

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18380165

研究課題名（和文）鳥類幹細胞の分化制御による器官および臓器の再生

研究課題名（英文）Developmental regulation of avian stem cells and the application for regeneration of tissues and organs in the chicken.

研究代表者

鏡味 裕（Kagami Hiroshi）

信州大学・農学部・教授

研究者番号：80308303

研究成果の概要：鳥類における胚性幹細胞及び体性幹細胞の樹立および、それらの分化制御による再生を鳥類において試みた。胚性幹細胞はニワトリ胚盤葉明域中央部より採取した。胚性幹細胞をドナーとし、レシピエントに移植した。この結果、ドナー細胞は生殖細胞系列を含む各種の細胞系譜へと発生分化し得ることが確認された。体性幹細胞は、初生雛の大腿骨および脛骨由来の骨髓細胞から採取した。骨髓細胞をドナーとしレシピエント胚に移植したところ、移植した骨髓細胞はレシピエントの血管系や心臓部に集積し、キメラ体内で血管内皮細胞として再生した。以上の結果から鳥類幹細胞の分化制御により各種の臓器や器官を再生する新規の実験系を確立した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：鳥類発生工学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：胚性幹細胞，体性幹細胞，分化制御，臓器，器官，再生，鳥類

1. 研究開始当初の背景

幹細胞工学の進展は農学、医学、工学を始め、あらゆる既存学問分野に多大な影響を及ぼしている。とりわけ、ヒトやマウスの胚性幹細胞や骨髓細胞を培養・分化制御し、器官、臓器を再生する研究が急速に進展している。胚性幹細胞は、一般にマウスなどの哺乳類の胚盤胞の内部細胞塊に由来する細胞を培養し樹立されてきた。また、マウス、ブタ、ウシ、ヒツジ、等においても胚性幹細胞の樹立が試みられている。さらに栄養外胚葉からの胚性幹細胞の誘導の可能性の報告もされて

いる。

しかし鳥類においては、当該研究はほとんど進展していない。そこで鳥類幹細胞を単離し、器官、臓器、の再生を行う必要性に鑑み本研究課題を遂行した。

2. 研究の目的

幹細胞の分化制御によって器官、臓器を再生する研究は 21 世紀の生物学における重要課題の一つと考えられている。とりわけ、ヒトやマウスの胚性幹細胞や骨髓細胞を培養・分化制御し、器官、臓器を再生する研究が急速

に進展している。

一方、鳥類においては、幹細胞の分化制御による器官、臓器の再生は世界的にもほとんど成し遂げられていない。そこで本研究では鳥類（主にニワトリ）の幹細胞として、胚性幹細胞、骨髄幹細胞、をターゲットとし、研究を推進する。

また体内における多様に分化した細胞及び多能性を保持する幹細胞は、どちらも基本的には同一のゲノムを持つ。しかしこれらの細胞相互の形態や機能を明瞭に異なる。これは同一のゲノム配列を保持していても、遺伝子発現のパターンが異なることに起因するものと考えられている。この様な現象はエピジェネティックな現象と呼ばれ、その主な制御機構の一つとして DNA のメチル化が考えられている。そこで鳥類においては現在に至るまでほとんど明らかにされていないゲノムワイドな DNA メチル化状態の解析を試みる。上記の研究の遂行によって得られる、分子、細胞、個体、レベルでの新規知見や研究技術を統合的に活用し、鳥類幹細胞の分化制御による、器官、臓器、の再生を試みる。

3. 研究の方法

胚性幹細胞及び体性幹細胞の同定及び選択的採取を試みた。また、これらの幹細胞の分化制御による再生を鳥類において試みた。

胚性幹細胞はニワトリ胚盤葉明域中央部より採取した。この細胞塊を完全な単一解離細胞へと解離し、培養液を注入した。CO₂ インキュベーター内でこれらの細胞を培養した。各種のサイトカインを培養液に添加し、それらの効果を解析した。さらに胚性幹細胞をドナーとし、レシピエントに移植した。こうして、移植したドナー細胞のレシピエント胚体内及び胚体外への移住、発生、分化、の機構を解析した。また性成熟のキメラにおけるドナー細胞の機能的な配偶子への発生及び分化の可否を解析した。さらに、生殖細胞分化への幹細胞である始原生殖細胞の新しい採取法の開発を試みた。初期胚において、胚体内及び胚体外を循環する血液を採取した。これらの血液を ACK で処理して血球を破壊した。血球以外の細胞として始原生殖細胞が効率的に採取され得るか否かを解析した。

