

信州大学審査学位論文

ニワトリ始原生殖細胞培養系の
改良に関する研究

2016年3月

宮原 大地

目 次

第1章 論文の要約	1
第2章 序論	4
第3章 ニワトリ始原生殖細胞における 増殖因子の探索と長期培養系への活用	
3-1 実験の背景および目的	14
3-2 材料および方法	17
3-3 結果	22
3-4 考察	26
3-5 表	31
3-6 図	34

第4章 ニワトリ始原生殖細胞の増殖に及ぼす 幹細胞因子の影響

4-1 実験の背景および目的	42
4-2 材料および方法	46
4-3 結果	52
4-4 考察	55
4-5 表	59
4-6 図	62
第5章 総合考察	71
第6章 謝辞	80
第7章 引用文献	82

第1章

論文の要約

始原生殖細胞 (PGCs) は生殖細胞の基幹となる細胞として知られ、配偶子形成および受精を通じて次世代へと遺伝情報を伝達することができる。ニワトリでは、配偶子への直接的な遺伝子操作および凍結保存が極めて困難とされており、遺伝子改変ニワトリの作出や家禽遺伝資源の凍結保存などの大きな障壁となっている。このため、PGCs を用いた生殖系列キメラニワトリの作出技術が開発され、現在では PGCs を標的とした遺伝子改変や遺伝資源の保存等が取り組まれている。しかしながら、1つの胚に存在する PGCs 数は多いものでも 100 個程度と非常に僅少であることや、PGCs の採取技術も非常に煩雑であることなどから、PGCs の利用性の低さがしばしば問題とされてきた。以上の問題点を解決するため、ニワトリ PGCs を *in vitro* において大量培養するための技術開発が行なわれてきたが、一連の培養法は増殖効率が低いことや実験的な再現性を欠くなどの問題点が多く、未だ安定的な培養技術とは成りえていない。本研究では、今もって黎明期にあるニワトリ PGCs の培養技術の汎用性を高めることを目的として、PGCs における培養系の最適化および新規な増殖因子の探索とその機能解析を行なった。

1) ニワトリ始原生殖細胞における増殖因子の探索と長期培養系への活用

ニワトリ PGCs の培養には各種のフィーダー細胞や増殖因子等が使用されているが、それらの増殖効率の検証および培養細胞の特徴解析などは詳細に行なわれてこなかった。ここでは、PGCs の増殖効果が最も高くなるようなフィーダー細胞・増殖因子の組み合わせについて検証し、雄胚に由来する培養 PGCs を対象としてニワトリ PGCs を培養するために好適な条件を決定することを目的とした。まず、PGCs の増殖に最適なフィーダー細胞を検証するため、バッファローラット肝臓 (BRL) 細胞・マウス胚性線維芽細胞株である STO 細胞・ニワトリ胚性線維芽細胞 (CEF) をフィーダー細胞として PGCs の増殖に及ぼす影響を調べたところ、BRL 細胞をフィーダー細胞として使用した場合にニワトリ PGCs の増殖効率が高くなること

が明らかとなった。続いて、PGCs の培養液に添加する増殖因子について検討した結果、線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2) が含まれる培養液を使用した場合に PGCs の増殖率が最も高くなることが明らかとなった。すなわち、ニワトリ PGCs を *in vitro* において最も効率的に増殖させる条件は、BRL 細胞をフィーダーとして使用し、FGF2 を添加した培養液で培養することであった。この条件で培養された PGCs は、生殖細胞特異的タンパク質であるニワトリ Vasa ホモログ (CVH) およびステージ特異的胚性抗原 1 (SSEA-1) を共発現し、さらに未分化型マーカー遺伝子である *Nanog* および *PouV* を強く発現した未分化型生殖細胞としての特徴を長期間に渡って維持していた。さらに、これらの培養 PGCs は生殖巣へと移動し、培養 200 日以上が経過しても受精可能な配偶子へと分化する能力を維持していた。

2) ニワトリ始原生殖細胞の増殖に及ぼす幹細胞因子の影響

前項では、ニワトリ PGCs の増殖に FGF2 が有効であることを示した。しかしながら、現時点においてニワトリ PGCs の増殖因子としては FGF2 以外には明らかになっておらず、PGCs の増殖に関与する因子の大部分が不明なままである。ニワトリ PGCs の増殖に関与する増殖因子をより多く明らかにすることは、ニワトリ PGCs 培養系のさらなる改良や最適化を行なうために必須である。このため、FGF2 以外の増殖因子の候補を探索したところ、幹細胞因子 (SCF) を同定した。SCF は分泌型と膜結合型の 2 種類のアイソフォームが存在し、哺乳類ではいずれのアイソフォームも PGCs の増殖および生存に必須の因子として知られている。しかしながら、ニワトリ PGCs における増殖効果は未だ明らかにされていない。ここでは、分泌型および膜結合型ニワトリ SCF (chSCF1/chSCF2) を安定発現する BRL フィーダー細胞を樹立し、PGCs に与える増殖効果を検証した。その結果、chSCF2-BRL 細胞をフィーダー細胞として利用した場合に、前項で開発された培養系に比べて PGCs の増殖効率を 5 倍以上改善できることが明らかとなった (chSCF1-BRL 細胞は 2.0-2.5 倍程度)。最も増殖効率が高かった chSCF2-BRL フィーダー細胞上で増殖した PGCs において、chSCF の主要な下流シグナル分子と推定される Akt のリン酸化状態を Western Blotting および免疫染色によって調べたところ、chSCF2-BRL フ

