

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23651248

研究課題名(和文)生殖幹細胞、iPS細胞樹立による固有魚類の保全

研究課題名(英文)Preservation of endemic fish using germ stem and iPS cells

研究代表者

高田 達之(takada, tatsuyuki)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90206756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖固有魚種の生存数は近年激減し、絶滅が危惧されている。本研究は、幹細胞生物学を用いて、個体作成が可能な細胞として固有種を保存する方法の確立を目的とした。まず琵琶湖固有種(ホンモロコ)の精巣、卵巣、受精卵由来細胞の培養、細胞株樹立方法を確立した。同時に、樹立細胞を用いて、内分泌かく乱物質・ノニルフェノールがホンモロコ精巣において雄性ホルモンを抑制することを初めて明らかにすると共に、様々な分化段階の生殖細胞の定量解析方法を開発した。さらに精原細胞をin vitro培養し、受精能を有する精子を形成することに成功し、精原細胞の凍結保存の併用による固有種遺伝資源の新たな保存方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Many endemic fish species inhabit in Lake Biwa. The number of such species, however, is rapidly decreasing in recent decades. We tried to apply stem cell biology for preservation of endemic fish. We succeeded to develop culture method and establish a total of 19 types of cell line from testis, ovary and fertilized embryo in endemic fish Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). These cell line were useful to validate hormone response and endocrine disrupting chemicals, and we found that nonylphenol inhibited androgenic effect in *G. caerulescens*. We also developed a method to analyze somatic and germ cells of various developmental stages quantitatively using flow cytometry. Furthermore, we succeeded to differentiate fertilization competent sperm from cryopreserved spermatogonia in vitro. Although generation of iPS cells requires further study, we established a new strategy for preservation of endemic fish combining in vitro formation of gametes and cryopreservation of germ stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：精原細胞 in vitro 精子分化 生殖細胞 細胞株樹立 ホンモロコ 固有種保全 環境ホルモン 琵琶湖

1. 研究開始当初の背景

近年、琵琶湖において固有種の生息数が激減し、それらの絶滅が危惧されている。生物種の保存手段として、配偶子の凍結保存が一般的であるが、魚類においては、実用化されていない。その理由として魚類の卵子、受精卵はサイズが大きく多くの脂質等を含むため凍結保存が困難であること、また精子に関しては、必要量が多い一方で、その運動時間が短い(サケの場合 30 秒) 実用面における優位性が少ないこと等が挙げられる。

幹細胞研究に関しては、メダカ等で ES 細胞樹立の報告があるが(1,2)、生殖細胞への分化が認められないことから、積極的に利用されているとは言い難い状況である。この理由として、魚類における生殖細胞の運命決定は前成機構により、生殖質が関与すると考えられていることが挙げられる。

また、マウスでは、生殖細胞株の樹立が報告されているが(3)、魚類の報告はない。魚類では精原細胞を異種の代理魚に移植して生ませる方法も開発されているため(4)、固有種において生殖幹細胞の保存、生殖細胞株の樹立が達成できれば貴重な生物資源の積極的保存が可能となると考えられる。

1. Wakamatsu, Y. et al. Mol.Mar.Biol. Biotech.3,185,1994, 2. Hong, Y. et al. Mech.Dev.60,33,1996, 3.Kanatsu-Shihara, M. et al. Cell,119,1001,2004, 4. Okutsu, T. et al.Science,317,151,2007

2. 研究の目的

島国である日本には、多くの固有種が生息している。なかでも琵琶湖は世界で 3 番目に古い古代湖とされ、約 17 種類の固有魚類が確認されている。近年、琵琶湖では人為的環境変化に加え、外来魚の爆発的な増加により、固有種の生存数が激減し、絶滅が危惧されている。しかしながらその解決方法として、外来種の駆除、固有種の放流以外、有効な手段がとられていないのが現状である。そこで本研究は近年著しい発展を遂げている幹細胞生物学および iPS 細胞作成技術を琵琶湖固有魚類に適用し、将来、個体の復元が可能な幹細胞を利用して琵琶湖固有種を保存することを目的とした。

