

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14440

研究課題名(和文) 琵琶湖固有魚種におけるin vitro 卵子分化培養法の開発

研究課題名(英文) In vitro differentiation of ova in endemic fish inhabits Lake Biwa

研究代表者

高田 達之(Takada, Tatsuyuki)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90206756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅の危機にある琵琶湖固有種の保全、復元を目的として、琵琶湖固有種ホンモロコの卵子をin vitro培養で作製する技術の開発に取り組んだ。その結果、卵子のもととなる未分化な卵原細胞の凍結保存、培養による増殖が可能であることを明らかにした。さらに卵母細胞の培養による細胞質サイズの成長、卵子の培養液中への放出も確認された。本研究は、琵琶湖固有種ホンモロコにおいてin vitro培養による卵子形成に必要な卵原細胞の凍結保存、分化培養の技術基盤を確立し、その可能性を示した。一方で、そのサイズは正常卵子より小さかったことから卵子成熟に関して、今後さらに検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*) is a small cyprinid endemic to ancient Lake Biwa in Japan and is listed as a critically endangered species. As we have already established cryopreservation of spermatogonia and in vitro differentiation to functional sperm in this fish, we investigated the cryopreservation of oogonia and in vitro differentiation to ova to restore this fish even after its extinction. We found that oogonia can be efficiently cryopreserved using DMSO, and the culture condition, which enables proliferation of cryopreserved oogonia. In addition, the oocytes isolated from non-spawning female grew in size and released into the medium with prolonged culture. These results suggest that we succeeded to establish cryopreservation and in vitro differentiation of oogonia in *G. caerulescens*. The diameter of oocytes, however, is smaller than that of the mature ova and no chorion formation was observed, suggesting the culture need to be improved to support oocyte maturation.

研究分野：幹細胞生物学、生物保全学

キーワード：生殖細胞分化 固有魚種 in vitro 分化 卵原細胞 ホンモロコ 琵琶湖

## 1. 研究開始当初の背景

島国として孤立し、気候、地形が変化に富む日本には多くの固有種が生息している。なかでも琵琶湖は世界有数の古代湖であり、17種類の固有魚類の生息が確認されている。しかし近年、生息数が激減し、半数以上の種が(9種)が絶滅危惧種に指定され、野生での生存は危機的状況となっている。代表的な小型固有魚種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescence*) は、その淡白な味わいからコイ科で最も美味とされる食用魚で、古くから地域の貴重な動物タンパク質源として利用されてきた。すなわちその絶滅は生物学のみならず食文化の損失でもあるため、その保全は重要かつ急務である。種の保存が積極的に行われてきた哺乳動物等においては、その手段として、配偶子(精子、卵子)の凍結保存が一般的である。一方、魚類においては、精子の凍結保存技術は確立されているが、卵子や胚に関しては、サイズが大きく、多くの脂質等を含むため凍結保存が困難で、保存方法が開発されていない。そのため、魚類における精子や卵子の人為的な生産方法として、始原生殖細胞や精原細胞を凍結保存し、同種または近縁種へ移植して、精子(1,2)、および卵子(2)を形成させる仮腹生産が報告されている。これらの研究には生殖細胞の分離、移植を容易に遂行するため生殖細胞特異的にGFP等を発現させたトランスジェニック魚が用いられてきた。しかし野生の絶滅危惧種において移植法による配偶子生産を行う場合、生殖細胞が標識されていないため、その分離法や移植に適したレシピエント魚種のスクリーニング、結果の判定等、解決が容易ではない問題が新たに生じ、現実的とは言い難い。

我々は既に琵琶湖固有魚種・ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescence*) において、魚類で初めて、凍結保存した精原細胞から、受精・発生能を有する精子を作出する *in vitro* 精子分化培養が可能であることを示している(特願 2014-20931,平成 26 年度日本水産学会発表)。そこで、雌性生殖細胞の保存と *in vitro* 卵子分化が達成できれば、体外受精という魚類の特徴を最大限に活用し、将来復元可能な細胞としての固有種保存方法が開発できると考えた。

1. Okutsu.T. et al. Science,317,151,2007,
2. Lee et al. PNAS,110,1640,2013

## 2. 研究の目的

現在、多くの日本固有生物種が絶滅の危機に直面しているという現実がある。この状況下、それぞれの固有種において個別の保護対策を取ることはほとんど不可能なため、永久的な喪失を避けるためには、絶滅後でも復元可能な保存方法の開発が必要である。そこで本研究は、生殖幹細胞、精原細胞、卵原細胞を凍結保存し、*in vitro* 精子・卵子分化培養を確立することにより、絶滅後でも保存細胞