体性幹細胞を分取するため、初生雛から大腿骨および脛骨を採取した。こうして得た骨髄内容物を遠心分離し、細胞ペレットを残し上清をアスピレートした。遠沈管に血球分離用試薬である Lympholyte-M を加え、遠心分離した。これらの中間層およびその上層を別の遠沈管に移した。PBS で希釈後に再度遠心分離した。これらのサンプルを培養液と共に培養用ディッシュに播種し、細胞を培養した。またこれらの骨髄幹細胞をドナーとしレシ

ピエントに移植し、主に血管の再生を試みた。さらに初期胚における DNA メチル化状態の解析を試みた。放卵直後の受精卵を培養し、発生ステージ 1~17 までの胚のサンプリングを行った。これらからゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化感受性酵素である Hpa II 及びメチル化非感受性酵素である MspI で消化した。消化サンプルを電気泳動しメチル化状態の判定を試みた。さらに制限酵素処理断片の数値による解析を行った。

4. 研究成果

鳥類初期胚（胚盤葉）の中央部（明域）より得られた細胞塊を完全な単一解離細胞へと解離し、培養したところ、胚様体の形成が確認された。さらに胚性幹細胞をドナーとし、レシピエントに移植した。この結果、移植したドナー細胞は初期胚の血管系に侵入し、血流によって胚体内及び胚体外に循環することが確認された。胚発生が進展するにつれ、これらの細胞は生殖腺原器へと移住定着することが確認された。このことからドナー細胞は生殖細胞系列を含む各種の細胞系譜へと発生及び分化し得ることが確認された。これらの生殖細胞キメラ技術を用いて、筋ジストロフィーニワトリの再生を試みた。ドナーを筋ジストロフィーニワトリ由来の胚性幹細胞、レシピエントを白色レグホンとし、キメラを作出した。作出した雌雄の生殖細胞キメラ同士の間交配によって、筋ジストロフィーニワトリの完全再生にも成功した。

また、胚体内及び胚体外を循環する血液を採取し、ACK で処理して血球を破壊した。血球以外の細胞の形態学的観察を行ったところ、その大きさは通常血球細胞に比較し明らかに大きな細胞であった。また細胞内の各も極めて大きいことが確認された。このため、これら ACK 処理によって得られた細胞は始原生殖細胞であろうと思われた。これらの始原生殖細胞様細胞を含む ACK 処理サンプルを培養すると、血球細胞を経時に減少消滅した。こうした培養を約 3 日間継続する事により、大多数の細胞が始原生殖細胞様の細胞として存在した。これらの細胞からを用いて RT-PCR を行ったところ、Dazl 及び Cvh の強い発現が認められた。さらに CVH を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、この細胞特異的に強い発現が検出された。さらに、これらの細胞をドナーとし、レシピエント胚に移植したところ効率的に生殖細胞キメラが作出されることが明らかとなった。以上のことから我々は、ニワトリの始原生殖細胞採取に関する、全く新しい方法を開発したものと思われた。

体性幹細胞を分取するため、初生雛から大腿骨および脛骨を採取した。これらのサンプルから骨髄幹細胞を採取した。この細胞をドナ

ーとした。他方、レシピエント胚に局所的 UV 照射を施したところ、効率的に血管を退縮させる実験系を開発した。そこで事前に調整したドナー骨髄細胞を PKH26 で標識し、UV 照射したレシピエント胚に移植した所、移植した骨髄細胞はレシピエントの血管系や心臓部に集積し、キメラ体内で血管内皮細胞として再生した。これによりドナー骨髄細胞が血管を再生し得ることが明らかとなった。またドナー細胞移植によって再生した血管細胞を用いて半定量的 RT-PCR を行ったところ、VEGF 及び VE-cadherin の強い発現が確認された。よって採取したドナー細胞は活発に血管再生を行っていることが明らかとなった。