具体的には固有種の細胞レベルでの保存を目指し、生殖幹細胞の保存と生殖細胞株の樹立に挑戦する。

固有魚類の細胞培養、細胞株の樹立はこれまでほとんど行われていないため細胞培養条件は全く分かっていない。そこでまず固有種としてホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) の精巣を使用し、生殖細胞の維持、分化に必要なセルトリ細胞の培養条件を確立する。次に樹立したセルトリ細胞を支持細胞として精原細胞の培養及びその細胞株の樹立を行う。同時にマウス iPS 細胞作成に使用された 4 遺伝子の導入により、固有魚種において体細胞の iPS 化を試みる。

生殖幹細胞の保存が可能となっても、その

配偶子への分化ができなければ個体作製が不可能である。そこで本研究では精原細胞の *in vitro* 分化を試み *in vitro* で受精可能な精子の作製に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) 精巣由来細胞株 (セルトリ細胞) の樹立
ホンモロコと同じコイ科に属するゼブラフィッシュのセルトリ細胞株の樹立、培養条件を参考にして、ホンモロコの精巣由来細胞株の樹立を試みる。また、樹立した細胞株の遺伝子発現を解析し、その由来がセルトリ細胞であることを確認する。

(2) 繁殖期、非繁殖期における琵琶湖固有種ホンモロコの精巣由来細胞株、及び卵巣由来細胞株の樹立

ホンモロコは明確な季節繁殖性を示すことから、時期により特定の分化段階の生殖細胞の支持に適した、体細胞が存在すると推定される。そこで、セルトリ細胞株の樹立条件を用いて繁殖期から非繁殖期にかけて継続的にホンモロコの精巣由来細胞株 (セルトリ細胞) 及び卵巣由来細胞株の樹立を行い、遺伝子発現解析、抗体染色により、それらの違いを調べる。

(3) 受精卵由来細胞株の樹立と解析

未分化細胞株の樹立は固有種保存においてキメラ作製、核移植による個体作製などにおいて重要なツールとなる。そこで受精卵を用いて分化が進行していない初期胚由来細胞および細胞株の樹立を行う。

(4) 樹立細胞を利用した固有種ホルモンの応答の解析

(1)、(2) で樹立した固有種由来細胞株を利用し、固有種ホルモンの応答、および現在問題となっている環境ホルモンが固有種に与える影響を明らかにすると共にそのメカニズム解析を試みる。

(5) ホンモロコ iPS 細胞の樹立

エピソーマルベクターを使用し、*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* を導入し、固有魚種、ホンモロコの細胞で iPS 細胞の樹立を試みる。

(6) セルトリ細胞株樹立条件下における精原細胞の維持増殖条件の検討

樹立したセルトリ細胞株をフィーダーとして、精巣細胞の培養条件を検討すると同時に培養液にマウス生殖幹細胞 (GS) の増殖に必要な因子 GDNF, LIF 等を添加し、精原細胞の増殖を観察し、精原細胞樹立条件の検討を行う。

(7) ホンモロコ生殖細胞、精原細胞の定量解析系の開発

生殖幹細胞の培養、幹細胞株樹立において生殖細胞の定量解析方法は必要不可欠であ

る。そこで、生殖細胞マーカーの抗体染色とフローサイトメーターを用いた生殖細胞の定量解析系を確立する。

(8)ホンモロコにおける精子の *in vitro* 分化系の確立

保存した細胞から配偶子を形成するため、非繁殖期の精巣細胞の *in vitro* 培養により、精原細胞から受精能を有する精子を形成する *in vitro* 分化系を確立する。

4. 研究成果

(1) 酵素処理により分散した精巣細胞は、培養初期は順調に増殖するが、継代が進むと急激に増殖が落ち、増殖しなくなるという現象が明らかになった。そこで様々な増殖因子を添加し、ホンモロコ細胞の増殖可能な培養条件を見いだした。この方法で培養することにより、ホンモロコから精巣由来の細胞株樹立に成功した。また、樹立した細胞株の遺伝子発現を調べたところ *Sox9a*, *WT1* 等の精巣特異的遺伝子の発現が認められた一方で *Vasa*, *Ziwi* 等の生殖細胞特異的遺伝子の発現は認められなかったことから、目的としたホンモロコのセルトリ細胞株が樹立できたことが示された。

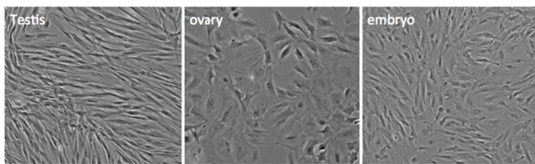


図1. 樹立細胞株

(2) 様々な季節において精巣、卵巣から細胞株の樹立に成功した。伝子発現解析の結果、精巣由来細胞はセルトリ細胞(*Sox9a*)、また卵巣由来細胞は、夾膜細胞(*WT1a*)由来と推定された。それら細胞株は樹立時期により、形態が類似したもの、異なるもの等様々であった。また遺伝子発現を比較すると、セルトリ細胞株では *Cyp19a*, *Foxl2*, *Dmrt1* を発現している株としていない株が認められた。さらにこれらの細胞株がエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイド受容体を発現していることを見いだした。

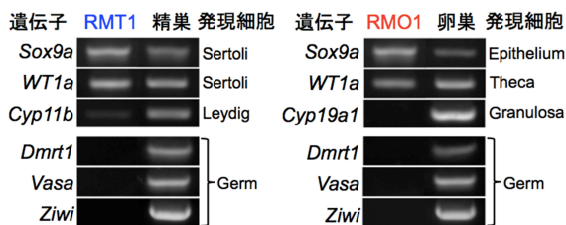


図2. 樹立細胞の遺伝子発現

(3) ホンモロコの受精卵由来細胞株の解析を行ったところ、受精卵で高い発現を示す

Oct4, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4* は発現していないが正常な染色体数、核型を示すことが明らかとなり、将来、核移植、iPS 細胞作製への利用に関して有用性が示唆された。

また、本研究により精巣由来細胞 10 株、卵巣由来細胞 5 株、稚魚精巣由来細胞 1 株、受精卵由来細胞 3 株の計 19 株の樹立に成功した。

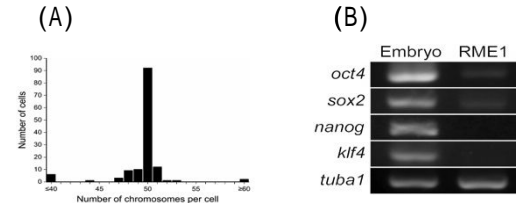


図3. 受精卵由来細胞株の染色体数(A)と遺伝子発現(B)

(4) 精巣由来の細胞株がエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイド受容体を発現していることからホンモロコのホルモン応答および環境水中のホルモン様物質がホンモロコのセルトリ細胞、夾膜細胞に与える影響を直接検出可能なテラーメードバイオセンサーとして利用可能であると考えられた。そこで精巣由来細胞株に MMTV/pGL4.36 ベクターを導入し、内在性の核内レセプターを用いたアンドロゲン、プロゲステロン検出系を構築した。その結果、細胞株は魚類特有のアンドロゲン、11KT およびプロゲステロン、DHP に特異的、濃度依存的に反応するという結果が得られた。本細胞株を使用することにより、アンタゴニスト及びその作用が検出可能であり、内分泌攪乱作用を持つとされるノニルフェノールが、琵琶湖固有種ホンモロコのセルトリ細胞に対して抗アンドロゲン作用を持つこと、またビスフェノール A がアンドロゲン様作用を有することを見いだした。すなわち本研究で樹立した細胞株が固有種特有のホルモン応答、内分泌攪乱作用を検出するテラーメードバイオセンサーとして有用であることが示された。

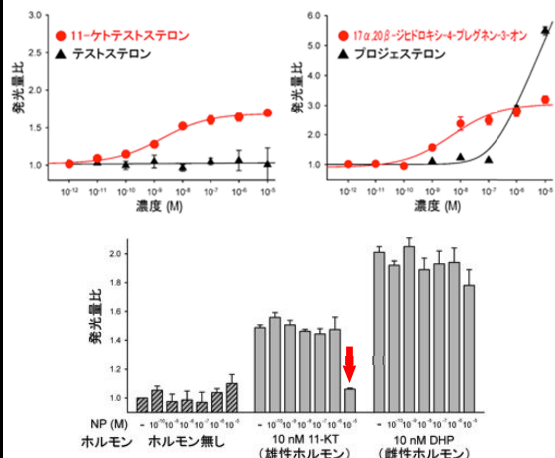


図4. 内在性および環境ホルモンの影響

(5) ホンモロコおよびゼブラフィッシュの受精卵由来初代培養細胞を用いて、ヒト由来 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* 遺伝子をエレクトロポレーションにより導入した。ホンモロコ受精卵由来細胞からは、iPS 細胞様のコロニー形成は確認されなかったが、ゼブラフィッシュ細胞において、弱いアルカリフォスファターゼ活性、Vasa を発現するコロニー形成が認められた。しかし、*Oct4*, *Nanog* 等多能性マーカーの発現は認められず、これらは iPS 細胞とは異なる細胞と考えられた。

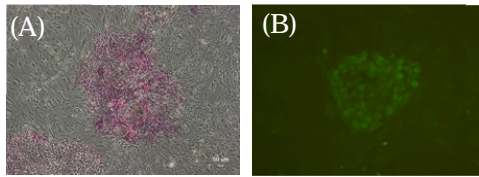


図5. ゼブラフィッシュ由来細胞におけるアルカリフォスファターゼ染色 (A) と VASA 発現 (B)

(6) 精原細胞樹立条件の検討を行ったが、体細胞の増殖が早く、生殖細胞培養には体細胞の混入を最小限にすることが重要であることが明らかになった。一方で精原細胞は常に体細胞の上に接着して存在したことからその培養にはフィーダーとしての体細胞が必要であることも明らかになった。また、樹立したセルトリ細胞株をフィーダーとして、精原細胞の培養条件を検討し、セルトリ細胞の上に接着してコロニーを形成する Vasa 陽性の精原細胞を約1ヶ月維持することができた。しかしその数は徐々に減少し、生殖細胞株の樹立には至らなかった。

(7) 精原細胞培養、および精子分化培養において、核 DNA の PI 染色と Vasa 抗体染色を併用し、フローサイトメトリーにより、体細胞と生殖細胞、精原細胞、精母細胞、精子を区別して定量出来る分析系を確立した。

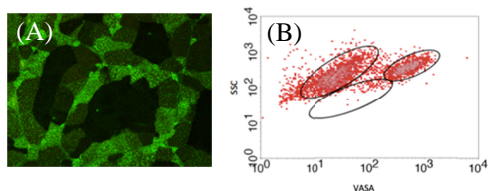


図6. 精巣切片の VASA 染色 (A) と精巣細胞のフローサイトメトリーによる解析 (B)

(8) 非繁殖期の精巣から *in vitro* による精子分化実験を行い、尾と運動能を有した精子を分化させることに成功した。BrdU の取り込み実験により、これらの精子が精原細胞から分化したものであることが示された。またフローサイトメトリー解析により、1倍体の

ピークが認められたことから、ホンモロコにおいて、*in vitro* で減数分裂が正常に進行する精子分化系が確立できたと考えられた。

さらに、精原細胞のみが存在する稚魚精巣を用いた場合も *in vitro* で精子形成が可能であることが明らかとなった。

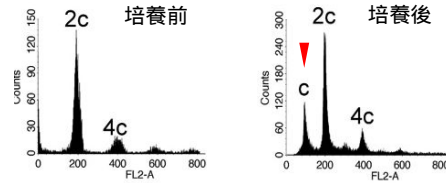


図7. 稚魚精巣細胞のフローサイトメトリーによる解析

生物の保全においては、配偶子等細胞の凍結保存法の開発が必要となる。そこで、精原細胞の凍結保存を試み、ガラス化冷却法が精原細胞の保存に有効であることを明らかにした。また、精原細胞培養、および *in vitro* 精子分化に関して、培養条件の最適化を試み、体細胞の増殖を抑制する事により、効率良く精子分化が進行し、天然の精子を用いた時とほぼ同等の受精率を得る条件を見いだす事ができた。