から個体を作製できる技術の開発に挑戦するものである。

我々は既に琵琶湖固有種ホンモロコの凍結保存した精原細胞から受精可能な精子の *in vitro* 分化が可能であることを示している。そこで本研究は、個体作製に必要なもう一方の配偶子、卵子の *in vitro* 作製を行う。すなわち魚類では上記した理由から、卵の凍結保存が困難であるため、未分化な卵原細胞に注目し、その凍結保存および *in vitro* 卵子分化培養の確立を試みる。

最終的に、保存された雌雄の未分化生殖細胞から *in vitro* で卵子、精子を分化させ、人工授精により個体を作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵原細胞の凍結保存

*in vitro* 卵子形成を行うにあたり、その出発材料として凍結保存が可能と考えられる未分化生殖細胞、卵原細胞を使用する。そこでまず、卵原細胞の凍結保存液の組成検討を行い、卵原細胞の生存率が高い凍結保存条件を明らかにする。

### (2) 肝臓由来細胞株の樹立

魚類卵子形成は、減数分裂に加え、成熟(卵黄形成)が重要であり、その過程では肝臓で合成されるピテロジェニンが血流に乗って卵巣に運ばれ、卵子細胞質に蓄積されることが重要である。*in vitro* 培養においてピテロジェニンを供給するため、ピテロジェニン産生細胞の培養上清の使用、または共培養を計画している。この目的のため、我々が開発した固有種からの細胞株樹立方法(3)を用いて、ホンモロコ肝臓から細胞株を樹立し、ピテロジェニンの発現、誘導を確認する。

3. Higaki S et al. Fish Physiol. Biochem. 39, 701-711 (2013)

### (3) *in vitro* 卵子形成

卵原細胞が採取できる時期は非繁殖期の短い期間に限定されるため、*in vitro* 培養の条件検討には、卵原細胞のみならず比較的得易い卵母細胞を使用する。すなわち卵原細胞から卵母細胞への分化と卵母細胞から成熟卵子の形成過程に分けて培養条件を検討し、最終的に卵原細胞から成熟卵子を作出する培養条件を確立する。

## 4. 研究成果

### (1) 卵原細胞の凍結保存

卵原細胞が存在する非繁殖期の雌個体から卵巣を採取し、トリプシンにより、卵巣細胞を単離した。この細胞を凍結保存の際に使用される様々な凍害防止剤を含む溶液に浸漬し、トリパンブルー排出試験による細胞毒性試験を行った。その結果、エチレングリコール(EG)、プロピレングリコール(PG)、ブチレングリコール(BG)、およびジメチルスルフォキシド(DMSO)の毒性が低いという

結果が得られた。そこでこれらを中心に実際に卵巣細胞を、ガラス化凍結保存し、融解後における卵原細胞を vasa 抗体により染色して、その生存率を計測した。その結果、凍結融解後の細胞回収率は 7M EG (20%), 5M PG (40%), 4M BG (20%), 5M DMSO (100%) という結果が得られ、凍結溶液として特に DMSO が適しており、凍結前とほぼ同じ数の卵原細胞の回収が可能であることが確認できた。さらに培養を継続すると vasa 陽性細胞数の増加が認められたことから、増殖可能な卵原細胞の高効率の凍結保存が可能であることが明らかとなった。

## (2) 肝臓由来細胞株の樹立

卵子成熟には肝臓で合成されるピテロジェニンが必要である。本研究では同種由来のピテロジェニンを供給するため、我々が既に確立している固有魚の細胞株樹立方法を用い、稚魚、および雌成魚の肝臓を材料として肝臓細胞株の樹立を行った。その結果、稚魚および成魚由来の肝臓組織から安定して増殖する細胞株をそれぞれ樹立することができた(図1)。



図1 稚魚(雌)肝臓由来細胞株

まず、樹立細胞のピテロジェニン発現を PCR により調べたところ、本細胞株がピテロジェニン遺伝子を発現していることが確認された。しかしその発現量は、肝臓組織と比較すると微量であった(図2、)。そこでエストロゲン(E2)(図2、)およびジエチルstilbestロール(DES)(図2、)を単独、または共に添加し(図2、)ピテロジェニンの誘導を試みたが、高濃度の添加条件においてもその誘導量は大きくなかった(図2、)。以上の結果から、今回樹立した細胞株は大量のピテロジェニンの供給源としては期待した程の結果が得られず、むしろ初代培養細胞をピテロジェニンの供給源として使用する方法が効率も良く現実的と考えられた。



