

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 年度～2009 年度
 課題番号：19780214
 研究課題名（和文） ニワトリにおける生殖幹細胞の同定
 研究課題名（英文） Identification of the chicken germ stem cells
 研究代表者 恒川 直樹
 （東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教）
 研究者番号：50431838

研究成果の概要（和文）：

ニワトリにおける生殖幹細胞の同定は、未だその存在すら同定されていないのが現状で、本研究課題では、生殖細胞に特異的な分子指標である Vasa 抗体を用いて、免疫組織化学的にその存在の有無について、個体発生過程を通じて精査した。その結果、精祖細胞ならびに卵祖細胞が、これまでの報告にはみられない異所的な局在を見いだすことができた。その培養を試みたが、一時的な培養に留まり、培養液のさらなる改良が必要と考えられた。

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2200000	0	2200000
20 年度	700000	210000	910000
21 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3400000	360000	3760000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：形態、発生工学、発生、生殖細胞、生殖幹細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでのところ、複数の研究機関において、マウスの生殖幹細胞が同定されている。生殖幹細胞は、その実体は完全には解き明かされていないが、個体発生の特定の時期に運命決定され、精巣においては組織内の限られた場所に位置することが知られている。これは精

子を生み出すファウンダーの細胞であり、胚性幹（Embryonic Stem）細胞に類似した性格を持つことから、再生医療分野や生殖医療分野において注目が集まっている。一方、ニワトリにおける生殖幹細胞の同定は、未だその存在すら同定されていないのが現状で、本研究課題は、例えば雄の精巣の場合、精細管構

造を採用している点において哺乳類との共通機構が備わっていると想定され、比較発生生物学的な視点に於いて意義深く、かつ、安定した遺伝子改変動物作出においても大きく貢献することになる。また人類にとって貴重な産業動物でもあることから、バイオリソースを人為的管理する目的において格好の対象になり、希少鳥類の保護にも貢献することになる。

2. 研究の目的

多細胞生物の身体は、生殖細胞と体細胞という2種類の細胞から構成される。このうち生殖細胞は次世代への遺伝子伝達を行い、連続とした生物の種の遺伝や進化を担う。多くの動物において、生殖細胞は胚発生の早い時期に確立され、体細胞系列とは全く異なったプログラムを進行させている。発生遺伝学の代表的なモデル動物であるマウスなどにおいては、近年、生殖細胞の発生に関わる分子メカニズムが、少しずつ解き明かされつつあるが、ニワトリは、その基礎情報が極めて乏しいことから、生殖工学や遺伝子資源の保全の発展を阻む主たる原因となっている。本研究課題ではニワトリを材料にして、生殖細胞の幹細胞である生殖幹細胞 (Germ Stem Cells)の同定を試み、その機能的特性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

生殖細胞を特異的に標識する抗ニワトリ Vasa ホモログ抗体を用い、生殖幹細胞の候補となる細胞を、様々な発育過程の雌雄個体を材料にして、組織学的解析を行った。本抗体

は、本研究課題に先立ち、既に調整済みであり、体細胞への免疫反応が一切認められないことを追記する。材料として、初生雛、成熟個体、老齢個体の精巣、卵巣さらに生殖腺の周辺組織を準備した。未発達な右側卵巣領域も研究対象とする。続いて本抗体を用いることにより、生殖細胞の分布様式を免疫組織化学的に解析した。摘出された生殖腺組織をブアン液にて固定し、情報に従ってパラフィン切片を作製し、DAB によって陽性シグナルを可視化した。生殖幹細胞の候補となる細胞の培養を試みた。培養は、ニワトリ ES 様細胞で用いられる培地を一部改変して行い、初生雛の精巣組織ならびに卵巣組織を摘出し、培養を試みた。細胞の解離は、摘出された組織をコラゲナーゼで 37°C、10 分間処理し、0.05% トリプシン-EDTA にて細胞の接着を剥離し、酵素処理が不完全な細胞群をメッシュフィルターで取り除いた。これを培養の対象とした。培地には DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen)、5% FBS: Fetal Bovine Serum (Invitrogen)、5% Chicken Serum (Invitrogen)、5% 初生雛血清、1mM Sodium Pyruvate (Invitrogen)、1% Non-essential amino acid (Invitrogen)、B-mercaptoethanol (Sigma)、Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Invitrogen)を用いた。また、成長因子の最終濃度は、LIF (104 U/ml)、bFGF 40 ng/ml、IGF-1 6.25 ng/ml、hSCF 10 ng/ml を基本培地として培養を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学による組織学的解析