さらに人工授精実験を行い、これらの *in vitro* 分化により得られた精子が実際に受精能を有し、正常な個体が得られることが示された。

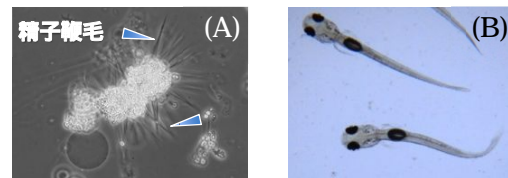


図8. *in vitro* 分化で形成された精子 (A) と *in vitro* 分化精子由来の孵化仔魚 (B)

同時に未受精卵の入手が容易な他魚種を使用した受精能の検証方法の開発にも成功した。また、(7) で開発した生殖細胞定量系により *in vitro* 精子分化過程が、定量的にモニターでき、その動態が明らかとなった。

以上本研究により、琵琶湖固有種において、精原細胞の凍結保存と *in vitro* 精子分化系を組み合わせ、受精能を有する精子を作製する新規の保存方法を確立する事ができた。この方法は従来の精子保存の代替法となるのみならず、季節繁殖性の野生固有種における雄性生殖資源の保存方法として有用であると考えられる。

一方、固有魚類の生殖幹細胞、iPS 細胞の樹立に関しては、さらなる検討が必要と考えられた。

(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4件)

Higaki S., Shimada M., Koyama Y., Fujioka Y., Sakai N., and Takada T. Development and characterization of an embryonic cell line from endangered endemic cyprinid Honmoroko *Gnathopogon caerulescens* (Sauvage, 1883). 査読有, In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal, in press (2015)
DOI 10.1007/s11626-015-9894-y

Higaki S., Kawakami Y., Eto Y., Yamaha E., Nagano M., Katagiri S., Takada T., and Takahashi Y. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. 査読有, Cryobiology 67, (2013) 374-382
DOI 10.1016/j.cryobiol.2013.10.006

Higaki S., Koyama Y., Shimada M., Ono Y., Tooyama I., Fujioka Y., Sakai N., Ikeuchi T., and Takada T. Response to fish specific reproductive hormones and endocrine disrupting chemicals of a Sertoli cell line expressing endogenous receptors from an endemic cyprinid *Gnathopogon caerulescens*. 査読有, Gen. Comp. Endocrinol. 191, (2013) 65-73
DOI 10.1016/j.ygcen.2013.06.002

Higaki S., Koyama Y., Shirai E., Yokota T., Fujioka Y., Sakai N., and Takada T. Establishment of testicular and ovarian cell lines from Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). 査読有, Fish Physiol. Biochem. 39, (2013) 701-711
DOI 10.1007/s10695-012-9733-y

[学会発表](計13件)

檜垣彰吾、藤東貴昭、手島黎子、小野友梨子、藤岡康弘、酒井則良、高田達之 琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) における精巢組織の周年変化: 平成27年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 東京都(港区), 2015年3月30日

檜垣彰吾、藤東貴昭、手島黎子、島田愛美、小野友梨子、高田達之: フローサイトメトリーによる琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 精巢細胞の解析: 琵琶湖 研究センター研究発表会, 大津市ふれあいプラザ4階ホール, 滋賀県(大津市), 2015年1月18日

Takada T., Shimozawa N., Ono Y., Shirai E., Higaki S., Suemori H., Narita K., Takeda S., Ohta Y. Labeling of motile multiple-Flagellated cells Differentiated from non-human primate ES and iPS cells
The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience
iPS cells for Regenerative medicine
CiRA International Symposium
武田薬品研修所, 大阪府(吹田市), Jan. 15 2015

小野友梨子、檜垣彰吾、藤東貴昭、手島黎子、酒井則良、高田達之: 魚類 *in vitro* 分化系を用いたノニルフェノールの影響解析: 第17回日本内分泌攪乱化学物質学会, 東京大学, 東京都(文京区), 2014年12月10日