オーダー細胞上で増殖した PGCs の方が通常の培養条件下で増殖した PGCs に比べて Akt のリン酸化状態が亢進していることが分かった。また、この増殖効果は PI3K/Akt シグナルの阻害剤である LY294002 によって抑制されたことから、chSCF2 はニワトリ PGCs において PI3K/Akt シグナルの活性化を介することによって PGCs の増殖を制御することが示唆された。さらに、chSCF2-BRL 細胞と共に培養された PGCs は、宿主胚へと移植した場合に受精可能な配偶子へと分化できることも明らかとなった。一方で、FGF2 を培養液から取り除くと、chSCF1 および chSCF2 とともに PGCs の増殖を支持しなかった。このことは、FGF2 と chSCFs が PGCs の増殖における Co-factor であることを示唆している。また、chSCF2 はウズラ・トキ・アヒルなどを始めとしたその他の鳥類とのアミノ酸相同性が極めて高く、ニワトリ以外の鳥類から得られた PGCs の培養にも有効と考えられる。

第2章 序論

2-1 哺乳類および鳥類における生殖工学技術

生殖細胞は、受精を介して次世代へと遺伝情報を伝達する役割を担う細胞であり、生体を構成する体細胞とは独立した発生分化系譜をもつ非常にユニークな細胞として知られている。動物における生殖細胞の発生分化系譜は、生殖細胞の形成・生殖巣予定領域への移動および増殖・精巣や卵巣における配偶子形成からなる非常に多段階かつ複雑なものであり、それらを制御する分子メカニズムの大部分は未だに多くの謎に包まれている。

生殖細胞の中でも配偶子は、遺伝情報の伝達の中核を担う高度に特殊化された細胞である。哺乳類では、精子や受精卵を凍結保存する技術の確立によって人工授精や受精卵移植等に代表される「生殖工学技術」が発達し、それらは動物遺伝資源の保全および復元、家畜の改良速度の向上などに絶大な恩恵をもたらしてきた。また、配偶子や胚に遺伝子操作を施すことで遺伝子改変動物の作出が可能となっており、基礎医学や一部の産業などにおける重要な技術革新をもたらしている。加えて、胚性幹細胞（ES細胞）の利用や近年目覚ましい進展を遂げている遺伝子工学などは、一連の技術のさらなる発展を後押ししている。

ニワトリは、鶏肉や鶏卵等の重要なタンパク質源であると同時に、発生生物学や免疫学、神経学等の重要なモデル動物である。すなわち、ニワトリにおいても哺乳類と同様に、生殖工学を用いた遺伝資源の保全および復元、そして遺伝子改変ニワトリの作出などによる養鶏産業や基礎研究、さらには医療および環境保全への貢献が求められている。しかしながら、ニワトリをはじめとした鳥類では、哺乳類において確立されたような精子および受精卵を対象とした生殖工学技術を適用することができない。ニワトリの精子は耐凍性および融解後の生存性が非常に低く、一部の家禽においてのみその実用化が図られている他には、精子の凍結保存は技術的に困難を極めている。一方、鳥類の受精卵は大量の脂肪を含む巨大な卵黄を有することから、凍結保存そのものが不可能とされている。それゆえにニワトリをはじめと

した鳥類独自の生殖細胞の採取・操作技術が発達し、これら一連の鳥類生殖工学技術を家禽遺伝資源の保全および復元、遺伝子改変ニワトリの作出などへ活用する試みが多数なされている。

本章では、ニワトリの生殖細胞の発生過程や生殖工学技術を他の動物と比較しながら概説し、それらの問題点および本研究の目的について述べる。

2-2 生殖細胞の起源とその形成機構

生殖細胞の起源は胚発生の初期にあり、特定の因子の作用により体細胞の分化系譜から独立する形で形成される。生殖細胞の元になるものは始原生殖細胞 (Primordial germ cells : PGCs) と呼称され、多くの動物では胚体外領域において PGCs の形成が誘導される。PGCs はその後、胚発生の一定の時期を境として将来的に精巣または卵巣に分化する生殖巣予定領域へと移動し、その場で大量増殖および配偶子形成に向けた分化を行なった後、しかるべき時期に配偶子形成を開始する。