図2 ピテロジェニンの発現

また、稚魚由来細胞株の染色体数解析を行ったところ、50-68 に分布が見られ、最頻値

は 60 本であった。ホンモロコの正常細胞の染色体数は 50 本であることから細胞株樹立過程で染色体数の変化が起きていることが確認された。

## (3) *in vitro* 卵子形成

### 卵原細胞の培養

凍結保存した卵原細胞を融解し、培養を継続すると vasa 陽性の細胞数の増加が認められたため、その増殖を確認する目的でチミンアナログ 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)の取り込み実験を行った。その結果、EdU を取り込んだ卵原細胞の存在、すなわち DNA 複製が確認され、*in vitro* で卵原細胞の増殖または減数分裂が進行していることが示された。次に卵原細胞がさらに増殖する培養条件を検討するため、培養液中にエストロゲン(E2)を 0, 10, 100, 1000 nM の濃度で添加し、Vasa 陽性細胞の数をカウントした。いずれの実験区でも Vasa 陽性細胞数に有意差は無く、本培養条件では E2 の添加効果が認められなかった。これは培養液中に添加している血清中に十分量の E2 が存在しているためと推定された。このとき体細胞の増殖能が生殖細胞より遥かに高く、体細胞がコンフルエンスに達し、長期間にわたって培養が継続できなかった。卵原細胞の増殖、卵母細胞への分化培養条件を詳細に検討するには体細胞の増殖を抑制する手段が重要であると考えられた。

### 卵母細胞の培養

非繁殖期 12 - 3 月の卵巣を用いて卵母細胞の培養条件の検討を行った。その結果、細胞質サイズが成長する培養条件を見いだすことができた(図3A)。また、培養の継続に伴い卵細胞が培養液中に放出される現象も観察された(図3B)。一方で、それらの直径は約 100-150 μm と実際の卵子と比較すると小さく、卵膜の形成も認められず、卵母細胞の成長は部分的であると考えられた。そこで肝臓の初代培養上清や、(2)で樹立した肝臓由来細胞株の培養上清の添加等を試みたがサイズ等に特に大きな変化は認められなかった。

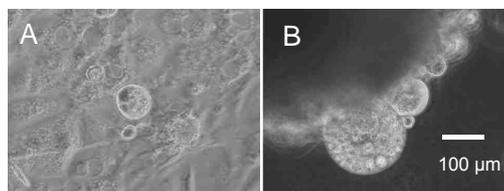


図3 卵母細胞の培養

さらに卵原細胞の増殖、分化を分子マーカーで定性的、定量的に評価するため培養に伴う各種体細胞( : Cyp19a, Foxl2, Fshr, : Sox9a, Gdsf, Cyp11b, Amh)、生殖細胞( : Gdnf, Gfra)、減数分裂(spo11)マーカーの変

化を Q-PCR で調べたが変化は認められるものの、それらを統一して説明可能な結果は得られなかった。ホンモロコの卵子形成に関する基礎的分子基盤情報の不足に加え、培養に伴い優先的に増殖する体細胞の増殖が障害となっている可能性が示唆された。

以上、本研究により、琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) において、卵原細胞の凍結保存が可能であり、その高効率の凍結保存条件、卵原細胞の増殖、卵母細胞の成長が可能な培養条件など、*in vitro* 卵子形成の遂行に必須とされる技術基盤を確立することができた。今後、*in vitro* 卵子形成を完成させるためには、ピテロジェニンの供給等による卵母細胞の成熟培養の検討が必要である。そのためには培養法の改良に加え、*in vivo* での卵子形成過程を詳細に解析し、基礎データを充実させ、*in vitro* 培養での再現を指標に研究を進めることが重要であると考えられる。

#### 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 5 件)

Higaki S., Shimada M., Kawamoto K., Todo T., Kawasaki T., Tooyama I., Fujioka Y., Sakai N., Takada T.  
*In vitro* differentiation of fertile sperm from cryopreserved spermatogonia of the endangered endemic cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*)  
Sci Rep. 2017 Feb 17; 7, 42852, 査読有  
doi:10.1038/srep42852

Uno k, Kikuchi Y, Iwata M, Uehara T, Matsuoka T, Sumiyoshi T, Okamoto Y, Jinno H, Takada T., Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A  
Decreased DNA Methylation in the Shati/ Nat8l Promoter in Both Patients with Schizophrenia and a Methamphetamine- Induced Murine Model of Schizophrenia-Like Phenotype  
PLoS ONE 2016 June 11(6): e0157959.  
査 読 有  
doi:10.1371/journal.pone.0157959

Okamoto Y, Yoshida N, Suzuki T, Asami M Shimozawa N, Matsuda T, Kojima N, Perry A.F.P., Takada T.  
DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry .  
Sci Rep. 2016 Jan 11; 6, 19134. 査読有  
doi:10.1038/srep19134.

Higaki S., Shimada M., Koyama Y.,

Fujioka Y., Sakai N., Takada T.  
Development and characterization of an embryonic cell line from endangered endemic cyprinid Honmoroko  
*Gnathopogon caerulescens* (Sauvage, 1883).

