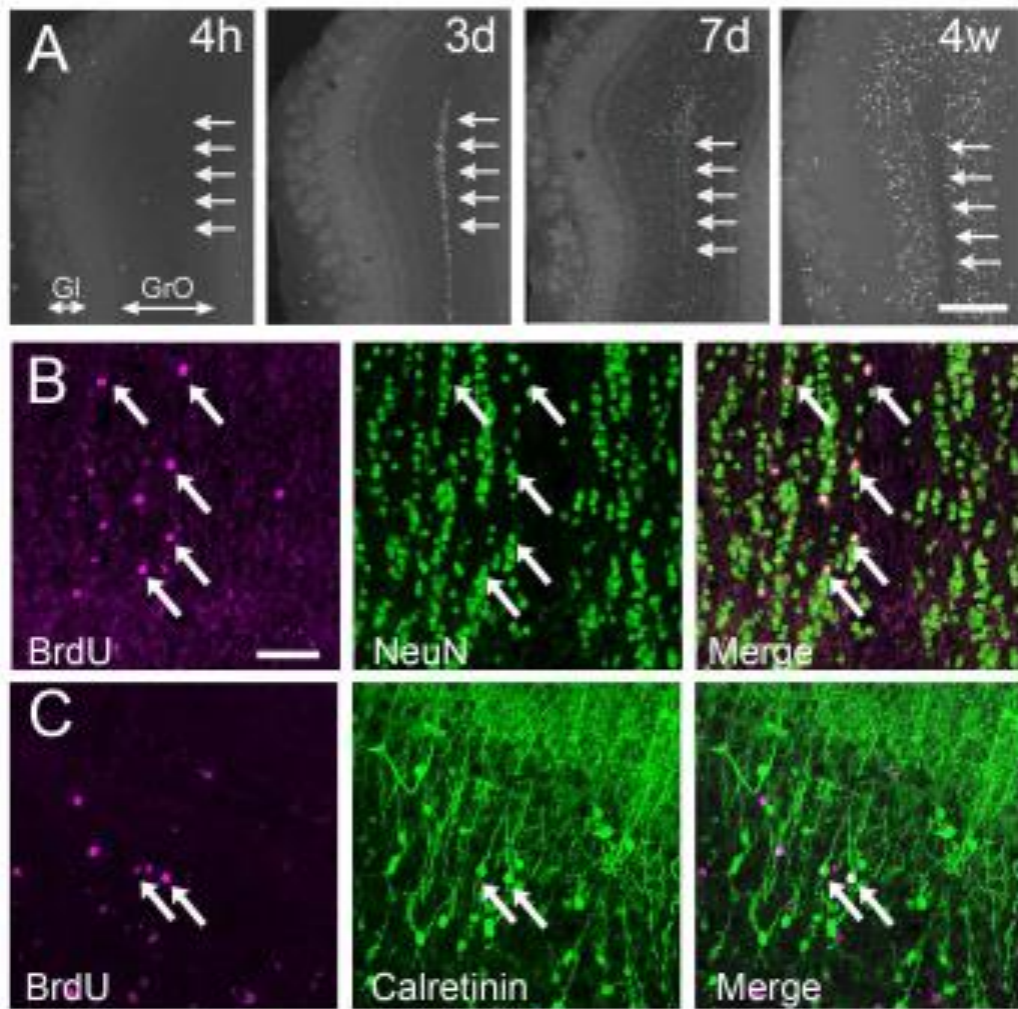
抗 BrdU 抗体 (クローン名), メーカー	BrdU	IdU	CldU
Rat mAb BrdU (BU1/75), Abcam	○	×	○
Ms mAb BrdU (B44), BD bioscience	○	○	×

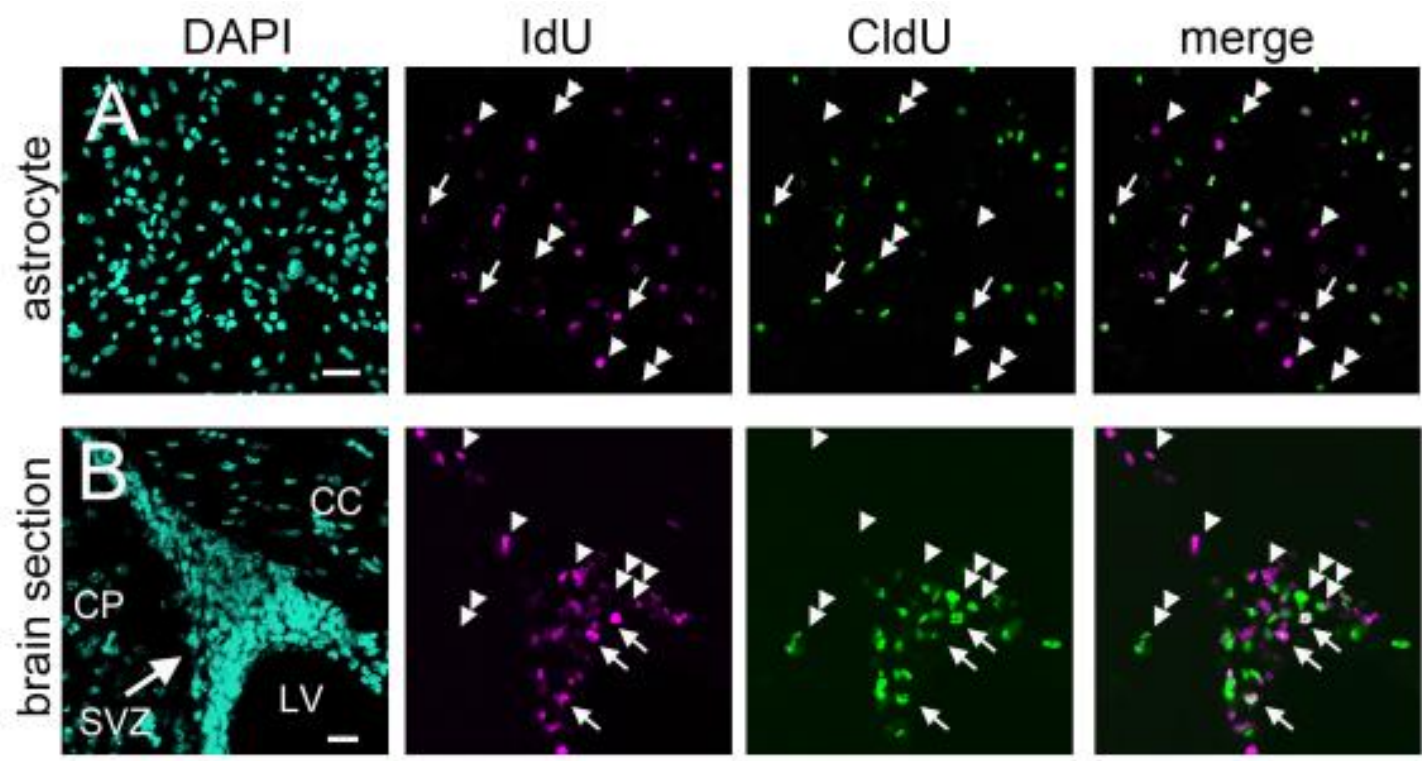
表2 エンベロープタンパク質の種類と宿主指向性

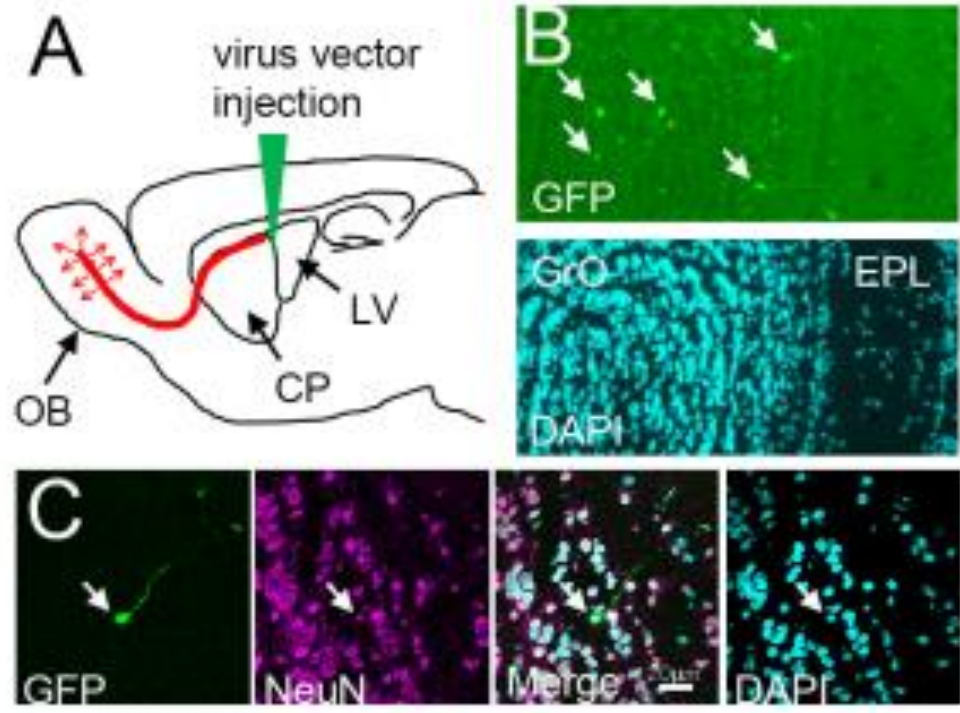
エンベロープ				
タンパク質	gap70	4070A	10A1	VSV-G
宿主指向性	狭	広	広	汎
標的細胞	マウス ラット	哺乳類細胞	哺乳類細胞	哺乳類細胞 非哺乳類細胞
受容体	mCAT-1	RAM1	RAM1 GALV	ホスファチジルセリン、 ホスファチジルイノシトール、 G _{M3} ガングリオシド