キイロショウジョウバエは、生殖細胞の形成について最も研究の進んだ動物の一種である。キイロショウジョウバエの卵母細胞は、その後極側に生殖質と呼ばれる細胞質領域を持つ。生殖質を電子顕微鏡下において観察すると、高電子密度の顆粒 (極顆粒) が見られる。極顆粒の中には生殖細胞としての運命決定を行なうため、あるいは生殖細胞を体細胞からの分化シグナルから保護するために必要となるタンパク質および mRNA (*Vasa*、*Pgc* など) が含まれている (Hanyu-Nakamura ら 2008 年)。キイロショウジョウバエの受精卵は第一分裂期に細胞質分裂を行わずに核分裂のみを行なうが、この時に分裂した核の一つが後極側へと移動して増殖し、極顆粒を取り込みながら「極細胞」と呼ばれる細胞集団を形成する。極細胞では極顆粒に含まれる因子の影響を受けて生殖細胞としての運命決定が行なわれ、PGCs が成立する (Nakamura ら 1996 年)。一方で、生殖質を取り込まなかった核は生殖細胞になることはなく、体細胞としての分化系譜を辿る。このように、生殖細胞としての運命決定が胚発生のごく初期に起こる動物、厳密には母性因子によって生殖細胞としての運命決定が誘導される生

殖細胞形成のメカニズムを総称して「前成型 (Preformation)」と呼ぶ。前成型の生殖細胞形成は、キイロショウジョウバエのほか、線虫、アフリカツメガエル等において見られる。

一方、哺乳類のような高等脊椎動物では、胚発生がある程度進行した後に生殖細胞としての運命決定が行なわれる。マウスでは、エピブラストと呼ばれる胚齢 6.0-6.25 日 (E6.0-6.25) の胚体外外胚葉において *Bone morphogenic protein 4* (*Bmp4*) が発現を開始する。そのシグナルを受け、E6.25-6.5 に胚性外胚葉近位部における数個程度の細胞で *B lymphocyte-induced maturation protein-1* (*Blimp-1*) が発現するようになる。この *Blimp-1* 陽性細胞がマウスにおける生殖細胞の起源とされている (Ohinata ら 2005 年)。*Blimp-1* 陽性細胞はその後、PGCs 特異的遺伝子である *Stella*、*Nanos3*、*Prdm14* などの PGCs 特異的遺伝子を発現するようになり、E7.25-7.5 ごろの胚体外尿膜基部において PGCs が形成される (Tsuda ら 2003 年、Yabuta ら 2006 年、Kurimoto ら 2008 年、Yamaji ら 2008 年)。また、*Bmp4* 依存的に *Blimp-1* を発現するにあたって、中胚葉系分化因子である *T* (*Brachyury*) の仲介を経る必要があることから、哺乳類の PGCs は原腸陥入期前後の中胚葉分化の系譜から生じると考えられている (Aramaki ら 2013 年)。このように、胚発生の途中で生殖細胞が成立する機構を「後成型 (Epigenesis)」と呼ぶ。現在のところ、後成型の生殖細胞形成は哺乳類のみで見られる。

2-3 鳥類における生殖細胞の発生分化

ニワトリを始めとした鳥類における生殖細胞の成立機構は、生殖細胞特異的遺伝子である *Vasa* の相同遺伝子 (*Chicken Vasa Homolog* (*Cvh*)) を指標とした運命追跡により、キイロショウジョウバエやアフリカツメガエルと同様の「前成型」であることが示唆されている (Tsunekawa ら 2000 年)。すなわち、CVH タンパク質は排卵前の卵母細胞で生殖質様構造の中に見られ、受精後の第一卵割期にも CVH タンパク質の発現が観察されるのである。このことは、*Vasa* タンパク質はキイロショウジョウバエと同様にニワトリにおいても生殖細胞運命決定に際して重要な役割を果たすことを示唆している。

CVH 陽性細胞は、放卵されるまでの間にもゆっくりと増殖を続け、放卵直後のステージ X

(St.X : ローマ数字は Eyal-Giladi と Kochav 1976 年のニワトリ胚発生ステージを示す) では、胚盤葉明域中央部におおよそ 30-150 個前後の PGCs がみられる (Ginsburg と Eyal-Giladi 1987 年、Kagami ら 1997 年、Tsunekawa ら 2000 年、Nakamura ら 2007 年)。PGCs は個体発生に伴って原始線条の頭部領域へと押し出されるように移動し、孵卵開始から 19-22 時間が経過したステージ 4-5 (HH4-5 : Hamburger と Hamilton 1951 年) に達した胚の胚体外頭部領域において生殖三日月環と呼ばれる PGCs が弧状に集合した領域を形成する。PGCs はその後、孵卵 2.5 日 (E2.5) 前後の HH13 を境に頭部卵黄静脈から循環系へと進入し、HH13-17 ごろまで血流中を循環する (Nakamura ら 2007 年、De Melo Bernardo ら 2012 年)。PGCs が血流中を循環するという性質は、卵殻内で個体発生を完結させる鳥類および一部の爬虫類のみにみられる非常に特徴的な性質である。胚の発生段階が HH15-17 に達すると、PGCs は生殖巣予定領域付近に発達する毛細血管網へと進入し、そこから血管壁を離脱して生殖巣予定領域へと移動を開始する。Nakamura ら (2007 年) による報告では、血管壁を離脱した PGCs (HH16) に仮足が見られることから、PGCs は生殖巣予定領域近傍から分泌される化学誘引因子の作用により、生殖巣予定領域に向かって遊走する可能性が示唆されている。しかしながら、PGCs が生殖巣予定領域近傍のみで選択的に血管壁を離脱するメカニズムや、生殖巣予定領域に向けた細胞間遊走などに参画する遺伝子やタンパク質の多くは、依然としてその大部分が不明である。

生殖巣予定領域へと移動した PGCs は、E3.0-6.5 日にかけておおよそ 3,000 個以上にまで増殖する。E6.0-6.5 以降の生殖巣体細胞では性分化が開始されると共に、代表的な生殖細胞の分化因子であるレチノイン酸、エストロゲンやプロゲステロン等に代表される各種ステロイドホルモンの合成が開始され、PGCs は多様な分化シグナルの影響を受ける (Smith ら 2008 年、Lambeth ら 2013 年、Mi ら 2014 年)。それに伴って雄の PGCs は精原細胞に、雌の PGCs は卵原細胞にそれぞれ分化していくとされている (Swift 1914 年、Nakamura ら 2007 年)。

2-4 PGCs を用いた生殖系列キメラニワトリ作出技術

生殖系列キメラとは、別の個体に由来する生殖細胞が宿主となる固体の生殖器官において混在した状態を言う。すなわち、生殖系列キメラ個体では宿主由来の配偶子のほか、移植された細胞（ドナー）に由来する配偶子が生産される。前述したように、ニワトリをはじめとした鳥類では、PGCsの胚盤葉明域中央部への局在・PGCの血流中の循環・生殖巣内のPGCsの大量増殖など、非常に特徴的なPGCsの局在パターンを示す。これらにより、鳥類ではその胚発生の過程で比較的容易にPGCsを採取・操作することが可能という特徴を持つ。このため、鳥類はPGCsを用いた生殖系列キメラ作出技術が劇的な発展を遂げてきた極めて特殊な動物である。そもそも、ニワトリやウズラでは発生胚の体外培養系（Perry 1988年、Onoら1994年）が樹立されていることから、胚への直接的なアプローチが容易である。したがって、配偶子の基幹であるPGCsを移植することによる生殖系列キメラ作出技術は、鳥類における生殖系列キメラ作出のための最も有効な手法といえる。

鳥類生殖系列キメラを作出するための第一の方法は、St.Xの胚盤葉を採取してドナー細胞とし、宿主胚の胚盤葉へと移植する方法である。鳥類における胚盤葉は、将来的に個体を形成するための前駆細胞が集積した組織と考えられており、マウスにおける胚盤胞やエピブラストに相当する発生段階として知られている（Painら1996年、Kagamiら1997年、Nakanoら2011年）。前述したように、胚盤葉の明域中央部には体組織の前駆細胞と共にPGCsが混在することから、この細胞をドナーとして宿主胚へと移植することにより生殖系列キメラの作出が可能である。Petitteら（1990年）は、解離した胚盤葉細胞を宿主胚胚盤葉の中央部に位置する胚盤下腔へと注入して、移植されたドナー胚盤葉細胞と宿主の胚盤葉細胞を混合させる手法により、生殖系列キメラ個体を作出することに初めて成功した。また、Kagamiら（1997年）は、胚盤葉明域中央部にPGCsが存在することを利用して、宿主の胚盤葉明域中央部の一部を外科的に除去する方法を開発した。これにより、ドナー由来後代の産出割合を飛躍的（0-100%、平均32.5%）に向上させることに成功した。上述のような胚盤葉を用いたキメラ個体の作出法は極めて汎用性が高く、ウズラ（Onoら1994年）、水禽（Liら2002年）などへの応

用がなされている。また、同じく胚盤葉を *in vitro* で培養して得られる「ニワトリ ES 様細胞」を用いたキメラ作出も、多くの場合は本法を用いて行われている (Pain ら 1996 年、Nakano ら 2011 年)。本法を用いて作出されたキメラニワトリは、理論上ドナーと宿主の細胞が全身に斑状に共在することとなり、キメラマウスの作出法に近似な方法であると言える。すなわち、ドナーに用いる鶏種とは異なる羽色の宿主胚を用いることにより、ドナー細胞が宿主に寄与したか否かを視覚的に判断できるという大きなメリットを有する。

第二の方法は、HH13-16 に達した胚の血流中を循環している PGCs (循環 PGCs ; cPGCs) や生殖巣へと移動した PGCs (生殖巣生殖細胞 ; GGCs) などを単離して移植することで、上記の方法とは対照的に生殖系列のみをキメラ化させる方法である。胚盤葉キメラは体細胞もドナー由来の細胞に置換されるが、この方法で作出された生殖系列キメラは生殖細胞のみがドナー由来のものに置換されるため、一般的にはドナーに用いた鶏種との後代検定によってドナー生殖細胞の寄与を判定する。

上述のうち、cPGCs を用いた生殖系列キメラニワトリ作出法は、Tajima ら (1993 年) によって最初に報告された。本法は、ニワトリ PGCs が HH13-17 にかけて胚血流中を循環する性質があることを利用し、血液から cPGCs を採取して宿主胚の循環血中へと移植する方法である。これにより、宿主側の PGCs とドナー側の PGCs が混在した生殖系列キメラを作出することができ、実際にドナー由来の後代を得ることに成功している。また、Tajima ら (1999 年) および Nakamura ら (2007 年) が行ったその後の研究で、cPGCs の個数は HH14 において最大となり、また PGCs は HH16 以降から生殖巣予定領域への移動が開始されることが示されている。これらの研究は、ドナーとなる cPGCs を採取する時期として HH14 が適当であること、また採取された cPGCs を移植する時期として HH13-16 が適当であることをそれぞれ示唆している。

上記に加え、血液中にごく少数しか存在しない cPGCs を純化・濃縮し、移植された PGCs が生殖系列に寄与する確率を高めるための技術開発も同時に行なわれた。Yasuda ら (1992 年)

は、Ficoll を用いた密度勾配遠心分離法によって血球と cPGCs とを分離する手法を報告し、血液細胞中に 0.048%しかない PGCs を 3.9%にまで濃縮することに成功した。後年、Zhao と Kuwana (2003 年) は Nycodenz 密度勾配遠心分離法により、cPGCs を 70%以上の割合で濃縮する技術を開発した。また、PGCs を識別する細胞膜表面抗原を用いて、磁気活性細胞分離法 (MACS) や蛍光活性細胞分離法 (FACS) により同様に PGCs を濃縮する方法も開発されている (Ono と Machida 1999 年、Kim ら 2004 年、Mozdziak ら 2005 年)。加えて、圧倒的多数の血球細胞を低浸透圧のアンモニウム塩酸カリウム (ACK) 溶液中で溶血させ、低浸透圧への抵抗性が比較的高い cPGCs を効率的に回収する方法も存在する (Yamamoto ら 2007 年)。

生殖巣に移動し、その後大量増殖した PGCs は生殖巣生殖細胞 (GGCs) と呼ばれている。血液中を循環する cPGCs は、その採取・純化操作の煩雑さの割に一つの胚から回収できる細胞数が少ない (~100 個程度) のに対し、GGCs は 1 つの胚から 2,000 個以上回収することができるため、胚の損耗を最小限に留めることができる点において有用である。Tajima ら (1998 年) は、E5.0 の生殖巣から得られた GGCs を 3-4 ヶ月間に渡って凍結保存し、融解した GGCs を HH14 の血流中へと移植することにより、凍結 GGCs 由来の後代を得ることに成功した。また、同様の方法はウズラ (Kim ら 2005 年)、フサノエリショウノガン (Wernery ら 2010 年)、アヒル (Liu ら 2012 年) など、キジ科のみならず水禽も含めた幅広い鳥類において、GGCs を用いた生殖系列キメラの作出に用いられている。一方で、GGCs は生殖巣の体細胞から分泌される複数種類の分化因子の影響にさらされており、cPGCs に比べると分化段階が進んだ細胞とみなすことができる (Smith ら 2008 年、Nakajima ら 2014 年)。

2-5 ニワトリ PGCs の培養技術

Tajima ら (1993 年、1998 年) によって cPGCs あるいは GGCs を用いた生殖系列キメラ作出技術が開発されてから、PGCs および GGCs は遺伝子改変ニワトリの作出や鳥類遺伝資源の保全のための最も強力なターゲット細胞として認知されるようになった。なぜなら、ニワトリを始めとした鳥類は哺乳類とは異なり、配偶子への直接的な遺伝子操作が困難であるだけ

でなく、精子や卵子の凍結保存が技術的に困難な動物だからである (Mizushima ら 2010 年、Macdonald ら 2010 年)。また、胚盤葉から樹立される鳥類 ES 様細胞も、現時点では配偶子にまで分化する能力を持った株が得られていない (Nakano ら 2011 年)。このような背景から、生殖系列を直接的に操作でき、しかも宿主の生殖巣内において配偶子形成を行なう能力を有する PGCs および GGCs は、その操作性・有効性ともに、上述の目的を達成するための最適なツールとなり得る。

このような背景から、PGCs および GGCs の利用性をさらに高めるために、*in vitro* においてこれらの細胞を培養する技術が研究されてきた。PGCs および GGCs の長期・大量培養系は、生殖細胞の純度や採取可能な数の問題を解決すると同時に、遺伝子導入を行なった際の長期間のスクリーニングや選抜を可能にする。したがって、未分化性や増殖性を長期間にわたって維持できること、宿主胚へと移植した時に配偶子形成能を持つことなどは、培養 PGCs および培養 GGCs の利用において重要なポイントとなる。

Chang ら (1995 年) は、E7.0 の生殖巣を酵素消化によって分散し、GGCs と同時に得られる生殖巣の体細胞をフィーダーとして GGCs を培養した。この培養系では、4-5 日間の培養で GGCs を 3.8 倍にまで増殖させ、さらに培養 GGCs に由来する後代を得ることに初めて成功している (Chang ら 1997 年)。しかしながら、これ以上の長期培養を行なうと GGCs が死滅、あるいは別の細胞へと分化転換してしまうことが問題点であった。これ以後も PGCs/GGCs の長期培養系に関する研究が行なわれてきたが、いずれの研究でも 17 日間を超えて PGCs/GGCs を培養することはできなかった (Yang と Fujihara 1999 年-a,b、Naito ら 2001 年)。

van de Lavoie ら (2006 年) は、これまで用いられてきた培養系とは大きく異なる培養系、すなわちマウス ES 細胞の培養系に近い培養方法を選択することにより、雄由来の cPGCs を 200 日以上、雌由来の cPGCs を 109 日までの間にわたって培養することに成功した。さらに、培養 29-110 日までの培養 PGCs は受精可能な配偶子へと分化できることが証明された。これにより、遺伝子導入を行なった培養細胞の長期間にわたるスクリーニング・選抜が可能となり、培養 PGCs を用いるトランスジェニックニワトリの作出にも成功した。