In Vitro Cell Dev Biol Anim. 51, 763-768 (2015) 査読有  
doi:10.1007/s11626-015-9894-y 9 月

Okamoto Y, Tobe T, Ueda K, Takada T., Kojima N.

Oral administration of Brazilian propolis exerts estrogenic effect in ovariectomized rats.

J. Toxicol. Sci. 40, 235-242 (2015) 査読有  
doi:10.2131/jts.40.235, 4 月

[学会発表](計 10 件)

Tatsuyuki Takada, Manami Shimada, Kazuaki Kawamoto, Takaaki Todo, Toshihiro Kawasaki, Ikuo Tooyama, Yasuhiro Fujioka, Noriyoshi Sakai, Shogo Higaki

*In vitro* differentiation of fertile sperm from cryopreserved spermatogonia of the endangered endemic cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*)  
The Society for the Study of Reproduction 2017 Annual Meeting, Marriott Wardman Park, Washington D.C. USA. 2017(7/13-7/16)

高田達之、藤東貴昭、小野友梨子、檜垣 彰吾、小丸愛香

琵琶湖固有魚の *in vitro* 精子分化系を用いた化学物質の影響解析

第 19 回日本内分泌攪乱化学物質学会、文部科学省研究交流センター、(茨城県つくば市) 2016 (12/8-9) 8 日

高田達之、吉田真子、鈴木亨、下澤律浩、浅見真紀、檜垣 彰吾、松田知成、Perry Anthony、岡本誉士典

マウス初期胚における DNA メチル化動態の定量解析

第 109 回日本繁殖生物学会、麻布大学(神奈川県相模原市) 2016(9/11-9/15) 12 日

檜垣 彰吾、藤東貴昭、手島黎子、島田愛美、酒井則良、高田達之

琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) における雌雄生殖細胞低温保存の試み

第 109 回日本繁殖生物学会、麻布大学(神奈川県相模原市) 2016(9/11-9/15) 12 日

檜垣 彰吾、藤東貴昭、手島黎子、島田愛美、酒井則良、高田達之

生殖細胞特異的に Venus を発現する琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 作出の試み  
平成 28 年度日本水産学会秋季大会、近畿大学 (奈良県奈良市) 2016(9/8-11) 10 日

Takaaki Todo, Shogo Higaki, Reiko Teshima, Ikuo Tooyama, Yasuhiro Fujioka, Noriyoshi Sakai, Tatsuyuki Takada  
Flow Cytometric Analysis of Testicular Cells in Endangered Endemic Cyprinid Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*)  
21st Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 大阪大学 (大阪府池田市) 2015(9/19-9/20) 19

Okamoto Y, Yoshida N, Suzuki T, Asami M Shimozawa N, Matsuda T, Kojima N, Perry A.F.P., Takada T  
DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry  
International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells  
京都大学 (京都府京都市) Japan, 2016(2/18-2/19) 18, 19 日

檜垣彰吾、藤東貴昭、手島黎子、島田愛美、酒井則良、高田達之  
琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) における全精巢ガラス化低温保存の試み  
第 108 回日本繁殖生物学会, 宮崎大学 (宮崎県宮崎市) 2015(9/17-9/20) 17 日

高田達之、手島黎子、檜垣彰吾、島田愛美、酒井則良、藤東貴昭  
フローサイトメトリーによる琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 精巢細胞の解析  
第 108 回日本繁殖生物学会, 宮崎大学 (宮崎県宮崎市) 2015(9/17-9/20) 17 日

〔図書〕(計 1 件)

岡本誉士典、高田達之  
遺伝子発現の制御を測定する新手法：  
LC/MS/MS を用いて DNA メチル化を定量的に測る  
化学, 71, 12-17 (2016)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.collabo.sk.ritsumei.ac.jp/laboratory/takada.htm>

<http://www.ritsumei.ac.jp/research/r-giro/projects/environment/biosensor.html/>

<http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/takada/top.html>

新聞報道

DNA メチル化解析 微量定量法  
2016/1/12  
日刊工業新聞

遺伝子発現制御 正確に測定  
2016/1/13  
京都新聞、朝刊

ホンモロコの精子作製に成功 立命大、  
遺伝子保存へ  
2017/2/27  
京都新聞 朝刊

ホンモロコ 種の保存に光  
2017/3/7  
読売新聞、朝刊

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 達之 (TAKADA Tatsuyuki)  
立命館大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90206756

(2) 研究分担者

檜垣 彰吾 (HIGAKI Shogo)  
立命館大学・薬学部・助教  
研究者番号: 70595256

(3) 連携研究者

酒井 則良 (SAKAI Noriyoshi)  
国立遺伝学研究所・系統生物研究センター  
・准教授  
研究者番号: 50202081

(4) 連携研究者

今村 公紀 (IMAMURA Masanori)  
京都大学・霊長類研究所・助教  
研究者番号: 80567743