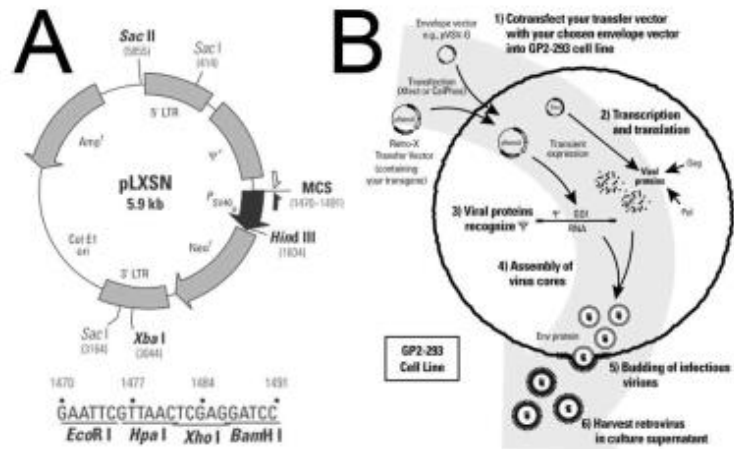
クロンテック社の説明書から一部改変

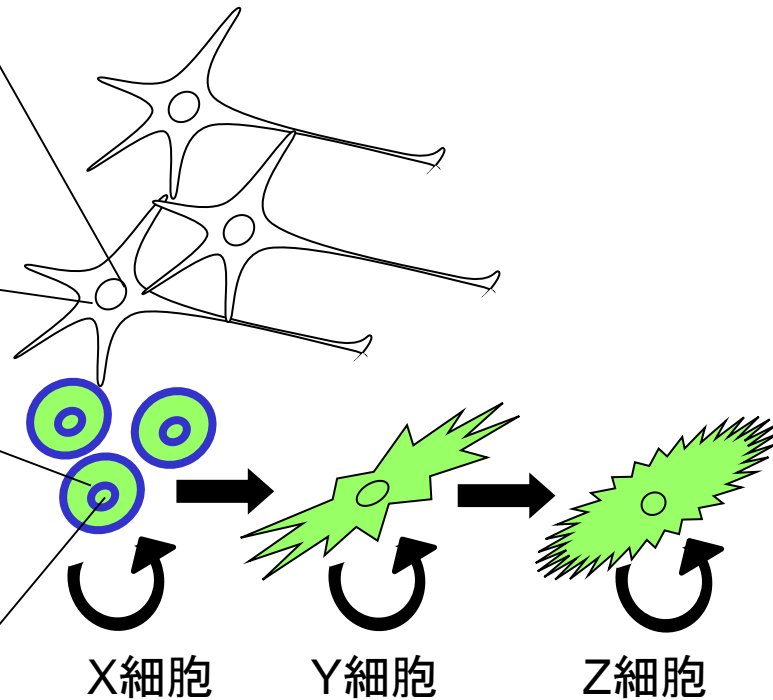
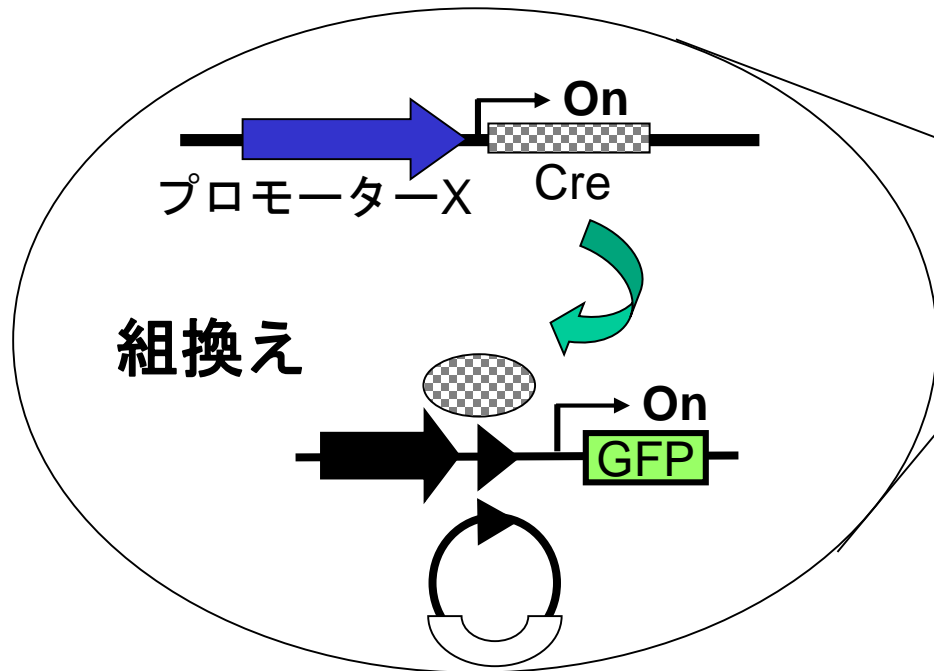
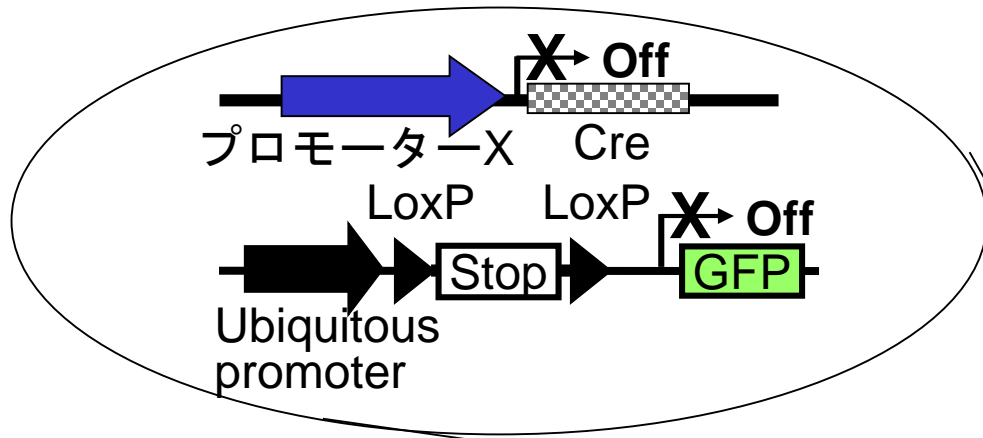




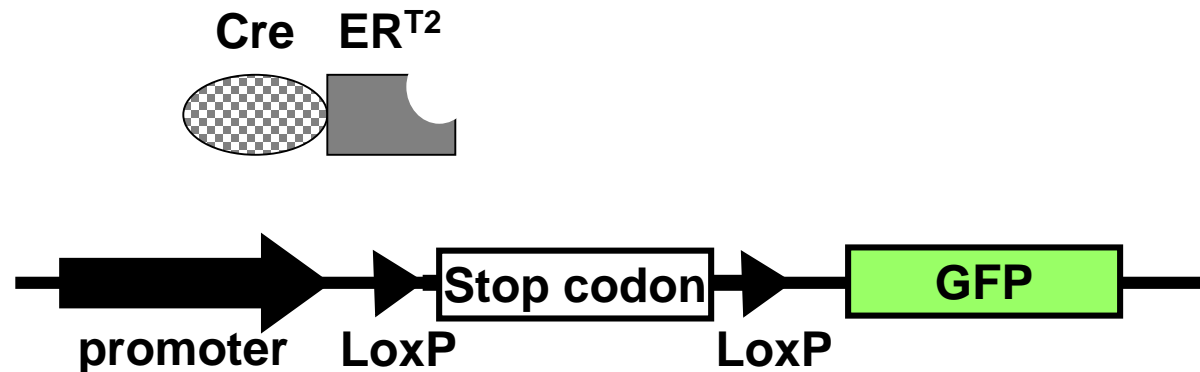




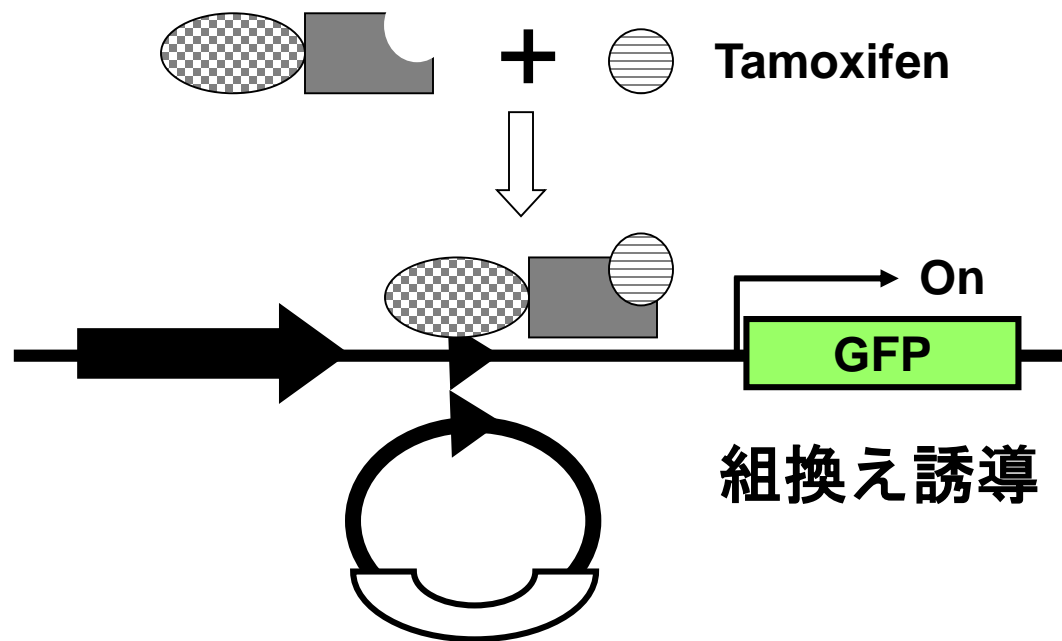




不活性



活性化



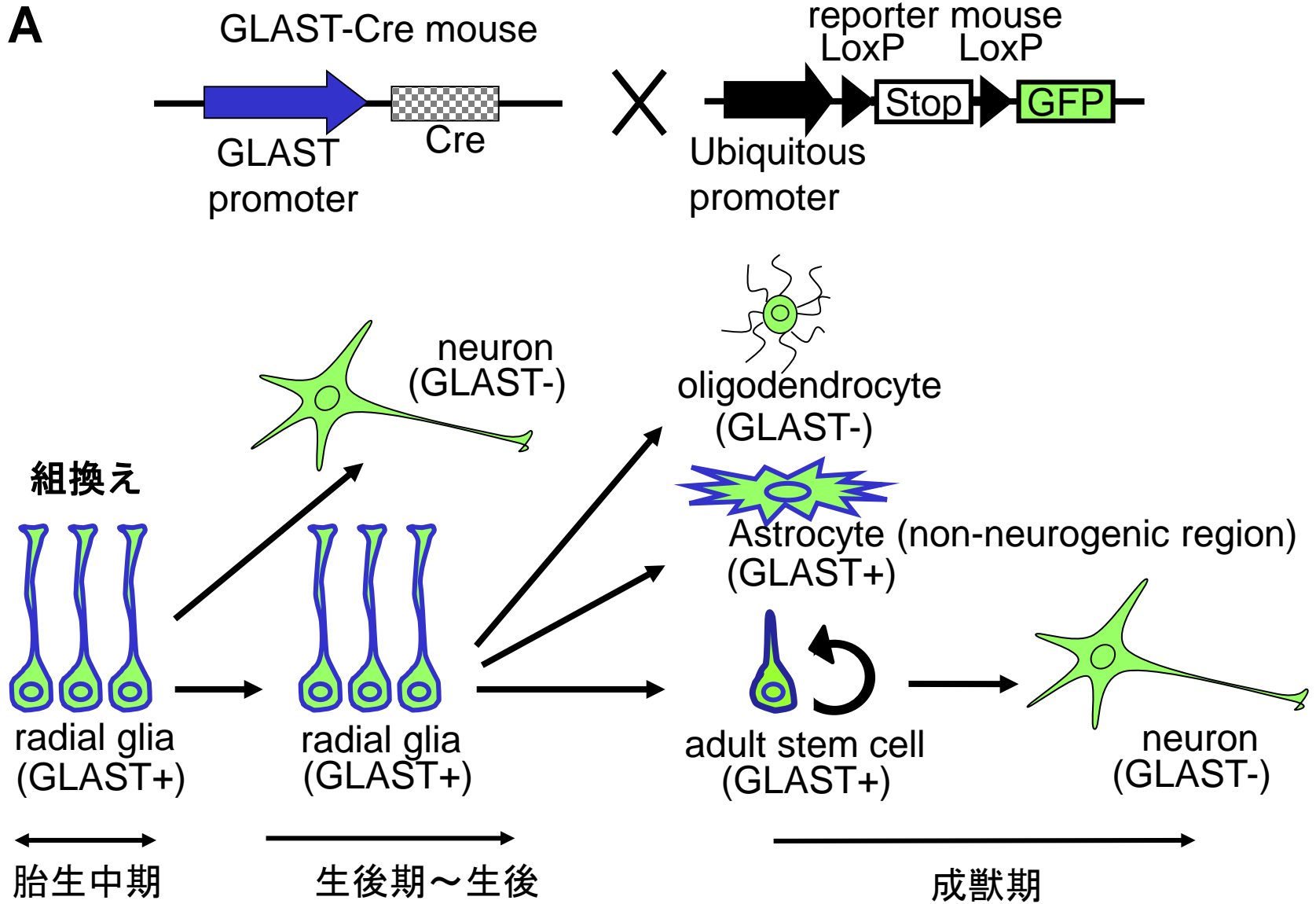


図 8 A

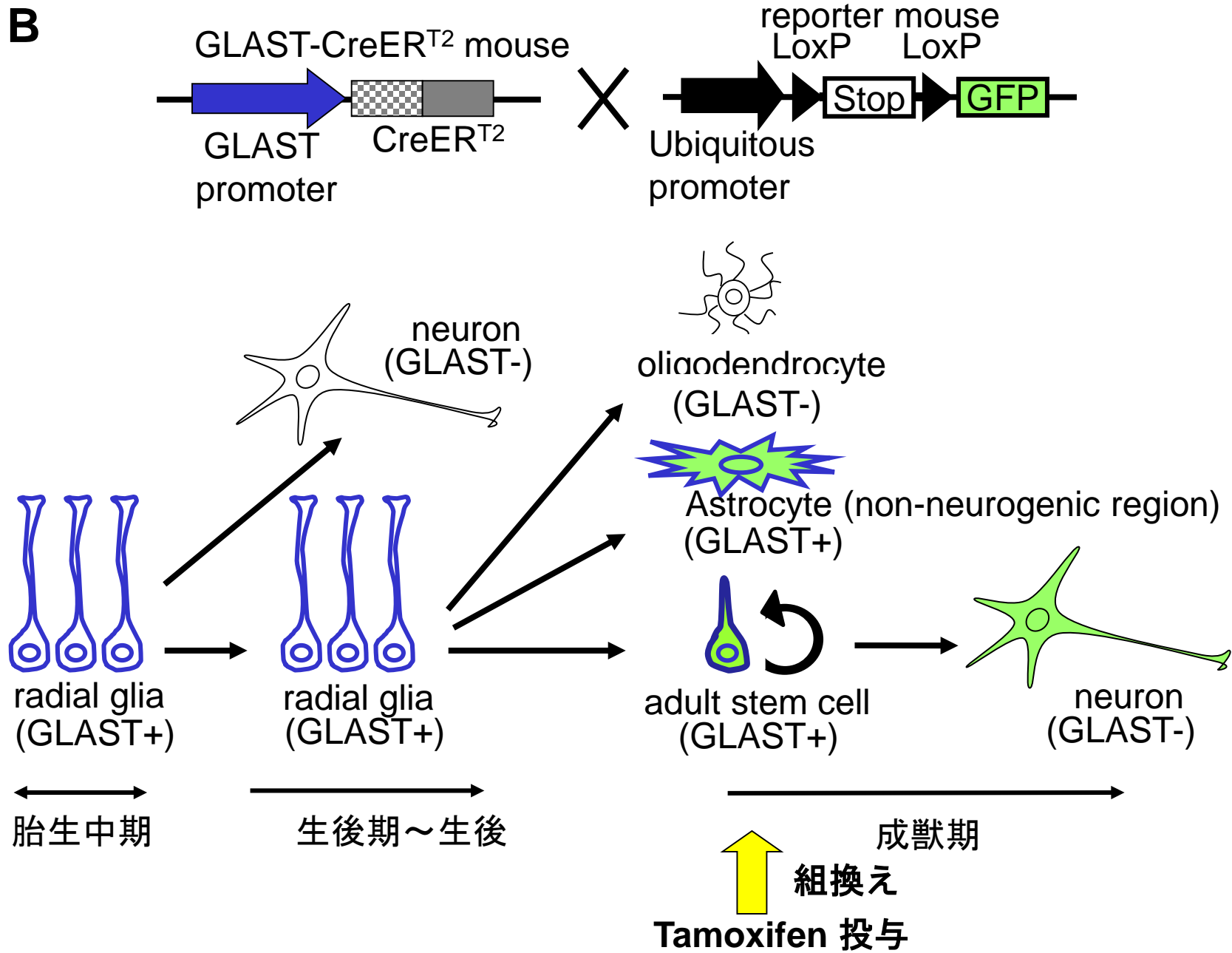
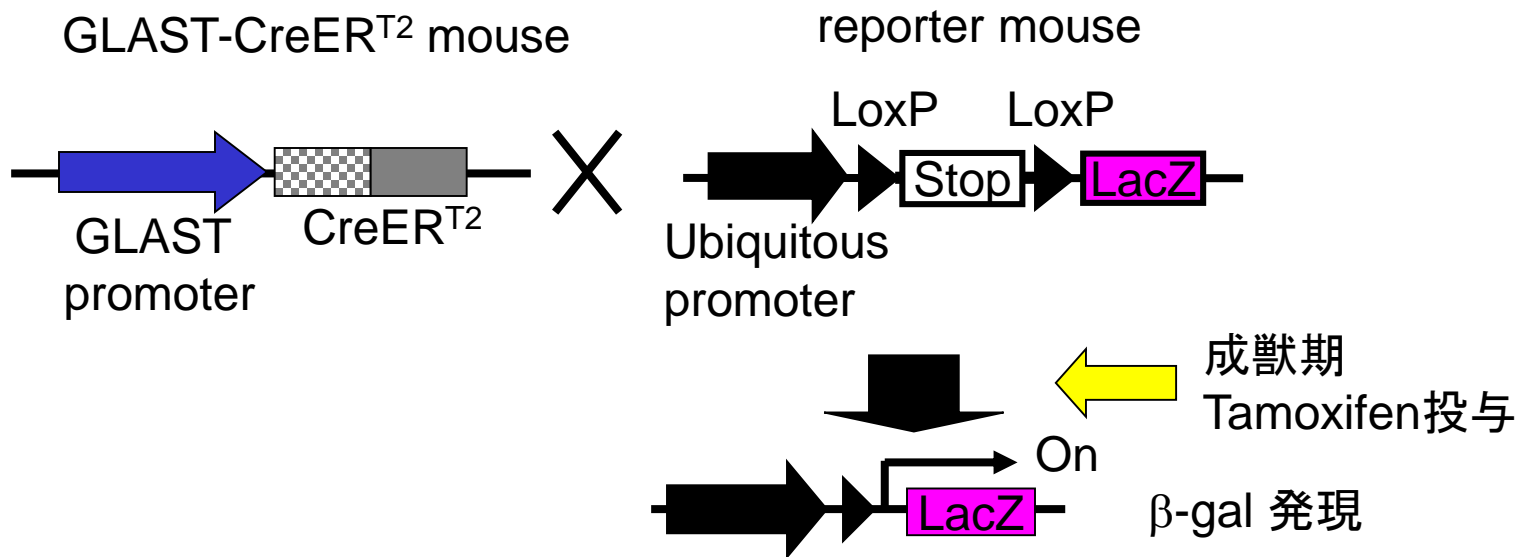


図 8 B

A**B**