

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21371

研究課題名（和文）ウシ毛包幹細胞の純化技術の確立：オーダーメイドホルモン製剤の実現へ

研究課題名（英文）Establishment of isolating methods for hair follicle stem cells derived from bovine: toward the implimentation of made-to-order hormone preparations

研究代表者

樋口 雅司（HIGUCHI, Masashi）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：70614791

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：申請者がモデル動物であるマウスを用いて開発した下垂体前葉および髭毛包に存在する組織幹細胞の分離技術を応用して、ウシ下垂体前葉および髭毛包の組織幹細胞の分離を試みた。その結果、ウシ下垂体前葉に存在する組織幹細胞の分離および培養に成功した。しかしながら、既報の分化誘導法では、ウシ下垂体前葉の組織幹細胞は性腺刺激ホルモン産生細胞へ分化しないことが明らかになった。また、ウシ髭毛包からは初代培養に必要な細胞数を確保できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウシ下垂体前葉に存在する組織幹細胞を分離することに初めて成功した。下垂体前葉組織幹細胞は下垂体前葉ホルモンを産生する5種類の細胞への分化機構を調べるために不可欠なツールであるが、これまでに齧歯類以外で組織幹細胞を分離する技術は存在していなかった。本研究の成果により、ウシ下垂体における細胞分化機構の解明が進むこと、そして、その先には下垂体前葉ホルモンを体外生産する技術を開発することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We attempted to isolate tissue stem cells in the anterior lobe of the bovine pituitary gland and hair follicles using methods established in mice. As a result, we succeeded in isolating and culturing tissue stem cells from the anterior lobe of the bovine pituitary gland. However, it was found that they could not be induced to differentiate into gonadotroph under the same conditions as mice. In addition, the number of cells required for primary culture could not be obtained from beard hair follicles in bovine.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：ウシ 下垂体 毛包 組織幹細胞 細胞分離 分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、人工授精で100%生産されている牛の受胎率が低下している。この原因は精子の質、凍結保存技術、雌の遺伝的要因および環境因子等とされているが、未だに解決策はない。人工授精にはホルモン製剤による発情周期や排卵制御が不可欠であり、筋肉内投与や腔内留置型徐放剤の使用により良質の卵を得る努力がなされてきた。一方、製剤自体に注目すると遺伝子工学的に合成したヒト由来組換えタンパク質や妊馬血清から精製したものがあがるが、動物種や系統により排卵しない等反応性が大きく異なる。これは現在のホルモン製剤が「対象動物に最適か」ではなく「入手が容易か」により選択されているからである。一方、倫理的・免疫学的に問題のないものとなるとオーダーメイド製剤の開発がベストだが、例えば、ウシ1頭分の下垂体から全てのホルモン産生細胞を外科的に摘出しても機能的に十分な量は得られない。

申請者は下垂体の発生と分化機構を研究する過程で、転写因子 paired related homeobox 1 (PRRX1) 陽性細胞が下垂体を含む多様な組織において未分化な細胞(組織幹細胞)として存在することを立証した[Higuchi et al. 2013, Cell Tissue Res 353:27-40]。組織幹細胞とは胚葉を超えて全身の組織に侵入・定着した多能性細胞であり、根源的には同じ細胞であると考えられるため、運命転換により別組織の細胞への変換が可能である。それ故、国内外問わず組織幹細胞を用いた運命転換実験が数多く行われ、例えば歯髄幹細胞から血管内皮や神経細胞等が構築されている[Luo et al. 2018, Stem Cells Int 2018:1731289]。従って、下垂体外(毛包)の細胞を集めて運命転換を誘導できれば、非下垂体由来のホルモンが構築できるかもしれない。

### 2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、(1)ウシ下垂体前葉における PRRX1/SOX2 二重陽性細胞(以下、組織幹細胞)の存在を証明すること、(2)その細胞の分離・培養方法を確立し、性腺刺激ホルモン産生細胞への分化誘導条件を検証すること、そして、(3)ウシ毛包に存在する組織幹細胞の分離方法を確立し、下垂体細胞へ運命転換するメカニズムを検証することを目的として実験を計画した。ただし、コロナ禍による解剖個体の減少に伴い、一部の実験はマウスを用いて実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試動物

ウシ下垂体は鳥取家畜保健衛生所に死後搬入された0から12ヶ月齢黒毛和種およびホルスタイン種から摘出し、以下の実験に使用した。なお、雌雄の区別はしなかった。マウスは8-12週齢の雄 C57BL/6J マウスを使用した。

#### (2) ウシ下垂体前葉における組織幹細胞の局在解析

摘出したウシ下垂体を4%(w/v)パラホルムアルデヒド溶液で固定し、凍結組織ブロックを製作してクリオスタットにより8μm厚で薄切した。そして、幹細胞マーカーPRRX1およびSOX2に対する抗体を用いた免疫蛍光分析により、PRRX1/SOX2 二重陽性細胞の局在を解析した。さらには、PRRX1/SOX2 二重陽性細胞の分化の進行程度を調べるために、未分化細胞マーカー(上皮幹細胞マーカーEカドヘリンおよびサイトケラチン8/18ならびに濾胞星状細胞マーカーS100)および分化細胞マーカー(各種下垂体前葉ホルモン)に対する抗体を使用した免疫蛍光分析も実施した。

#### (3) ウシ下垂体前葉に存在する組織幹細胞の分離および分化誘導

ウシ下垂体前葉を段階的に酵素[0.4 U/mL コラゲナーゼ溶液、720 U/mL ディスパーゼ溶液および0.25%(w/v)トリプシン溶液]処理した後、ピペティングにより分散して初代細胞を調製した。次に、その細胞を幹細胞増殖培地(B27 サプリメント、20 ng/mL EGF および 20 ng/mL basic FGF を含む DMEM/Ham's F12 培地)に懸濁し、ガラスボトムディッシュに播種した。初代細胞は37°C および5%CO<sub>2</sub>/95%空気の条件において7日間培養し、増殖した細胞の性質を免疫蛍光分析および定量PCRにより解析した。増殖した細胞をトリプシン処理により剥離した後、分化誘導培地(2.5%牛胎仔血清および10%成馬血清を含むDMEM/Ham's F12 培地)に懸濁し、96 well-U 字ボトムプレートに播種して浮遊培養を実施した。そして、4日間細胞を観察して分化の指標となる凝集体形成能を調べた。

#### (4) マウス下垂体前葉組織幹細胞を用いた分化誘導条件の検討

マウス下垂体前葉から上記の方法により組織幹細胞を分離し、幹細胞増殖培地あるいは分化

誘導培地に懸濁して浮遊培養に供した。4日間培養後の細胞の性質は免疫蛍光分析により解析した。

#### (5) ウシ髭毛包の摘出とその性質の解析

本学附属フィールドサイエンスセンターで飼育されているウシ(黒毛和種、雌)の髭を引き抜き、実体顕微鏡下で毛包を摘出した。そして、その遺伝的性質を定量PCRにより調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) ウシ下垂体前葉における組織幹細胞の局在解析

免疫蛍光分析により、ウシ下垂体前葉における PRRX1/SOX2 二重陽性細胞の存在が証明された。また、その細胞は幹・前駆細胞を育む微小環境である Marginal Cell Layer を含めた組織全体に広く分布していることが明らかになった。さらには、PRRX1/SOX2 二重陽性細胞は上皮幹細胞マーカーEカドヘリンおよびサイトケラチン 8/18 にも陽性であった。一方、濾胞星状細胞マーカーS100 や各種下垂体前葉ホルモンには陰性であった。以上の結果から、ウシ下垂体前葉に存在する PRRX1/SOX2 二重陽性細胞は下垂体の組織幹細胞であることが示唆された。これらの成果は、国際学術誌に論文発表した[Oguchi et al. 2021, J Vet Med Sci 83(7):1031-1038]。

#### (2) ウシ下垂体前葉に存在する組織幹細胞の分離および分化誘導

ウシ下垂体前葉初代細胞をガラスボトムディッシュに播種したところ、一部の細胞が接着して増殖した。7日間培養した細胞の免疫蛍光分析の結果は、PRRX1/SOX2 二重陽性率がほぼ 100%であることを示した。また、この細胞はEカドヘリンやサイトケラチン 8/18 にも陽性であり、対照的にホルモンは陰性であった。そして、このような免疫学的特性はマウス下垂体前葉から分離した組織幹細胞と似ていた。定量PCRの結果からは、培養前よりも培養後の細胞において幹細胞マーカー発現量が高いこと、対照的にホルモン遺伝子発現量は顕著に低いことがわかった。一方、この細胞を浮遊培養に供しても凝集体は形成されなかった。以上より、ウシ下垂体前葉の組織幹細胞を分離することに成功したと考えられるが、分化誘導条件については更なる検討が必要となった。

#### (3) マウス下垂体前葉組織幹細胞を用いた分化誘導条件の検討

ウシ下垂体の入手が不定期であったため、定期的な下垂体の組織幹細胞を準備することが可能なマウスを用いて分化誘導条件の検討を行った。マウス下垂体前葉から分離した組織幹細胞を幹細胞増殖培地または分化誘導培地に懸濁してそれぞれを浮遊培養に供したところ、どちらも凝集体を形成した。次に、凝集体の免疫蛍光分析を実施したところ、幹細胞増殖培地で培養した細胞のホルモン陽性率は  $0.79 \pm 0.70\%$  であり、分化誘導培地で培養した細胞のホルモン陽性率は  $6.8 \pm 4.5\%$  であった。また、後者のホルモン陽性細胞のうちおよそ 3 割が性腺刺激ホルモンの一つである黄体形成ホルモン陽性細胞であった。以上より、血清含有培地で培養するとマウス下垂体前葉組織幹細胞はホルモン産生細胞へ分化することがわかった。これらを踏まえると、ウシ下垂体前葉から分離した組織幹細胞を分化誘導するためには、牛胎仔血清や成馬血清にはあまり含まれていない何らかの因子が重要であることが示唆された。これらの成果の一部は、国際学術誌に論文発表した[Shintani and Higuchi 2021, Stem Cell Res 52:102223]。

#### (4) ウシ髭毛包の摘出とその性質の解析

摘出したウシ髭毛包の遺伝的性質を定量PCRにより解析したところ、毛包幹細胞マーカー*Cd34* および *Nestin*、ケラチノサイトマーカー*Krt15*ならびにメラノサイトマーカー*Tyrp1*が発現していることがわかった。これらの遺伝的特徴はマウス髭毛包の実験結果と類似していたことから、ウシ髭毛包が適切に採取できたと考えられる。しかしながら、RNA抽出量から換算すると1頭から得られたウシ髭毛包の細胞数はかなり少なく、初代細胞培養に用いるほどの数を確保することができなかった。従って、生きた個体から適切な数の毛包を集めるには、DNA検査に用いられている尾房部などからの採取を検討する必要があるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shintani Aran, Higuchi Masashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Isolation of PRRX1-positive adult pituitary stem/progenitor cells from the marginal cell layer of the mouse anterior lobe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 OGUCHI Ai, HIGUCHI Masashi, YAMANO Yoshiaki	4. 巻 83
2. 論文標題 Localization of putative pituitary stem/progenitor cells in female dairy cattle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1031 - 1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 樋口雅司, 新谷亜蘭
2. 発表標題 マウス下垂体前葉に存在する神経堤由来の幹・前駆細胞の分離
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新谷亜蘭, 樋口雅司
2. 発表標題 マウス下垂体前葉の微小環境に存在するPRRX1陽性幹・前駆細胞の分離
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口雅司, 小口藍
2. 発表標題 乳牛下垂体に存在するSOX2陽性細胞は下垂体幹・前駆細胞の候補である
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------