

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 23 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871106

研究課題名(和文)ブタ精子幹細胞の単離・濃縮法および移植法の開発

研究課題名(英文)Purification and transplantation of spermatogial stem cells in pig

## 研究代表者

千本 正一郎 (Sembon, Shoichiro)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・医用モデルブタ研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：60372661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：クローンブタの作製が2000年に成功して以降、体細胞核移植技術は遺伝子改変技術と合わせて異種移植、生体組織工学、動物疾患モデルなどの様々な生物医学研究分野に応用されているが、その効率は依然として低い。新たな手法として、実験動物であるマウスでは精子幹細胞を利用した遺伝子組換え技術が考案されており、その技術を家畜に応用することを目的として、本課題をスタートした。本課題では、ブタ精子幹細胞特異的バイオマーカーを明らかにし、それらを指標としてブタ精子幹細胞の効率的な単離・濃縮法の開発に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Since the successful production of cloned pigs in 2000, somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been applied to a variety of biomedical researches including xenotransplantation, tissue engineering and animal disease models. While the use of the SCNT technique has increased, however, cloning efficiency is still considered to be fairly low. Instead, a genetically-modified technology using a spermatogonial stem cells is devised in mice. This project has been started for applying the technology to a domestic animal. In this project, a biomarker specific to porcine spermatogonial stem cells have been identified. Then we tried to develop the methods for isolation and purification of porcine spermatogonial stem cells using the specific markers.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ブタ 精子幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

家畜においては体細胞クローン技術を用いて遺伝子組換え個体が作製されているが、その作出効率は依然として低い。一方でマウスでは精巣内に存在する精子幹細胞由来の germline stem cells (GS 細胞) が樹立され、その細胞を用いた新たな遺伝子改変個体の作出方法が開発されていた。本研究では、健康医療産業分野での利活用が期待されているブタにおいて、この技術を応用することを最終目標として、GS 細胞のもととなる精子幹細胞の単離・濃縮法および他個体への移植法の開発を目指していた。

## 2. 研究の目的

本課題では、マウスにおいて既に可能となっている精子幹細胞を利用した遺伝子個体作製技術を家畜(本課題ではブタ)に応用することを目的とした。そのため、まず、ブタ精巣内の精子幹細胞の動態を把握し、その単離・濃縮技術の開発に努めた。

## 3. 研究の方法

### (1) ブタ精巣成長過程における生殖細胞系列の動態の観察

ブタ精巣内の精子幹細胞の動態変化を観察するため、様々な成長過程(生後直後から性成熟に至るまで)の精巣を採取し、それらを組織学的に観察した。ブタ精子幹細胞のマーカー候補タンパク質の局在を免疫組織学手法によって調べた。また、成長段階の異なる精巣組織をサンプルとして減数分裂特異的に発現する遺伝子の発現を調べることによって、減数分裂期に入った生殖細胞が出現する精巣成長時期を特定した。

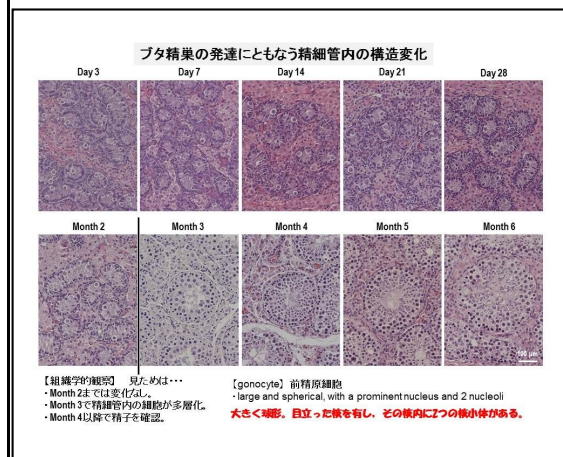
### (2) ブタ精子幹細胞の単離・濃縮法の開発

マウスなどの先行研究をもとにブタ精巣から精子幹細胞を単離・濃縮する方法を検討した。精巣組織を酵素で処理して細胞を分散させ、細胞を単離し、単離した精巣細胞を密度勾配遠心法や differential plating 法に供して不要な細胞を極力除去し、精子幹細胞を効率的に分離・濃縮する方法条件を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ブタ精巣成長過程における生殖細胞系列の動態の観察

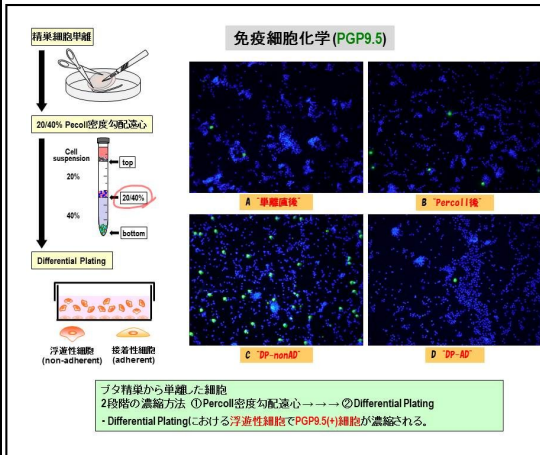
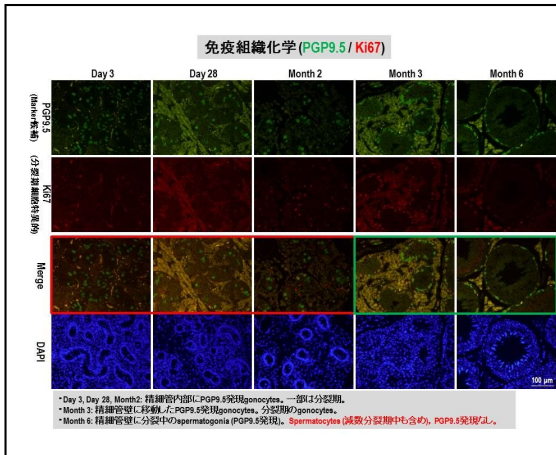
様々な生後齢の精巣(生後直後(生後3日)から成豚(6ヶ月齢))をサンプルとし、減数分裂期細胞特異的遺伝子(Haspin, SYCP3, DMC1)の発現時期を定量 RT-PCR を用いて調べた。いずれの遺伝子も3ヶ月齢以降の精巣から発現が観察された。組織学的観察では、3ヶ月齢の精巣精細管内では生殖細胞の多層化が始まり、4ヶ月齢の精巣では造精が起きていることがわかった。



また、哺乳類で生殖細胞や幹細胞に特異的に発現すると報告されている遺伝子数種のタンパク質レベルでの発現を免疫組織化学的に調べた。その結果、PGP9.5 は生後直後から成豚の精細管中の生殖細胞に発現がみられた。また4ヶ月以上の精巣では精細管壁に沿って局在しており、それらの一部は、分裂期細胞特異的に発現する Ki67 positive な細胞であった。生殖幹細胞が局在する niche は精細管壁であるという定説を考慮すると、PGP9.5(+)/Ki67(+)細胞が分裂・増殖中のブタ精子幹細胞であると判断してよいと考える。以上の結果から、ブタ精巣の成長過程においては一貫して PGP9.5 が精子幹細胞のマーカーとなりうることを示唆された。

### (2) ブタ精子幹細胞の単離・濃縮法の開発

ブタの精巣から精子幹細胞を単離・濃縮することを目的として、まず細胞単離法の開発を進めた。野生型交雑種のブタ新生仔(生後4週未満)の精巣を材料として実験を実施し



た。細切した精巣組織片を, collagenase, hyaluronidase, DNaseI 等の細胞分散酵素を含んだ培養液中で処理すると, 85%以上の生存した精巣細胞が回収された。また, 酵素処理後に vortex 処理すると細胞が効率的に分散され, また溶血剤で処理しても精巣細胞の生存率に大きな影響はないことがわかった。

上述(1)ブタ精巣成長過程における生殖細胞系列の動態の観察 によって, PGP9.5 がブタの精子幹細胞マーカーとなりうることを示唆されたため, 密度勾配遠心法や differential plating 法等, 濃縮工程後の精子幹細胞の割合を, PGP9.5 を指標として算出した。发育段階の異なるブタの精巣(生後1,2,3,4,5 および6ヶ月齢)を実験材料としてブタ精子幹細胞の濃縮を試みた結果, いずれの发育段階の精巣を用いても90%程度の生存率で細胞が回収可能であった。その一方, 単位重量あたりの回収細胞数は造成後の精巣(4ヶ月齢以上)より造成前の精巣(3ヶ月齢以上)が多いことが分かった。また, 酵素処理直後の精巣細胞のうち PGP9.5 陽性細胞は0.5%以下であったが, percoll 密度遠心勾配法および differential plating 法を用いることで PGP9.5 陽性細胞の割合は3%程度まで高められることが明らかとなった。

以上の結果より, ブタの精子幹細胞の濃縮が可能であることが示されたものの, 総回収細胞のうち精子幹細胞の割合が3%程度と, 依然としてその濃縮精度は低いと判断せざるを得ない。マウスなどの他の哺乳類を用いた研究では, 細胞表面抗原を指標として FACS, MACS 等セルソーターを用いてより濃縮効

率を高めることが可能であるとの報告例がある。本研究課題は本年度をもって終了するが, 今後ブタを含めた家畜の精子幹細胞の利用を目的とした研究の展開を考えれば, 濃縮効率を改善する方法を考案する必要がある。また, 得られた精子幹細胞を他個体の精巣に移植し, それらが機能的に振る舞うことが可能であるかの原理実証実験を行う予定であったが, 本課題では, そこまでの検証に至らなかった。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

千本正一郎 (SHOICHIRO SEMBON)  
 農業生物資源研究所 医用モデルブタ研究  
 開発ユニット 主任研究員  
 研究者番号: 60372661

### (2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし