

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14570

研究課題名（和文）精子幹細胞の移植を用いたニワトリ発生工学研究基盤の構築

研究課題名（英文）Establishment of basic technologies for developmental engineering using transplantation of spermatogenic stem cells in chicken

研究代表者

中村 隼明（Nakamura, Yoshiaki）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・助教

研究者番号：30613723

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）：本研究では、精子幹細胞の移植によるニワトリ発生工学の研究基盤を整備した。ニワトリにおいて効率的な内在性生殖細胞の除去法を開発した。現在、本法がニワトリ精子幹細胞移植のための宿主として利用可能か検討している。精子幹細胞の移植効率を改善する方法論を構築するため、マウスを用いて精子幹細胞の振舞いを単一細胞レベルで解析した。その結果、移植後に生着した精子幹細胞の大部分は分化と細胞死で消失することを発見した。また、移植した精子幹細胞の分化を抑制することで、移植効率が飛躍的に向上した。現在、この方法論をニワトリの精子幹細胞移植へ応用するため、精子幹細胞の分化を抑制可能なアプローチを探索している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスで開発された精子幹細胞の移植法は、遺伝的多様性の保全や男性不妊治療への応用が期待されている。ニワトリにおいても精子幹細胞移植の成功例はあるが、実用レベルには達していない。本研究で開発したニワトリ生殖細胞の効率的な除去法は、精子幹細胞の移植に利用可能か検討中であるものの、始原生殖細胞の移植には利用可能であった。また、マウスで確立した精子幹細胞の移植効率を改善する方法論は、定説を覆すものであり、特にがん治療後の妊孕性回復へ貢献することが期待される。本研究では、この方法論がニワトリ精子幹細胞移植へ応用できるか結論を出すに至らなかったため、今後多角的なアプローチで検討を進める必要がある。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to improve research infrastructure in the field of chicken developmental engineering using transplantation of spermatogonial stem cells (SSCs). Using chicken as a model, an effective method for removal of endogenous germ cells was developed. The feasibility of this method for chicken SSC transplantation are to be evaluated in near future but is available for transplantation of primordial germ cells, progenitor cells for SSCs. To establish a strategy to improve SSC transplantation, fate behavior of individual SSCs were analyzed in mouse. As a result, transplanted SSCs follow stochastic fate and a major fraction of them were lost through differentiation and cell death. Based on this finding, SSC transplantation efficiency was dramatically improved by inhibiting differentiation of transplanted SSCs. To apply this strategy to chicken SSC transplantation, an approach to inhibit differentiation of chicken SSCs to be explored in near future.

研究分野：発生工学

キーワード：ニワトリ マウス 始原生殖細胞 精子幹細胞 移植

1. 研究開始当初の背景

家禽、特にニワトリは、高品質なタンパク質である卵や肉を生産するための産業動物として世界中で広く飼育されているほか、実験動物としてとりわけ発生学の研究分野において広く利用されてきた。このため、ニワトリ遺伝資源の保存は、レイヤーやブロイラーなどに代表される産業有用品種ならびに突然変異体や近交系などの実験モデルのバックアップという2つの観点から大変重要である。細胞の凍結保存技術が開発されたことにより、その細胞の遺伝的特性を変化させることなく、多様な遺伝資源を半永久的に保存することが可能になった。しかし、細胞レベルでの遺伝資源保存を推進するためには、凍結保存した細胞から再び個体を作る技術の開発が不可欠である。このため、個体の持つ遺伝情報を次世代へ伝達し、個体発生の起点となる生殖細胞は、凍結保存のターゲットとして最適であると考えられる。主要な家畜では、精液の凍結保存と人工授精、受精卵(胚)の凍結保存と胚移植が確立されており、これらの技術は特にウシの生産現場において広く実用されている。また、一連の技術は、ヒト不妊治療の現場においても広く利用されている。一方、家禽では、精液の凍結保存はニワトリの一部の品種で可能になっているものの、実用レベルには達していない。また、シチメンチョウやカモ、ホロホロチョウ、ウズラといった種では、凍結融解後の受精率が著しく低い、あるいは受精能を損失するといった課題がある。鳥類の胚は脂質を豊富に含む巨大な卵黄に付着しているため、凍結保存は技術的に困難である。このため、現在、家禽の遺伝資源は生体による継代・維持が主流である。しかし、生体による維持は飼料コストや特殊な施設が必要であるうえ、高病原性インフルエンザに代表される感染症の発症や予測不能な自然災害によって、貴重な遺伝資源を損失するリスクを抱えている。このように、家禽遺伝資源の凍結保存は、他の動物種よりも立ち遅れており、その技術開発は早急に対応すべき課題であった。

始原生殖細胞 (PGCs) は、初期発生の過程において出現する精子ならびに卵の前駆細胞である。鳥類では、胚体外で出現した PGCs が生殖原基へと移動する過程において、血流中を一時的に循環する特徴を持つ。この特徴を利用して、図1で示すように血流中あるいは生殖巣から分離した PGCs を他の胚(宿主胚)の血流中へ移植し、機能的な精子ならびに卵へ分化させる技術がニワトリにおいて開発された (Tajima *et al.*, *Theriogenology* 1993; Tajima *et al.* *Journal of Experimental Zoology* 1998)。ニワトリ PGCs のサイズは 15~20 μm であり、精子ならびに卵への分化能を維持したまま凍結保存することが可能である (Naito *et al.*, *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; Nakamura *et al.* *Reproduction, Fertility and Development* 2010)。最近、精子ならびに卵への分化能を維持したままニワトリ PGCs の増殖をサポートすることが可能になった (Whyte *et al.* *Stem Cell Report* 2016)。しかし、この培養法は増殖効率が低いことや、一部の産業有用品種にしか適応されないという課題が残されている。PGCs は採取可能な数と時期に限界があることや、胚の破壊を伴う。このため、特に、産卵数が少ない品種や希少・絶滅危惧品種への応用が困難である。

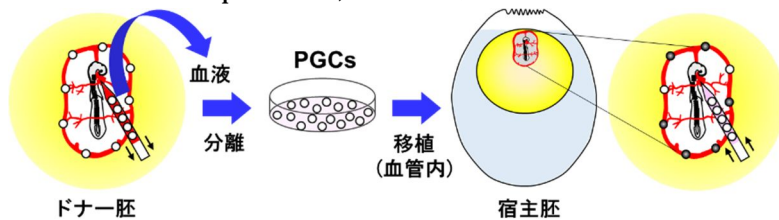


図1. ニワトリ PGCs の移植法

一方、精巣において大量の精子産生を支える精子幹細胞は、出生後のいかなる時期からも採取可能である。精巣を単一細胞に解離し、予め生殖細胞を除去した宿主精巣の精細管内へ移植することにより、ドナー精子幹細胞に由来する精子を産生させる技術がマウスにおいて開発された (Brinster and Zimmerman, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1994)。その後、この精細管内移植法と呼ばれる技術はニワトリにおいても成功例が報告された (Trefil *et al.* *Biology of Reproduction* 2006)。しかし、現状では、ニワトリの精子幹細胞の移植効率は~数%と非常に低く、実用レベルに達していない。また、ニワトリでは精子幹細胞に関する知見が乏しく、精子幹細胞の濃縮あるいは培養による移植効率の向上は見込めないという課題があった。

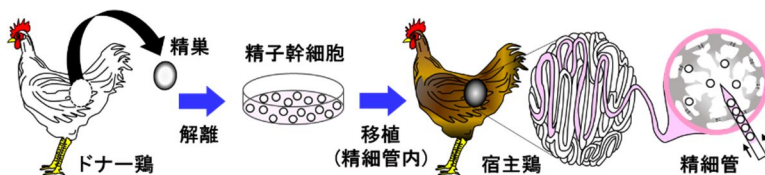


図2. ニワトリ精子幹細胞の移植法

2. 研究の目的

本研究の目的は、精子幹細胞の移植を用いたニワトリ発生工学の研究基盤を整備することである。この目的を達成するため、ニワトリにおいて効率的かつ効果的な生殖細胞の除去法を開発し、精子幹細胞の移植のための宿主として利用可能か検討する。続いて、精子幹細胞に関する研究インフラと知見が最も蓄積されているマウスをモデルに用いて、移植した精子幹細胞の振舞いを単一細胞レベルで解析することにより、精子幹細胞の移植効率を改善する方法論を構築するとともに、ニワトリへの応用を試みる。これらの研究を通して、現在著しく低いニワトリ精子幹細胞の移植効率を実用レベルに引き上げることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ニワトリにおける内在性生殖細胞の除去法の開発

精子幹細胞の移植には、薬剤の投与により予め生殖細胞を除去した個体あるいは生殖細胞形成不全を呈する突然変異体を宿主として用いる。そこで、アルキル化剤であるブスルファンを孵卵0~4日のニワトリ胚へ投与し、孵卵6日目あるいは成体から生殖巣をサンプリングした。生殖巣を免疫染色し、Vasa 陽性の生殖細胞数と胚の生存率を指標に評価した。

続いて、横班プリマスロックの精巣を単一細胞に解離し、ドナー細胞を調整した。ドナー細胞を、ブスルファンの投与によって予め生殖細胞を除去したニワトリ精巣の精細管内へ移植し、キメラニワトリの作出を試みた。

(2) マウスにおける移植した精子幹細胞の振舞いの解析

未分化型精原細胞を GFP で不可逆的に標識できる *GFRa1Cre^{ERT2}/CAG-CAT-EGFP* マウスあるいは *Ngn3-Cre^{ERTM}/CAG-CAT-EGFP* マウスに 4OH タモキシフェンを投与し、2 日後に精巣をサンプリング後、単一細胞に解離した。ドナー細胞 (1×10^6 cells) を、ブスルファンの投与によって予め生殖細胞を除去した宿主マウス精巣の精細管内へ移植した。2~180 日後に宿主精巣をサンプリング後、精細管全長をスライドガラスにマウントし、whole-mount 免疫染色を行った。GFP 陽性のクローン (単一の細胞に由来する子孫細胞) の数と、クローンを構成する細胞数を分化段階ごとに測定した。

(3) 精子幹細胞の移植効率を改善する方法論の構築とニワトリへの応用

全身で GFP を発現する *UBI-EGFP* マウスの精巣からドナー細胞を調整し、ブスルファンの投与によって予め生殖細胞を除去した宿主マウス精巣の精細管内へ移植した。宿主マウスには、精巣特異的に作用する可逆的なレチノイン酸合成阻害剤 WIN18,446 を移植-2~10 日目の期間連続投与した。移植 60 日後に精巣をサンプリングし、GFP 陽性のコロニーの数と長さを測定した。

続いて、性成熟したニワトリに WIN18,446 を連続投与し、精巣をサンプリングした。WIN18,446 がニワトリ精子形成へ及ぼす影響を、組織形態を指標に評価した。

4. 研究成果

(1) ニワトリにおける内在性生殖細胞の除去法の開発

ニワトリでは、マウスにおける *W/W^v* のように生殖細胞形成不全を呈する突然変異体が存在しない。このため、生殖細胞の効率的な除去法の開発に取り組んだ。先行研究では、ニワトリ精巣への γ 線照射によって生殖細胞が除去された (Trefil *et al.* *Biology of Reproduction* 2006)。しかし、 γ 線の照射には特別な施設が必要であるため、より簡便な生殖細胞の除去法が開発が望ましい。そこで、ブスルファン (100 μ g) が溶解した乳化液を調整し (Nakamura *et al.* *Reproduction, Fertility and Development* 2008)、孵卵 0~4 日のニワトリ胚の卵黄中へ注入した。孵卵 6 日目に生殖巣をサンプリングした結果、ブスルファンをいずれのタイミングで注入した場合においても、内在性生殖細胞がコントロールと比較して 95% 以上除去された (図 3)。しかし、ブスルファン投与胚の孵化率は約 30% であり、有意差は認められなかったものの、孵卵時間の経過に伴い高くなる傾向があった。また、ブスルファン投与後成体になったニワトリ精巣の組織形態を解析した結果、精細管の大部分で生殖細胞が除去されたが、一部で生き残った生殖細胞に由来する精子形成が進行する精細管が見受けられた。このため、Cre/loxP システムと呼ばれる、loxP と呼ばれる DNA 配列に対して DNA 組換え酵素 Cre が働くことによって生じる、部位特異的組換え反応を利用した遺伝子組換え実験系を利用した生殖細胞形成不全ニワトリの作製に取り組んでいる。現在、ニワトリ培養 PGCs への遺伝子導入を進めている。

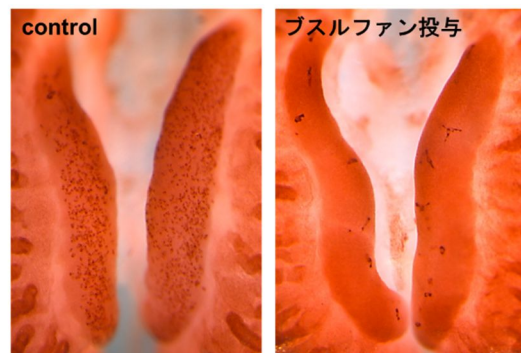


図3. ニワトリ生殖細胞の効率的な除去法

続いて、正常なニワトリ精巣より調整した細胞懸濁液を、ブスルファン投与によって予め生殖細胞を除去した宿主ニワトリ精巣へ移植した。しかし、ニワトリには、マウスのように明瞭な輸精管が観察されず、精細管内への定量的な細胞懸濁液の注入は困難を極めた。今後、ニワトリ精細管へ高精度で細胞懸濁液を注入する方法を検討する必要がある。本研究の実施期間中に、新型コロナウイルス感染症が広がったことに加え、代表者が所属する部局の改修工事があったため、動物実験はスローダウンを余儀なくされた。このため、本研究の期間を超えるが、細胞懸濁液が注入できたと思われる宿主ニワトリについては、後代検定と組織形態の解析によって、ドナー精子幹細胞に由来する精子形成の再構築と造精機能を評価する予定である。なお、ブスルファン投与したニワトリ胚に PGCs を移植した結果、ドナー PGCs に由来する精子のみを産生するキメラニワトリを作出することができた。このことから、ブスルファン投与によって生殖細胞を除去したニワトリの精巣は、精子形成の再構築を支持できることが示された。

(2) マウスにおける移植した精子幹細胞の振舞いの解析

精子幹細胞の活性は、移植後の精子形成の再構築によって検出される。しかし、精子幹細胞の移植後の振舞いはブラックボックスであった。本研究では、幹細胞活性を持つことで知られる未分化型精原細胞と呼ばれる細胞集団の運命を追跡するため、これらの細胞を不可逆的に GFP 標識して移植した。クローン解析の結果、多数の未分化型精原細胞が生着するが、その大部分が分化や細胞死によって消失することを発見した。また、生き残ったクローンは多様な運命を辿り、精子形成を再構築することが明らかとなった。移植した精子幹細胞の動態を定量的に理解するために、数理モデルを構築・検証した結果、幹細胞活性を持つ細胞、すなわち未分化型精原細胞のうちごく一部が確率的に精子形成を再構築するというシナリオが支持された。これは、予め運命が決まったごく少数の精子幹細胞が精子形成を再構築するという、これまでの考え方とは大きく異なる。

(3) 精子幹細胞の移植効率を改善する方法論の構築とニワトリへの応用

移植した精子幹細胞が確率的な運命選択をするのであれば、その運命を制御することで最終的な精子形成再構築の効率を改善することができるという仮説を立てた。マウスを含むほ乳類の未分化型精原細胞はレチノイン酸に反応して分化することが知られている (Gely-Pernot *et al.*, *Endocrinology* 2012)。そこで、宿主マウス精巣におけるレチノイン酸合成を WIN18,446 の連続投与によって一時的に阻害した。その結果、最終的な精子形成の再構築の効率がコントロールと比較して 5~10 倍向上した (図 4)。

続いて、WIN18,446 の連続投与によってニワトリ精子幹細胞の分化が抑制されるか組織形態を指標に検討した。その結果、コントロール同様に正常な精子形成が観察されたことから、WIN18,446 はニワトリではレチノイン酸の合成を阻害しない可能性が示唆された。前述のように新型コロナの流行と建物改修の影響で動物実験がスローダウンしたことから、本研究の期間を超えるが、ニワトリ精子幹細胞の分化を抑制できるアプローチの模索を継続する。最終的には、ニワトリにおいて移植した精子幹細胞の分化を抑制することで、最終的な精子形成再構築の効率が向上するか検討する予定である。

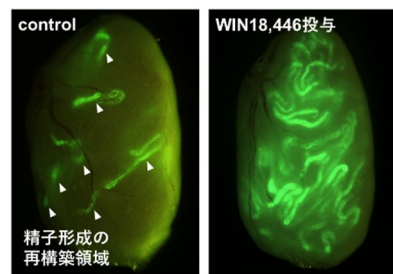


図4. レチノイン酸の操作による精子幹細胞の移植効率を向上させる方法

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Y, Jorg DJ, Kon Y, Simons BD, Yoshida S	4. 巻 28
2. 論文標題 Transient suppression of transplanted spermatogonial stem cell differentiation restores fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2021.03.016	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chihiro Koide, Natsuko Hamai, Effrosyni Fatira, Sigeru Nomura, Atsushi Takenouchi, Masaoki Tsudzuki, Yoshiaki Nakamura
2. 発表標題 Impact of KnockOut Serum Replacement in the culture of chicken primordial germ cells
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧井奈津子, 小出茅洋, 野村茂, 竹之内惇, 都築政起, 中村 隼明
2. 発表標題 ニワトリ始原生殖細胞の緩慢凍結に用いる凍結保護剤の比較選定
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村隼明
2. 発表標題 家禽類および齧歯類における生殖細胞の移植を用いたキメラ作製技法
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村隼明, 小出茅洋, 瀧井奈津子, 今弥生, 吉田松生
2. 発表標題 レチノイン酸合成阻害下におけるドナー精子幹細胞の振舞い
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村隼明, David J Jorg, Benjamin D Simons, 吉田松生
2. 発表標題 宿主精巣に移植した精子幹細胞はストカスティックな運命を辿る
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 瀧井奈津子, 小出茅洋, 都築政起, 中村隼明
2. 発表標題 ニワトリ始原生殖細胞に適した凍結保存液の開発
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
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
---------	---------