

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380173

研究課題名（和文）単一幹細胞による臓器および個体の再生と家禽育種への活用

研究課題名（英文）Regeneration of the chick organs and the application for breeding by use of a stem cell

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（和文）：多能性を保持する胚性幹細胞及び体性幹細胞の樹立を試みた。さらに、これらの幹細胞の分化制御による家禽育種への活用を試みた。放卵直後のニワトリ胚盤葉より多能性を保持する幹細胞を採取した。この幹細胞をドナーとし、レシピエントに移植し、生殖細胞系列キメラを効率的に作出した。体性幹細胞は、初生雛の骨髄細胞から採取した。この細胞をドナーとしレシピエント胚に移植したところ、キメラの血管系や心臓部に集積し、血管内皮細胞として再生した。また脂肪由来幹細胞の培養によって骨細胞への分化制御が可能となった。これらの結果から鶏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。これらの成果は家禽育種へ活用し得るものと期待された。

研究成果の概要（英文）：Stem cells which retained pluripotency was isolated from the chick embryos or somatic cells. The obtained stem cells were used as donor cell for making germline and somatic chimeras. The embryonic stem cells were derived from area pellucida of stage X blastoderm. The somatic stem cells were obtained from bone marrow cells or adipocytes. The germline chimeras were effectively generated by the embryonic stem cells. The bone marrow cells or adipocyte could be regenerated into vein, muscle or bone cells. Due to these results, the stem cells could be useful tools for future poultry breeding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2012年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：家禽幹細胞工学

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：育種, 胚性幹細胞, 体性幹細胞, 臓器, 器官, 再生, 家禽

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多能性を保持する幹細胞の分化制御と臓器再生の研究は、広範な学問分野に多大な影響を及ぼしている。例えば、哺乳類（主に

ヒトやマウス）の胚性幹細胞や骨髄細胞を培養して、組織、器官、臓器を再生する研究が世界中で競合的に展開されている。哺乳類において、一般に胚盤胞の内部細胞塊に由来す

る細胞を培養し多能性細胞株が樹立されてきた。さらに胚性幹細胞の樹立は内部細胞塊からの誘導のみならず、栄養膜細胞からの誘導も可能になりつつある。

家禽においても、胚性幹細胞や体性幹細胞の樹立に関する研究が世界の先導的研究機関において活発に展開されている。しかし今日に至も、家禽においては、当該研究は哺乳類と比べ知見及び技術の集積が極めて乏しい。そこで家禽胚性・体性幹細胞を単離し、これらの細胞の分化制御によって、組織、器官、臓器、の再生を試みた。さらに、これらの成果に基づき家禽育種への活用を展望した。

## 2. 研究の目的

多能性を保持する幹細胞の分化制御によって、組織、器官、臓器を再生する研究は、生命科学において達成すべき最も重要な研究課題の一つであろうと思われる。とりわけ、哺乳類（主にヒトやマウス）の幹細胞（胚性幹細胞や体性幹細胞）を合目的に分化制御し、各種の組織、器官、臓器を再生する研究が世界中で展開されている。

しかし現在に至も、家禽においては、幹細胞の分化制御による器官、臓器の再生はほとんど成し遂げられていない。本課題においては、家禽（主にニワトリ）の胚性幹細胞及び体性幹細胞の厳密な単離を試みた。胚性幹細胞は放卵直後の胚盤葉細胞を基幹細胞として利用したとした。また、体性幹細胞の樹立に関しては、骨髄幹細胞、及び脂肪幹細胞を基幹細胞とした。

これらの幹細胞の発生・分化における遺伝子制御機構の解明も試みた。様々な組織、器官、臓器において分化した細胞においても、細胞相互のゲノム配列は基本的に同一である。しかしこれらの形態や機能は明瞭に異なる。よって発生分化における遺伝子制御機構の解析も試みた。

これら一連の研究によって得られる、分子、細胞、個体、レベルでの新たな知見や新技術を統合的に活用し、効率的な家禽臓器・個体再生を試みる。更に、得られた知見を元に家禽育種への統合的な活用を試みる。

## 3. 研究の方法

FACS 解析や SP 細胞分取法を活用し、家禽胚性幹細胞及び体性幹細胞の同定・分取を試みた。また、これらの幹細胞の分化制御による臓器・個体再生を家禽（主にニワトリ）において試みた。

放卵直後の発生過程 X の胚盤葉における明域中央部よりターゲットとなる細胞を採取した。得られた細胞塊を単一解離細胞へと解離した。これらの細胞培養においては、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。さらにこれらの培養細胞（胚

性幹細胞）をドナーとして活用した。レシピエント胚盤葉下腔に幹細胞（ドナー細胞）を移植した。こうして作出したキメラにおいて、細胞の挙動、発生、分化、の機構を細胞分子生物学的に解析した。また生殖細胞きめらが性成熟に達した後に、これらのキメラにおけるドナー細胞のキメラ生殖腺内における機能的な配偶子への発生及を解析した。さらに、家禽始原生殖細胞の簡易で効率的な採取法の開発を試みた。ニワトリ初期胚において、循環血液を採取し、ACK 処理して血球を破壊した。これらを用いた生殖系列キメラ作出の可否を検討した。

家禽における体性幹細胞を分取するため、初生雛から骨髄細胞を分離し、Lympholyte-M を加え、多能性細胞を分離した。さらに脂肪幹細胞の単離を試みた。これらの体性幹細胞を培養し、ドナーとしレシピエントに移植し、組織、臓器の再生を試みた。

さらに幹細胞における遺伝子発現制御機構の解析を試みた。胚性及び体性幹細胞よりゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化感受性酵素で消化した。消化サンプルを電気泳動しエビジェネティックな遺伝子発現解析を試みた。

## 4. 研究成果

胚性幹細胞の単離においては、ニワトリ発生過程 X（胚盤葉）の中央部に存在する明域より細胞塊を採取した。得られた細胞塊をピペティングによって完全に解離した。この解離細胞は試験管内で培養したところ、明瞭な細胞塊の形成が確認された。これらの細胞塊は多能性マーカーを用いた免疫組織化学的染色によって強く染色された。また、Spo11、Stra 等の強い遺伝子発現が確認された。培養細胞をドナーとし、レシピエントに移植しキメラを作出した。作出されたキメラにおいては、移植細胞（ドナー細胞）は初期胚の血管系に侵入し、各種体細胞系列の組織、器官、臓器へと発生分化し得ることが確認された。さらにこれらの細胞は、生殖腺内においても発生分化し得ることが確認された。このことから、ニワトリ胚性幹細胞は、キメラにおいて、配偶子や各種の体細胞系譜へと効率的に再生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、希少鳥類の再生を試みた。作出した雌雄の生殖細胞キメラ同士の交配によって、産卵系（白色レグホン）を解した希少鳥類の再生にも成功した。

体性幹細胞の研究においては、循環血を ACK で処理して血球を破壊した。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る可能性が示唆された。これらの始原生殖細胞様細胞を継続培養し、純度の高い始原生殖細胞の単離を成し遂げた。これらの細胞からを用いて遺伝子発現解析を行ったところ、生殖細胞分化制御遺伝子の強い発現が認めら

れた。さらに、生殖細胞制御遺伝子 (Cvh) を用いた免疫組織化学的解析の結果から、強い発現が検出された。前述の結果から、新たな生殖幹細胞の採取方法を開発した。体性幹細胞の研究においては骨髄細胞及び脂肪幹細胞を基幹細胞とした。骨髄細胞をFACSまたはSide Population法によって分取したところ、多能性を保持する細胞が得られた。これらの細胞をドナーとして体細胞系列キメラを作成した。体細胞キメラの作成において、放射線照射を施したところ、レシピエント臓器の萎縮を誘発し得ることが明らかになった。そこで事前に調整したドナー脂肪幹細胞をPKH26で標識し、UV照射したレシピエント胚に移植した所、移植した脂肪幹細胞はレシピエント胚に定着し、キメラ体内で骨芽細胞として再生した。これによりドナー脂肪幹細胞が骨細胞系を再生し得ることが明らかとなった。またドナー骨髄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、血管内皮細胞制御遺伝子の強い発現が確認された。よって採取した骨髄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。

上記一連の研究結果から、家禽における初期胚由来幹細胞（胚性幹細胞）、及び体性幹細胞（骨髄細胞及び脂肪幹細胞）の多分化能・再生能が明らかとなった。更にこれらの幹細胞の移植によって、効率的に生殖細胞系・各種体細胞系キメラを作成し得ることが明らかとなった。本研究結果により、各種の臓器・器官再生の新規実験系確立を開拓した。本研究課題を通じた一連の研究結果は国内外で極めて高く評価された。我々の研究遂行能力は当該研究者に極めて高く評価され、信州大学農学部で幹細胞工学の世界的研究者が集結し、国際動物バイオテクノロジー会議を成功裡に開催することができた（2012年1月、於信州大学農学部）  
胚性・体幹細胞分化制御とそれに基づく臓器・個体再生の推進によって、将来的には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7件）

1. Nakamura, Y., Kagami, H., Tagami, T. (2013) Development, Differentiation and Manipulation of Chicken Germ Cells. *Development, Growth & Differentiation*, 55: 20-40. (査読有)

2. Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, T., Ono, T., Kagami, H., Takeda, K., Nirasawa, K., Tagami, T. (2012)

X-irradiation Removes Endogenous Primordial Germ Cells (PGCs) and Increases Germline Transmission of Donor PGCs in Chimeric Chickens, *Journal of Reproduction and Development*, 58, 432-437. (査読有)

3. Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, T., Ono, T., Kagami, H., Takeda, K., Nirasawa, K., Tagami, T. (2012) X-irradiation

Removes Endogenous Primordial Germ Cells (PGCs) and Increases Germline Transmission of Donor PGCs in Chimeric Chickens, *Journal of Reproduction and Development*, 58, 432-437. (査読有)

4. Matsubara, Y., Hirota, A., Sobajima, H., Kagami, H., Tagami, T. and Yasue, H. (2011) A Simple Culture method of Chicken Blastodermal Cells for Germline Transmission. *Journal of Poultry Science*, 48, 14-18. (査読有)

5. Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H.

and Tagami, T. (2010) Efficient System for Preservation and Regeneration of Genetic Resources in Chicken: Concurrent Store of Primordial Germ Cells and Live Animals from early Embryos of A Rare Indigenous Fowl (Gifujidoro). *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 1237-1344. (査読有)

6. Nakamura, Y., Usui, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T. (2010) Germline Replacement by Transfer of Primordial Germ Cells into Partially Sterilized Embryos in

the Chicken. *Biology of Reproduction*, 83: 130-137. (査読有り)

7. Usui, F., Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Tatsumi, K., Tominari, K., Ono, T. and Kagami, H. (2010) A Novel Concentration System of Chicken Stem Cells by Bone Marrow Side Population Cells. *Journal of Poultry Science*, 47: 53-56. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

1. 鏡味裕. 幹細胞の畜産への活用. 日本畜産学会第 116 回大会、広島、2013 年 3 月 29 日.

2. Kagami, H. Future Possibility and Current Status of Animal Stem Cell Technology. The 2<sup>nd</sup> Japan-Korea-China Joint Symposium, Society for Reproduction, Tsukuba, September 5, 2012.

3. Kagami, H. Perspective for Animal Biotechnology. International Symposium on Animal Biotechnology, Minamiminowa, January 31, 2012.

4. 鏡味裕、中村隼明、宮原大地、森貴史、渡辺晴陽、大西翔、砂岡耕平、田中健生、田村芽衣、小野珠乙、松原悠子、葦澤圭二郎、田上貴寛. 幹細胞分化制御による鳥類生殖工学への応用. 第104回日本繁殖生物学会大会、盛岡、2011年9月2日.

5. 鏡味裕、中村隼明、宮原大地、森貴史、渡辺晴陽、今井一樹、中村幸夫、小野珠乙、松原悠子、中村俊、小柴満美子、葦澤圭二郎、田上貴寛. ニワトリ幹細胞の培養条件検討と単一幹細胞培養への活用. 日本畜産学会114回大会、十和田、2011年8月. 日本畜産学会114回大会、十和田、2011年8月26日.

6. 鏡味裕、臼井文武、中村隼明、山本耕裕、宮原大地、森貴史、渡辺晴陽、今井一樹、小野珠乙、松原悠子、葦澤圭二郎、田上貴寛. 迅速簡便法による各ニワトリ品種の始原生殖細胞の採取と特性評価. 日本家禽学会 2011 年度春季大会、厚木、2011 年 3 月 30 日.

7. Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, T., Watanabe, H., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, Kagami, H., Tagami, T. Effect of X-ray Irradiation of Primordial Germ Cell-depletion in Chicken Embryos. 9th Asia Pacific Poultry Conference, Taipei, March 22, 2011.

8. Kagami, H. Mixed Sex Chimeras and Sex Reversal. 1<sup>st</sup> International Symposium on Conservation & Propagation of Endangered Species of Birds. Abu Dhabi, February 8, 2011.

9. Kagami, H., Usui, F., Nakamura, Y., Kashiwagi, M., Yamamoto, Y., Ono, T., Tagami, T., Nirasawa, K., Matsubara, Y., Petite, J.N. Avian Stem Cells and the Application for Biotechnology. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologist, Kyoto, June 21, 2010.

