

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 7 年 4 月 30 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 慶應義塾大学  
職 名 特任講師  
研究代表者 大西 伸幸

下記のとおり令和6年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:24021 )

1. 共同研究課題名	マウス組織幹細胞におけるビタミン C/E の役割			
2. 共同研究目的	生体恒常性維持において組織幹細胞の増殖ならびに機能細胞への正常分化は必須の制御機構である。マウス神経幹細胞における増殖・分化・発がんの細胞・個体レベルでの解析を得意とする申請代表者と消化管上皮幹細胞解析のプロフェッショナルである担当教員の共同研究としてビタミン C/E による組織幹細胞の酸化ストレス制御を軸に解析を行い生体恒常性維持に至適な分子機序を解明することを目的とする。			
3. 共同研究期間	令和6年4月1日 ~ 令和7年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 大西 伸幸	慶應義塾大学医学部形 成外科学教室	特任講師	研究の実施及び総括	
(分担研究者)				
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	粘膜エコシステム制御分野	氏 名	佐々木 伸雄

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

(課題番号: )

## 6. 共同研究計画

本研究では、マウス神経幹細胞ならびに消化管上皮幹細胞のビタミン C 合成速酵素遺伝子 (*Gulo*) もしくはビタミン E 輸送酵素遺伝子 (*Ttpa*) をノックダウン/ノックアウトし、幹細胞の増殖・分化能についてコントロールとの比較解析を行う。また、*Gulo*, *Ttpa* 遺伝子の野生型/不活性変異型を強制発現し、同様にコントロールと比較する。具体的には、*Gulo*, *Ttpa* 遺伝子を piggyBac 発現ベクターに既にクローニング済みであり、ノックダウン/ノックアウトに関してはツールを準備ができ次第、マウス神経幹細胞ならびに消化管上皮幹細胞に遺伝子操作を行う。増殖については細胞計数ならびに MTT アッセイを用い、分化能については幹細胞/分化マーカーの蛍光免疫染色による顕微鏡観察やフローサイトメトリー、qPCR を用いて評価する。*Gulo*, *Ttpa* ノックアウト/変異型ノックインマウスを作出予定であり、本研究での *in vitro* 解析結果を元に、将来的には発生・成長過程における生体内組織幹細胞のビタミン C/E 依存性について解析を行いたいと考えている。

## 7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

マウス組織幹細胞の恒常性維持についての機能解析を目的に、マウス脳より神経幹細胞を neurosphere 法により初代培養し、ラミニンコート上にて幹細胞性を保持したまま接着選択培養した(図1)。既に *Gulo*, *Ttpa* 遺伝子をクローニング済みの piggyBac 発現ベクターに加え、ノックダウン用に *Gulo*, *Ttpa* 遺伝子に対する *shRNA* 配列を組み込んだ piggyBac *shRNA* 発現ベクターを構築し、マウス神経幹細胞にエレクトロポレーションを用いて遺伝子導入を行った(図2)。マウス神経幹細胞は無血清培地を用いて培養しており、一般的ながん細胞株と比べて電気刺激に脆弱なため、エレクトロポレーションの条件検討を行い、プロトコルを最適化した。各種細胞がダメージから回復し、十分に増殖した段階で puromycin 選択を行い、各種恒常発現細胞を樹立予定である。また、群馬大学生体調節研究所を訪問し、佐々木教授よりマウス腸管オルガノイド培養法の実験指導を受けた。将来的にはマウス膵臓をはじめ他組織からのオルガノイド培養にも挑戦予定のため、オルガノイド培養の秘訣についてプロフェッショナルから直接ご指導頂くことは大変貴重な経験であり、今後の実験に役立てたい。マウス腸管オルガノイド培養を弊施設でも再現し、目的遺伝

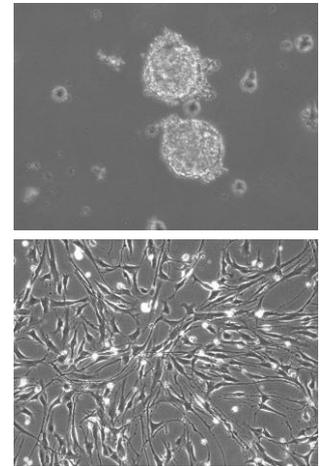
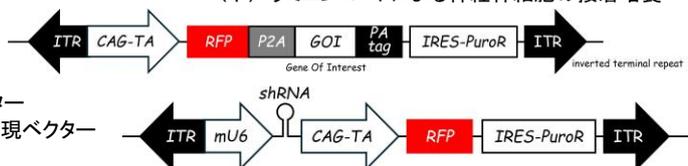


図1. (上) Neurosphere 法による神経幹細胞の初代培養  
(下) ラミニンコートによる神経幹細胞の接着培養

子ならびに *shRNA* の導入を挑戦予定である。

図2. (上) piggyBac 発現ベクター  
(下) piggyBac *shRNA* 発現ベクター



## 8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@jimu.gunma-u.ac.jp

- ①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
- ②この共同研究に基づくとの記載のある論文
- ③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)
- ④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)