手島黎子、檜垣彰吾、島田愛美、川本和明、藤岡康弘、酒井則良、高田達之: 琵琶湖固有種ホンモロコの *in vitro* 精子生産: 立命館大学琵琶湖 研究センター第5回シンポジウム, 立命館大学, 滋賀県(草津市), 2014年9月24日

檜垣彰吾、島田愛美、川本和明、藤岡康弘、酒井則良、高田達之: 琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) における *in vitro* 精子分化培養法の開発: 平成26年度日本水産学会秋季大会, 九州大学, 福岡県(福岡市), 2014年9月21日

高田 達之
琵琶湖固有種における分子細胞生物学研究とその保存への応用
琵琶湖 研究センター・セミナー,
立命館大学, 滋賀(草津市), 2014(6/26)

檜垣彰吾、小山芳江、島田愛美、小野友梨子、藤岡康弘、酒井則良、池内俊貴、高田達之
ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 由来 Sertoli 細胞株を用いた内分泌攪乱物質検出系の開発
第16回環境ホルモン学会研究発表会, 東京大学, 東京都(文京区), 2013(12/13)

島田愛美、檜垣彰吾、藤岡康弘、酒井則良、高田達之

ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)
精子の *in vitro* 分化培養系の確立
第 106 回日本繁殖生物学会, 東京農工大
学, 東京都 (府中市) 2013(9/13)

檜垣彰吾、小山芳江、島田愛美、小野友梨
子、遠山育夫、藤岡康広、酒井則良、池内
俊貴、高田達之
ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)
由来 Sertoli 細胞株を用いたホルモン作
用解析系の開発 第 106 回日本繁殖生物学
会, 東京農工大学, 東京都 (府中市)
2013(9/13)

檜垣彰吾、島田愛美、小野友梨子、藤岡
康弘、酒井則良、高田達之
ガラス化低温保存したホンモロコ
(*Gnathopogon caerulescens*) 精巣細胞
からの *in vitro* における精子生産
第 19 回日本野生動物医学会, 京都大学, 京
都府 (京都市), 2013(8/30)

高田達之
ビスフェノール A が ES 細胞の生殖細胞分化
に与える影響、日本薬学会、環境・衛生部
会、フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシ
コロジー「生命プログラムの最適化と健康寿
命」、フォーラム IV、幹細胞-化学物質間作用
による生命プログラムの制御、オーガナイザ
ー、名古屋観光ホテル、愛知県 (名古屋市)
2012(10/26)

島田愛美、檜垣彰吾、藤岡康弘、酒井則
良、高田達之
ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)
雄性生殖細胞の培養と *in vitro* 精子形
成, 第 105 回日本繁殖生物学会, 筑波大学,
茨城県 (つくば市) 2012(9/8)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)

名称: タモロコ属魚類精子の受精能の評価
方法
発明者: 高田達之、檜垣彰吾、島田愛美、
酒井則良
権利者: 学校法人立命館、大学共同利用機関
法人情報・システム研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2014-20931
出願年月日: 2014 年 2 月 6 日
国内外の別: 国内

名称: モロコ細胞株、その製造方法及び
用途
発明者: 高田達之、小山芳江、酒井則良
権利者: 学校法人立命館、大学共同利用機関
法人情報・システム研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2011-129549

出願年月日: 2011 年 6 月 9 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ
<http://www.collabo.sk.ritsumeai.ac.jp/lab/boratory/takada.htm>
<http://www.ritsumeai.ac.jp/research/r-gi-ro/projects/environment/biosensor.html/>
<http://www.ritsumeai.ac.jp/pharmacy/takada/top.html>

報道関連情報
中日新聞
2013 年 9 月 10 日
環境ホルモン影響 細胞レベルで解析

京都新聞
2013 年 9 月 10 日
光る細胞株影響一目 流入河川調査に活
用 ホンモロコ環境作用

NHK
「おうみ発 610」
2013 年 9 月 3 日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 高田 達之
(TAKADA TATSUYUKI)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号: 90206756
- (2) 連携研究者
酒井 則良 (SAKAI NORIYOSHI)
国立遺伝学研究所・系統生物研究センタ
ー・准教授
研究者番号: 50202081
- 井上 寛一 (INOUE HIROKAZU)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30176440