雌雄ともに、性分化後のステージにあたる孵卵 6 日胚子から初生雛までの胚子を対象にし

た。用いた材料では、すべての生殖細胞に於いてVasa陽性で可視化された。雄において、精巣索の形成に伴って、生殖細胞はコードに取り込まれ、始原生殖細胞から前精原細胞への分化課程を追うことができた。ここで注目すべく細胞を見いだすことができた。始原生殖細胞は、もともと生殖腺原器に備わっている細胞ではなく、背側腸間膜を移動して生殖腺原器に到達するが、その課程で生殖腺と背側腸間膜の境界領域に位置する始原生殖細胞が存在する。これに対して背側腸間膜に位置する始原生殖細胞は、発生に伴ってアポトーシスで死滅することが知られているが、本研究を通じて明らかになったことは、境界領域に位置する生殖細胞は、少なくとも初生雛まで残ることを見いだした。その領域は、精巣と精巣上体を連絡し、その領域に生殖細胞が蓄積されることの意義は、今後精査しなくてはならない。雌においては、発生に伴い、卵巣組織では卵巣索が形成され、卵巣組織の皮質と髄質の間で生殖細胞の発生に大きな違いを生じる。孵卵9日胚子頃から始原生殖細胞から卵祖細胞への分化が進行し、13日胚子になると卵祖細胞から卵母細胞への分化が始まる。しかしながら、卵母細胞への分化が進行するのは、卵巣組織の皮質に局限し、髄質に位置する生殖細胞は、形態学的に卵祖細胞として評価される。卵母細胞と卵祖細胞の両者において、Vasa抗体によって陽性シグナルとして認められるが、その免疫染色性が異なる。卵母細胞は卵祖細胞に比べて弱いことが見いだされ、このため、両者の区別は極めて容易であることが判明した。卵巣髄質に認められる卵祖細胞は、初生雛までその数を増すことなく維持され、成熟個体においても同様の細胞が認められた。実験的に卵巣切除された個体に、生殖腺が再形成される古典的な研究成果を強く指示する結果と考えるこ

とができる。

培養は、初生雛から得られた生殖腺組織を用いて行われた。雄個体においては、生殖腺組織の再構成が認められ、期待通りの培養が困難であった。このため、体細胞を極力取り除くため、細胞の解離後、生殖細胞を顕微鏡下で単離して培養を行った。最初の1週間は、順調に増殖傾向にあったが、10日目を境に培養の継続が困難になった。雌においても同様、体細胞組織を取り除いた上で培養を試みた。出発となる細胞には、卵母細胞と卵祖細胞が混在していたが、途中過程の免疫染色の結果から、卵祖細胞が増殖していると考えられた。しかしながら、10日目を境に増殖能は失われ、培養による成果は好ましくなかった。さらなる培地の改良が望まれた。

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3件)

Hara, K., Kanai-Azuma, M., Uemura, M., Shitara, H., Taya, C., Yonekawa, H., Kawakami, H., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., Kanai, Y. (2009). Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. *Dev Biol* 330, 427-439 (査読有)

恒川 直樹 (2007) 家禽資源の保存をめざして (2) 家禽資源の価値、家禽資源研究会報 (ISSN1880-2303) 9, 8-10. (査読無)

恒川 直樹 (2007) 家禽資源の保存をめざして (1) 生殖細胞の発生、家禽資源研究会報

(ISSN1880-2303) 8, 16-18. (査読無)

[学会発表] (計1件)

Tsunekawa, N., Kanai, Y., Kurohmaru, M.,
Germ Cell Development in Chicken., *The
2nd Conference of the Asian Association of
Veterinary Anatomists*, September, 2007,
Bangkok, Thailand

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恒川 直樹 (東京大学・大学院農学生命科学
研究科・助教)

研究者番号: 50431838

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: