

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02283

研究課題名(和文) 異種ドナー生殖細胞の生着・分化をサポートする新たな生殖細胞移植技術の開発

研究課題名(英文) Identification of niche cells for supporting colonization, proliferation, and differentiation of xenogenic donor germ cells in recipient gonads.

研究代表者

竹内 裕 (Takeuchi, Yutaka)

金沢大学・生命理工学系・教授

研究者番号：70418680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：代理親魚技術は、ドナーとなる魚から生殖幹細胞を得て代理親魚(以降、宿主)に移植し、ドナー由来の配偶子を得る異種もしくは異個体間での生殖幹細胞移植である。本技術では、宿主の生殖幹細胞を除去する技術の開発が必須となる。造血幹細胞の移植研究では、宿主側の造血幹細胞を一時的に除去し、移植効率を高める技術としてX線照射が用いられていることに着目し、同様の方法で魚類(ゼブラフィッシュ、トラフグ)の生殖幹細胞を一時的に除去する技術を開発した。本研究では、成魚宿主の内在性生殖細胞を除去する新たな手段としてX線照射を用いたときの試験魚の生残率と生殖腺の組織学的観察、生殖腺指数、分子生物学手法で影響を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2000年代初頭に東京海洋大学(吉崎悟朗教授)で開発された魚類の生殖幹細胞移植技術は、有用品種や絶滅危惧種の繁殖補助技術として、世界中で広く研究開発されており、一部は水産養殖業において社会実装されている。様々な魚種で成功例が報告され知見が蓄積されているなかで、ドナー種に対してどのような宿主種を選べばよいかについては手探りの状態である。本研究では、魚類の生殖細胞移植においてドナー種に対する免疫拒絶反応の抑制と宿主の内在性生殖幹細胞を除去するためのX線照射技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：The surrogate broodstock technology is an interspecies or intraspecies germline stem cell transplantation in which germline stem cells are obtained from a donor fish and transplanted into a surrogate parent fish (recipient) to obtain gametes derived from the donor. In this technology, it is essential to develop a technique to remove germline stem cells from the host. Noting that X-ray irradiation is used in hematopoietic stem cell transplantation research as a technique to temporarily remove hematopoietic stem cells from the recipient to improve transplantation efficiency, we developed a technique to temporarily remove germline stem cells of fish (zebrafish and tiger pufferfish) in a similar manner. In this study, we evaluated the effects of using X-irradiation as a new means of removing endogenous germ cells from adult fish hosts by histological observation of survival and gonads of test fish, gonadal indices, and molecular biological techniques.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：生殖幹細胞 移植 精巣 卵巣

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

魚類の代理親魚技術(異種間生殖細胞移植)においては、特に、遺伝的距離が離れるにつれ、ドナー由来の精子は作れても卵は作れない、あるいは、ドナー生殖細胞は宿主生殖腺内に生着し増殖するものの、その後消失していく結果に終わる場合が多い。この課題を解決することが、代理親魚技術の適応範囲を大幅に広げ、魚類の育種や遺伝子資源保護の分野で利用されていくために必須である。本課題の前半では『ドナー生殖細胞を取り巻く宿主生殖腺内の微細環境の解明』、『宿主魚への X 線照射による空間および微細環境の整備』といった基礎的知見の集積を行い、遺伝的に離れた異種間での移植が成功/失敗する主要因の解明を目的とする。後半では、異種ドナー生殖細胞の配偶子形成開始をアシストする『ドナー生殖細胞とドナー種由来ニッチ細胞との共移植実験』を実施する。本研究では『成魚生殖腺内にドナー生殖細胞を直接移植する方法』を用いて移植実験を行う。

2. 研究の目的

代理親魚技術では、宿主の生殖幹細胞を除去する技術の開発が必須となる。造血幹細胞の移植研究では、造血幹細胞の移植効率を高める技術として X 線照射により宿主側の造血幹細胞を一時的に除去する技術が用いられていることに着目し、同様の方法で魚類(ゼブラフィッシュ、トラフグ)の生殖幹細胞を一時的に除去する技術を開発した。

3. 研究の方法

成魚宿主の内在性生殖細胞を除去する新たな手段として X 線照射を用いたときの試験魚の生存率と生殖腺の組織学的観察、生殖腺指数の測定からその影響を評価した。さらに、X 線照射の影響を評価するため、RT-PCR、電気泳動、定量的 PCR (qPCR) による解析を行った。X 線照射処理をした宿主への異種間生殖幹細胞移植では、新たな内在性生殖細胞除去技術を実際に生殖幹細胞移植の宿主調整に用い、移植から数日後のドナー細胞の宿主生殖腺内での動態を解析した。以上により、魚類の生殖幹細胞研究の発展に資する新たな知見が得られた。

【実験 1: 宿主魚への X 線照射による空間および微細環境の整備】

造血幹細胞の除去に用いる条件を基準として X 線照射を施した蛍光標識ゼブラフィッシュの生殖腺を解析し、生殖腺内から内在性生殖細胞が除去される条件を決定した。同種/異種(ティラピア)ドナー生殖細胞を移植後、蛍光観察によるドナー細胞の追跡を行うとともに、宿主が生産した配偶子のゲノム PCR および検定交配試験を行い、ドナー由来の機能的な配偶子が生産されたか否かを調べた。

【実験 2: X 線照射したクサフグ生殖腺内へのドナー(トラフグ)生殖細胞の移植・追跡・ドナー由来の配偶子生産の確認】

ドナー精原細胞の移植前処理として当歳の 3 倍体クサフグに X 線照射を行った後、内在性生殖細胞が除去されているかを組織学的に解析し、移植適期を決定した。トラフグ未成熟精巣を酵素処理により分散後、精原細胞を含む集団を蛍光標識し、3 倍体クサフグの卵巣・精巣内へ移植した。蛍光観察およびトラフグ生殖細胞に特異的なプライマーを用いた RT-PCR により移植後の生着率や配偶子形成開始率を比較した。免疫関連遺伝子(rag1 等)の発現解析により、X 線照射が宿主の細胞性免疫応答を抑制できているか、さらには、移植成功率の改善に寄与したか、配偶子の種判別 PCR、検定交配試験によりドナー由来の機能的な配偶子が生産されたかを解析した。

4. 研究成果

生殖腺内の各種細胞が蛍光標識された遺伝子組み換えゼブラフィッシュを用いて、『ドナー生殖細胞を取り巻く宿主生殖腺内の微細環境の解明』および野生型のゼブラフィッシュとクサフグを用いて『宿主魚への X 線照射による空間および微細環境の整備』といった基礎的知見の集積を行った。Notch シグナル活性化細胞が蛍光を発する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ系統では、卵巣内の濾胞細胞が蛍光を発することを明らかにした。精巣内の体細胞でも蛍光が確認されたがどのような細胞種が蛍光を発しているのかまでは特定できなかった。これらの蛍光細胞が生殖幹細胞ニッチと関係するのか否かを解析中である。同時に、卵原・卵母細胞および精原・精母細胞の一部の発生段階において本シグナル伝達経路が活性化され蛍光を発することが明らかとなった。ゼブラフィッシュおよびクサフグにエックス線を照射することで、一時的に生殖細胞の生存・増殖・分化に障害を与え、生殖腺を矮小化させることができるようになった。現在、これらの一時的な不妊化個体に対して、ドナー生殖細胞の移植実験を行っている。

代理親魚技術はクサフグ(Takifugu niphobles)とトラフグ(Takifugu rubripes)で確立され、三倍体クサフグに高水温飼育と抗がん剤ブスルファン投与を組み合わせる方法で、宿主の内在性生殖細胞を除去してきた。本研究では、後天的に宿主の内在性生殖細胞を除去する新たな方法として X 線照射を検討した。これまでに、当研究室ではオスのゼブラフィッシュ Danio rerio に X 線を照射し高水温飼育と組み合わせることで、GSI は減少し、種々の生殖細胞関連遺伝子と免疫系に関する遺伝子の発現量が減少するという結果が得られている。さらに、上記の処理を行った宿主ゼブラフィッシュに別個体のドナー生殖細胞を移植した結果、移植された宿主の精液の

ゲノム DNA からドナー由来の遺伝子が検出された。そこで、本研究では、成魚の内在性生殖細胞除去法の開発として、試験魚にクサフグを用いて X 線照射処理による宿主調整と異種間生殖幹細胞移植実験を試みた。まず、X 線を用いた宿主調整法が内在性生殖細胞に及ぼす影響を明らかにするため、クサフグ 0 歳魚および 1 歳魚に X 線を照射し、生殖腺を解析した。実験には、(1) コントロール区、(2) X 線 1 回照射区、(3) X 線 2 回照射区の 3 つの試験区を設けた。X 線照射は卓上型 X 線照射装置を用いて、19 Gy の X 線を 1 回または 2 回照射した。その結果、処理 2 週間後において 0 歳魚の GSI は X 線照射区で減少し、コントロール区と有意な差があった。また外部形態の観察から、X 線照射区の生殖腺は矮小化していた。1 歳魚では、GSI に有意な差は見られなかったものの、生殖細胞関連遺伝子である *vasa*、*dnd* の発現量がコントロール区と比較して X 線照射区で減少している傾向があった。また組織学的観察から、精巣では X 線照射区の生殖細胞がシスト外側の基底膜から解離し中央に凝集した様子が確認された。これらのことから、X 線照射処理を行うと生殖腺が小さくなり、これは生殖細胞とそれを支持する体細胞が減少したためであると示唆された。次に、宿主調整法が生殖細胞移植に利用可能であるかを確かめるため、X 線照射処理をしたクサフグ 0 歳魚に、ドナートラフグ精巣より得た細胞を移植した。精巣分散により得た細胞の細胞膜を PKH26 で蛍光標識し、クサフグの腹部を切開し露出した生殖腺へドナー細胞を移植した。結果、クサフグから配偶子を得る前に斃死したため、ゲノム DNA を用いた遺伝子解析までには至らなかったが、斃死した個体の生殖腺からは移植されたドナー細胞が確認された。以上の研究により、クサフグを用いて宿主の内在性生殖細胞除去法の開発として X 線照射の内在性生殖細胞に与える影響の評価と、それを用いた異種間の細胞移植実験を行った。その結果、X 線照射処理区ではコントロール区と比較して生殖細胞が減少していることが示唆された。しかし、内在性生殖細胞の完全な除去には至らなかったため、照射量とその回数を最適化していく必要があると考えられる。また移植実験では、宿主の生殖腺内で移植されたドナー細胞が確認されたが、ドナー細胞が生着・分化する様子まで追うことができなかったため、より長期的に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yukino Wada, Hikaru Tsukatani, Chihiro Kuroda, Yurika Miyazaki, Miku Otoshi, Isao Kobayashi.	4. 巻 149
2. 論文標題 Jagged 2b induces intercellular signaling within somites to establish hematopoietic stem cell fate in zebrafish.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev200339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200339	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 Katsuhiko Konno, Jingjing Kobayashi-Sun, Fumio Arai, Isao Kobayashi, Daisuke Sugiyama.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Hematopoietic Cell Isolation by Antibody-Free Flow Cytometry in the Zebrafish Embryo.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Reoto Tani, Ryosuke Yazawa, Shigeharu Kamio, Wataru Kawamura, Tetsuro Morita, Yutaka Takeuchi, Goro Yoshizaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Establishment of surrogate broodstock technology in Scombridae species by germ cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 2760-2771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/are.15791	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 Tetsuro Morita, Misako Miwa, Naoki Kumakura, Kagayaki Morishima, Takahisa Miki, Yutaka Takeuchi, Goro Yoshizaki	4. 巻 100
2. 論文標題 Production of functional sperm from cryopreserved testicular germ cells following intraperitoneal transplantation into allogeneic surrogate in yellowtail (Seriola quinqueradiata)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 32-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cryobiol.2021.04.001	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内裕、松井一将、西村周馬、小林功
2. 発表標題 魚類生殖幹細胞の宿主調整を目的としたX線照射による内在性生殖細胞除去技術の開発
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年～2023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
研究分担者	小林 功 (Kobayashi Isao) (30774757)	金沢大学・生命理工学系・准教授 (13301)	
研究分担者	山田 敏之 (Yamada Toshiyuki) (40443345)	長崎県総合水産試験場・種苗量産技術開発センター・科長 (87304)	
研究分担者	濱崎 将臣 (Hamasaki Masaomi) (50506160)	長崎県総合水産試験場・種苗量産技術開発センター・主任研究員 (87304)	

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
---------	---------