初期胚発生に伴う DNA メチル化解析の結果から、鳥類の CpG 割合は比較的、哺乳類に近いことが明らかとなった。また、遺伝子の転写開始地点近傍で CpG 数が増加する傾向が確認された。これらのことから、鳥類ゲノム DNA においても哺乳類と同様に、DNA メチレーションによるエピジェネティクス制御を受けているものと示唆された。

以上の結果から、鳥類における胚性幹細胞、及び体性幹細胞の発生遺伝学的特性が明らかとなった。またキメラを介した幹細胞の分化制御により各種の臓器や器官を再生する新規の実験系を確立した。

これらの研究成果は国内外で極めて高く評価された。これにより、家禽学分野において世界最高峰とされる、世界家禽学会議(2008年7月にオーストラリア国ブリスベン市内で開催)において本邦から唯一の招待講演者に選出され、招待講演を行った。

今後、幹細胞分離の一層の厳密化及び分化制御技術の洗練によって、幹細胞を活用した家禽育種へ活用し得るものと展望された。

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 26 件)

Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Usui, F., Atsumi, Y., Ito, Y., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Takahiro, T. Increased Proportion of Donor Primordial Germ Cells in Chimeric Gonads by Sterilization of Recipient Embryos using Busulfan Sustained-release Emulsion in Chicken. *Reproduction, Fertility and Development*, 20: 900-907,

2008, 査読有

Atsumi, Y., Tagami, T., Kagami, H. and Ono, T. Restriction of Germline Proliferation by Soft X-ray Irradiation of Chicken Embryos and its Application to Chimera Production. *Journal of Poultry Science*, 45: 292-297, 2008, 査読有.

Yokoi, R., Hayashi, M., Tamura, T., Kobayashi, K., Kuroda, J., Kusama, H., Kagami, H. and Ono, T. Embryonic Mortality and Intrauterine Growth Retardation (IUGR) Associated with Placental Alterations in Pregnant Rats treated with Methyl Methanesulfonate (MMS) at the Pre-implantation. *Journal of Toxicological Science*, 33: 585-598, 2008, 査読有

Tagami, T., Kagami, H., Matsubara, Y., Harumi, T., Naito, M., Takeda, K., Hanada, H. and Nirasawa, K. Differentiation of Female Primordial Germ Cells in the Male Testes of Chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Molecular Reproduction and Development*, 74: 68-75, 2007, 査読有

Yamamoto, Y., Ono, T. and Kagami, H. Dynamic Analysis of the Developmental Fate of Cells in the Center of the Area Pellucida of the Blastoderm in Chicken. *Journal of Poultry Science*, 44: 85-91, 2007, 査読有

Yamamoto, Y., Usui, F., Nakamura, Y., Ito, Y., Tagami, T., Nirasawa, K., Matsubara, Y., Ono, T. and Kagami, H. A Novel Method to Isolate Primordial Germ Cells and its Use for the Generation of Germline Chimeras in Chicken. *Biology of*

Reproduction, 77: 115-119, 2007, 査読有

Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Mushika, T., Usui, F., Ono, T., Setioko, A. R., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T. Migration and Proliferation of Primordial Germ Cells in Early Chicken Embryo. Poultry Science, 86: 2182-2193, 2007, 査読有

Yokoi, R., Suda, S., Kobayashi, K., Kuroda, J., Kusama, H., Kagami, H. and Ono, T. Differential Susceptibility of Rat Embryos to Methyl Methanesulfonate during the Pregastrulation Period. Journal of Toxicological Science, 32: 495-503, 2007, 査読有

Arisawa, K., Yazawa, S., Atsumi, Y., Kagami, H. and Ono, T. Skeletal Analysis and Characterization of Gene Expression Related to Pattern Formation in Developing Limbs of Japanese Silkie Fowl. Journal of Poultry Science, 43: 126-134, 2006, 査読有

[学会発表](計 38 件)

鏡味裕、臼井文武、中村隼明、山本耕裕、藤原哲、大友朝子、片倉真沙美、手嶋歩美、柏木まや、田上貴寛、葺澤圭二郎、松原悠子、小野珠乙。家禽幹細胞の分化制御による新規家禽育種戦略の開拓，日本畜産学会第 110 回大会，2009 年 3 月，藤沢

大友朝子、片倉真沙美、手嶋歩美、中村隼明、臼井文武、山本耕裕、小野珠乙、鏡味裕。in vitro における鳥類始原生殖細胞の培養条件の探索，第 31 回日本分子生物学会年会-第 81 回日本生化学会大会 合同大会，2008 年 12 月，神戸

臼井文武、小野珠乙、鏡味裕。ニワトリ初期胚における DNA メチル化状態の変化，日本 DNA 多型学会第 17 回学術集会，2008 年 11 月，東京

Kagami, H. Novel Approaches for Avian Stem Cell Regulation and the Application for Sex Determination and Sexual Manipulations. XXIII World s Poultry Congress. July 2008, Brisbane, Australia

山本耕裕、柏木まや、中村隼明、伊東陽平、小野珠乙、鏡味裕。ニワトリ生殖細胞の新規単離法の開発と生殖細胞系列キメラニワトリの作出，日本畜産学会第 108 回大会，2007 年 9 月，岡山

Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Mushika, T., Usui, F., Otomo, A., Teshima, A., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T. Sexual Difference in Number of Primordial Germ Cells within the Future Gonadal Region of Chicken Embryos. Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist & the Japan Society for Cell Biology, May 2007, Kyoto

臼井文武、高橋将文、池田宇一、小野珠乙、鏡味裕。ニワトリ骨髓細胞を用いた血管再生解析，日本畜産学会第 107 回大会，2007 年 3 月，相模原

Kagami, H., Yamamoto, Y., Mushika, T., Naito, N., Usui, F., Koshiba, M., Nakamura, S., Yamakawa, N., Tagami, T., Matsubara, Y. and Ono, T. Novel Approaches for Avian Stem Cell Regulation, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June, 2006, Kyoto

Usui, F., Mushika, T., Takahashi, M., Ikeda, U., Ono, T. and Kagami, H.

Regeneration of Vessels by Avian Bone Marrow Cells. 4th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, June, 2006, Toronto

(2)研究分担者
小野 珠乙(Ono Tamao)
信州大学・農学部・教授
研究者番号：10177264

〔図書〕(計3件)

山本耕裕、福田靖、小野珠乙、鏡味裕.
Differential Display RT-PCR を用いたニ
ワトリ初期胚での遺伝子発現様式. DNA
多型 Vol. 15 (日本 DNA 多型学会編), 東
洋書店 (ISBN: 4-88595-705-5), pp. 74-76,
2007

Kagami, H., Mushika, T., Noguchi, T.,
Yamamoto, Y., Fujiwara, A., Yamakawa, N.,
Okuizumi, H. and Ono, T. Pluripotent Cell
Culture Engineering and the Application
for Avian Biotechnology. In: Animal Cell
Technology, Basic & Applied Aspects.
(eds. Iijima, S. and Nishijima, K.)
Dordrecht, The Netherlands, Springer
Ltd., (ISBN:1-4020-4312-0), pp. 135-141,
2006

Fujiwara, A., Mizutani, M., Ono, T. and
Kagami, H. Introduction of Genes
Relating to Muscular Dystrophy into
Chimeric Chickens by Embryo Engineering.
In: Animal Cell Technology, Basic &
Applied Aspects. (eds. Iijima, S. and
Nishijima, K.) Dordrecht, The
Netherlands, Springer Ltd.,
(ISBN:1-4020-4312-0), pp. 127-133, 2006

〔その他〕

ホームページアドレス
http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/onono_kagami/hasseiken.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鏡味 裕 (Kagami Hiroshi)
信州大学・農学部・教授
研究者番号：80308303