10. 中村隼明、宮原大地、森貴史、今井一樹、渡辺晴陽、小野珠乙、武田久美子、葦澤圭二郎、鏡味裕、田上貴寛. ニワトリ始原生殖細胞の利用：移動様式の解明と凍結保存・移植・除去技術の確立. 日本分子生物学会第 10 回春季シンポジウム、松島、2010 年 6 月 7 日.

11. 宮原大地、今井一樹、森貴史、坂田縉子、坪井友子、都築明香里、中村隼明、臼井文武、山本耕裕、田上貴寛、葦澤圭二郎、松原悠子、川口耕一郎、藤井博、小野珠乙、鏡味裕. ニワトリ幹細胞・始原生殖細胞の遺伝的特徴解

析と分化制御の試み. 日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、松島、2010年6月7日.

12. 鏡味裕、臼井文武、中村隼明、柏木まや、伊東陽平、山本耕裕、田上貴寛、葦澤圭二郎、松原悠子、小野珠乙. ニワトリ幹細胞・始原生殖細胞の培養と発生・分化における特徴把握. 日本畜産学会112回大会、東京、2010年3月29日.

13. 鏡味裕、柏木まや、大屋智子、臼井文武、中村隼明、山本耕裕、小野珠乙. 始原生殖細胞の新規採取法の開発と生殖細胞キメラ作出への活用. 発生・分化における特徴把握. 日本家禽学会2010年度春季大会、東京、2010年3月29日.

14. 鏡味裕、臼井文武、中村隼明、山本耕裕、大友朝子、柏木まや、田上貴寛、葦澤圭二郎、松原悠子、小野珠乙. 幹細胞・生殖細胞の遺伝的特徴把握と鳥類における発生・再生制御への活用の試み. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月10日.

15. 中村隼明、臼井文武、柏木まや、坂田詢子、小野珠乙、武田久美子、葦澤圭二郎、鏡味裕、田上貴寛. 始原生殖細胞とその収集時に温存したニワトリ胚からの個体再生. 日本畜産学会111回大会、那覇、2009年9月28日.

16. 柏木まや、中村隼明、山本耕裕、臼井文武、川越雄太、松原和衛、小野珠乙、鏡味裕. 胚盤葉明域中央部への局所的UV照射及び生殖新月環へのUV照射を用いたレシピエント胚由来PGCs数減少の試み. 日本畜産学会111回大会、那覇、2009年9月28日.

17. 鏡味裕、臼井文武、中村隼明、山本耕裕、

大友朝子、柏木まや、片倉真沙美、田上貴寛、葦澤圭二郎、松原悠子、小野珠乙. ニワトリ幹細胞及び始原生殖細胞の発生に伴う遺伝子発現の解析と分化制御への活用の試み. 日本畜産学会111回大会、那覇、2009年9月28日.

18. 中村隼明、臼井文武、柏木まや、坂田詢子、小野珠乙、武田久美子、葦澤圭二郎、鏡味裕、田上貴寛. 凍結融解操作がニワトリ始原生殖細胞の生存性および生殖巣移住能へ及ぼす影響. 日本家禽学会2009年度秋季大会、那覇、2009年9月26日.

19. 臼井文武、中村隼明、小野珠乙、鏡味裕. 造血幹細胞同定を目的とした致死量放射線量の探索. 日本家禽学会2009年度秋季大会、那覇、2009年9月26日.

20. 中村隼明、臼井文武、柏木まや、坂田詢子、小野珠乙、武田久美子、葦澤圭二郎、鏡味裕、田上貴寛. 宿主の内因性始原生殖細胞の除去によるドナー由来の生殖系譜に置換されたキメラニワトリの作出用. 第102回日本繁殖生物学大会、奈良、2009年9月10日.

[図書] (計2件)

1. 鏡味裕. (2011)鳥類の受精、発生、胚操作. 新動物生殖学 (佐藤英明編著)、朝倉書店 (ISBN978-4-254-45027-9) pp. 151-160.

2. 臼井文武、小野珠乙、鏡味裕. (2009)ニワトリ初期胚におけるDNAメチル化状態の変化. DNA多型 Vol. 17 (日本DNA多型学会編)、東洋書店 (ISBN978-4-88595-849-6) pp. 216-218.

[その他]

ホームページ等

[http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/on\\_o\\_kagami/hasseiken.htm](http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/on_o_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

(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

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：