上記培養系の最大の特徴は、マウス ES 細胞の培養液である KnockOut Dulbecco's Modified Eagle's Medium (KO-DMEM) を基礎培地として採用し、かつバッファローラット肝臓 (BRL) 細胞の馴化培地を基礎培地に添加している点、そして PGCs の増殖を刺激するサイトカインとして線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2)、白血病抑制因子 (LIF)、幹細胞因子 (SCF) が選択されている点である。加えて、Tonus ら (2014 年) は、同様の培養液を用いることで様々な系統のニワトリに由来する cPGCs を培養できることを報告している。また近年では、van de Lavoie ら (2006 年) が報告した培養系以外にも、Kuwana ら (1996 年) が開発した KAv-1 培養液を用いた培養系 (Naito ら 2010、2012、2015)、より汎用的な DMEM を基礎培地とした培養系 (Park と Han 2013 年)、ニワトリ ES 細胞の培養系 (Raucci ら 2015 年) などによっても PGCs/GGCs の培養が可能となっている。

2-6 本研究の目的

ここまで述べてきたように、ニワトリでは生殖系列キメラ作出技術および生殖細胞の利用性を高めるために PGCs または GGCs を対象とした培養技術の開発が行われてきた。しかしながら、上述したような培養系を用いた鳥類遺伝資源の保全、ならびに遺伝子改変ニワトリ作出の高効率化といった試みは完全には達成されていない。なぜなら、ニワトリ PGCs および GGCs は現在に至るも培養が非常に困難な細胞として知られており、*in vitro* における増殖効率も低率なためである。さらに、培養系によっては実験的な再現性を得られないこと、また配偶子形成能を喪失することなどの致命的な問題点も明らかになっており、ニワトリ生殖細胞の培養技術の汎用性は極めて低い (Naito ら 2010 年、Park と Han、2013 年、Raucci ら 2015 年)。これらの問題点は、ニワトリ PGCs および GGCs に好適な培養条件や増殖因子等の多くが未解明であることに起因すると考えられる。

上述したとおり、van de Lavoie ら (2006 年) によって cPGCs の長期培養系が開発されたことで、ニワトリ PGCs および GGCs の培養系は一定の完成を見た形となっている。これにより、近年ではニワトリ PGCs を培養するために必要な増殖因子を探索する研究やその作用メ

カニズムを解析する研究が可能となった。Choi ら (2010 年) ならびに Macdonald ら (2010 年) は、van de Lavoie ら (2006 年) が培養系に使用したサイトカインのうち、FGF2 が *in vitro* における PGCs の増殖および生存のために不可欠な因子であることを明らかにしている。すなわち、FGF2 は MEK/ERK シグナルを活性化して PGCs の増殖能を亢進させる一方、PGCs のアポトーシスを抑制する機能を持った因子であることが示されたのである。これに加えて、上皮細胞成長因子 (EGF) は PKC/NFκB1 の活性化を介してニワトリ PGCs の増殖および抗アポトーシスに寄与するとの報告がされている (Ge ら 2009 年)。しかしながら、FGF2 または EGF 以外の PGCs 増殖因子は未だその大部分が不明であり、上述の因子を含めた様々な因子の組み合わせによる最適な培養条件を検証した報告は存在しない。これらの事実は、ニワトリ PGCs 培養系を一層煩雑化させることにつながり、PGCs の培養系をさらに改良する上で大きな障害をもたらしている。

以上のように、ニワトリ PGCs の培養系が確立されたとはいえ、現状においては増殖効率の低さ、実験的な再現性の低さ、生殖巣への移動能および配偶子形成能の低下または喪失などの問題点があり、PGCs の培養系は汎用性の高いものになり得ていない。そこで本研究では、cPGCs をモデルとしてニワトリ PGCs の培養系を改良し、未だ黎明期にあるニワトリ PGCs 培養系の汎用性をより高めることを目的とした。具体的には、PGCs の長期維持、増殖とともに配偶子形成を可能とするために必要な培養技術の最適化と、ニワトリ PGCs の増殖を支持する因子の選定およびその作用メカニズムの解明により、上述したような問題点の改善に取り組んだ。

第3章

ニワトリ始原生殖細胞における増殖因子の探索と 長期培養系への活用

3-1 実験の背景と目的

第2章で述べたように、ニワトリにおいて PGCs の長期培養系が確立されつつある。現時点において最も広く用いられている培養系の一つは van de Lavoie ら (2006 年) によって開発されたものである。この培養系は、マウス ES 細胞の培養に使用される KnockOut Dulbecco's Modified Eagle's Medium (KO-DMEM) をバッファローラット肝臓 (BRL) 細胞で馴化させたものを基礎培地として、様々なサプリメントのほか、線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2)、白血病抑制因子 (LIF) あるいは幹細胞因子 (SCF) を添加した培地を使用し、さらに BRL 細胞または Sandoz inbred mouse-derived thioguanine-resistant and ouabainresistant (STO) 細胞をフィーダー細胞として PGCs を培養するものである。上記の培養系やこれを一部改変した培養系は様々な産業用家禽種 (コマーシャル鶏) に適用でき、いずれの培養 PGCs も受精可能な配偶子へと分化することができた (van de Lavoie ら 2006 年、Choi ら 2010 年、Macdonald ら 2010 年、Song ら 2014 年)。しかしながら、これらの培養系は増殖効率が安定せず、品種・系統によっては PGCs の増殖効率が非常に悪くなるのが大きな問題となっている (Tonus ら 2014 年)。増殖効率の高い培養系は、例えば培養 PGCs を用いた遺伝子改変ニワトリを作出する際にトランスジーンが導入された PGCs の選抜作業を容易にすること、希少家禽の PGCs を大量増殖させて遺伝資源の保存性や利用性を高めること等に必須である。したがって、より増殖効率が高く、かつ様々な品種・系統において安定的な増殖を保証する PGCs の培養系を開発する必要がある。

現在用いられている培養系は、PGCs の増殖の足場となるフィーダー細胞を使用したものが

一般的である。フィーダー細胞は、供給される栄養因子や増殖因子などの多くが未知である反面、適切なフィーダー細胞を選択することにより、複雑な組成の培地を用いることなく培養が困難な細胞（PGCs、多能性幹細胞など）の培養を可能にする。これまで、ニワトリ PGCs の培養には上述した BRL 細胞や STO 細胞のほか、初代培養ニワトリ胚性線維芽細胞（CEF; Tang ら 2007 年）、初代培養マウス胚性線維芽細胞（MEF; Park と Han 2013 年）、ニワトリ生殖巣由来体細胞（Chang ら 1995 年、1997 年、Naito ら 2010 年、2012 年）などがフィーダー細胞として使用されてきた。いずれの細胞も PGCs の増殖を促進する効果を持つとされるが、同一条件下においてそれらの増殖効果を検証した報告は存在しないことから、どの細胞が PGCs を増殖させるのに最適なフィーダーとして機能するかは不明である。

同様に、ニワトリ PGCs を増殖させるために必要な増殖因子の種類も十分には明らかにされていない。先行研究では、上皮細胞成長因子（EGF）や FGF2 がニワトリ PGCs の増殖および生存を支持する因子であると報告されている（Ge ら 2009 年、Choi ら 2010 年、Macdonald ら 2010 年）。しかし、いずれの増殖効果も同一条件下において検証されたものではなく、それぞれの研究において個別に検証されている。このため、ニワトリ PGCs が要求する増殖因子およびその組み合わせは、今もってその大部分が不明であると考えることができる。すなわち、PGCs 培養系の改良に際してはニワトリ PGCs の増殖への関与が推定されるサイトカインをスクリーニングした上で、同一の培養条件下において PGCs の増殖に最適なサイトカインの組み合わせを決めねばならない。

このように、ニワトリ PGCs の培養系や増殖因子に関しては現時点において多数の報告があるが、いずれの報告も異なる培養系あるいは独立した実験系を使用して検証されているため、どの培養条件がニワトリ PGCs の増殖に最適かは明らかになっていなかった。このことは結果的にニワトリ PGCs の培養系を一層複雑化させ、培養系によっては実験的な再現性に乏しいという大きな問題を招くこととなった。したがって、遺伝子改変ニワトリの作出や家禽遺伝資源の効率的な保全に培養 PGCs を役立てていくためには、実験的な再現性にも耐え

うる「培養系の最適化・標準化」が必須である。

以上のことから、本章では、1) ニワトリ PGCs の培養に使用するフィーダー細胞の比較検討を行ない、PGCs の増殖効率が最も高い基礎培養系を選定する、2) ニワトリ PGCs の増殖に必要なサイトカインをスクリーニングし、最適なサイトカインの組み合わせを調べることにより、PGCs に最適な培養条件を決定することを目的とした。さらに、3) 増殖した PGCs が正常な PGCs と同様に生殖巣への移動および配偶子形成を行なう能力を有するか否かを検討するため、培養 PGCs を移植した生殖系列キメラニワトリの作出とそれらの後代検定によって検証を行なうこととした。

3-2 材料および方法

供試動物および動物の取り扱い

信州大学農学部動物発生遺伝学研究室において飼養管理されている白色レグホン (WL) と横斑プリマスロック (BPR) より、人工授精によって受精卵を得た。実験に使用したニワトリは、信州大学動物安全委員会の定める実験動物取り扱い指針に従って飼養・管理し、ニワトリの個体そのものを扱う実験に際しては動物福祉に配慮した上で一連の実験を行なった。

フィーダー細胞の準備

本実験では、ATCC より分与された BRL 細胞 (CRL-1442) と STO 細胞 (CRL-1503)、そしてニワトリ胚性線維芽細胞 (CEF) をフィーダー細胞として使用した。BRL 細胞および STO 細胞は、10% のウシ胎子血清 (FBS; Bio west、ヌアイエ、フランス) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ、アメリカ) にて培養した。CEF は、HH30 になるまで発生させた胚を 0.25% トリプシン- 0.53mM EDTA 溶液 (和光純薬工業、大阪、日本) の中で解離することによって採取し、10% の FBS および 5% のニワトリ血清 (CS; Bio west) を含む DMEM 中にて培養した。フィーダー細胞の作成に関しては、およそ 90% コンフルエントに達したそれぞれの細胞を、5 μ g/mL のマイトマイシン C (和光純薬工業) を含む増殖培地で 2 時間処理して増殖を停止させ、マルチウェルプレートに再度播種て使用した。

PGCs の培養

WL および BPR から得られた受精卵を 53-56 時間発生させ、HH13-15 の胚を得た。シリコナイズ処理したガラスマイクロピペットを用いて背側大動脈より PGCs が含まれる血液を採取した。PCR による性判別後、血液を PGCs 増殖培地に混合し、予め BRL フィーダー細胞を準備した 48 ウェルプレートに播種した。PGCs 増殖培地は、KnockOut DMEM (KO-

DMEM; Life Technologies、カールスバッド、カリフォルニア、アメリカ) を BRL 細胞で 9 日間馴化したものを基礎培地として、これに 7.5% FBS ES-qualified (Life Technologies)、2.5% CS、1×Non-essential amino acid (Life Technologies)、1mM GlutaMAX (Life Technologies)、1mM ピルビン酸ナトリウム (Life Technologies)、1×Nucleosides (ミリポア、ビレリカ、マサチューセッツ、アメリカ)、0.5mM モノチオグリセロール (和光純薬工業)、5ng/mL ヒト FGF2 (和光純薬工業)、4ng/mL ヒト SCF (和光純薬工業)、2ng/mL マウス LIF (Sigma-Aldrich) をそれぞれ添加して調整した。培地交換は 2 日ごとに半量ずつ行い、継代は 7-10 日ごとに行なった。また、PGCs の増殖に応じて 6 ウェル組織培養プレートを上限として培養系をスケールアップした。全ての PGCs はこの培養系を用いて増殖させ、倍加時間が 2-3 日となって増殖性が安定したものを選別し、以降の解析を行なった。

PGCs の増殖試験

それぞれのフィーダー細胞が PGCs の増殖に与える影響を確かめるために、WL および BPR の培養 PGCs を BRL 細胞、STO 細胞あるいは CEF のフィーダー細胞上へそれぞれ移し変えた。PGCs は 1.0×10^4 個/mL の密度に調整し、それぞれのフィーダー細胞上で 30 日間培養した。各種サイトカインの増殖効果は、5ng/mL の FGF2、4ng/mL の SCF、2ng/mL の LIF をそれぞれ単独ないし複合して培養系へと添加することによって検証し、サイトカインの最適な組み合わせを検討した。

PCR による性判別

背側大動脈より採取した血液のうち、およそ 0.5 μ L を性判別用サンプルとして使用した。血液は、予め用意した DNA 抽出バッファー (100mM NaCl、50mM Tris-HCl、1mM EDTA、5mg/mL Proteinase K) に混合し、56 $^{\circ}$ C で 30 分間のインキュベーションを行なって DNA を粗抽出した。その後、95 $^{\circ}$ C で 5 分間の加熱を行なって Proteinase K を失活させたものを性判別用 DNA サンプルとした。そして、性判別用 DNA サンプルを 1 μ L、反応溶液の全量を 25 μ L

として Quick Taq HS Dyemix (TOYOBO、大阪、日本) にて PCR を行なった。この時、W 染色体特異的配列および 18S リボソームを増幅するプライマーをそれぞれ使用した (Clinton ら 2001、表 3-1)。反応は、95 °C で 2 分間の予備変性を行ったのち、95 °C で 30 秒間、56 °C で 30 秒間、68 °C で 30 秒間のサイクルを 25 回繰り返して、反応を終了した。PCR 増幅産物は 1.2% TAE-アガロースゲルにて展開し、416bp 付近に現れる W 染色体特異的増幅産物の有無により雌雄を判定した。

蛍光免疫染色

培養 PGCs を PBS (-) に浮遊させ、MAS-GP コートスライドガラス (松浪硝子、大阪、日本) にマウントして素早く乾燥させた。再水和の後に 4% パラホルムアルデヒド-りん酸緩衝液 (ナカライテスク、京都、日本) を用いて 5 分間、室温にて固定した。洗浄後、ブロッキング液 (ヤギ正常血清を 5% の濃度で含有する PBS (-)) をマウントして 30 分間、室温でインキュベートし、非特異的な抗体反応を阻止した。その後、一次抗体を含むブロッキング溶液と 4 °C で一晩反応させた。一次抗体反応後、PBS (-) にて 3 回洗浄し、二次抗体を含むブロッキング溶液と室温で 30 分間反応させた。洗浄後、1 μ g/mL の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; 和光純薬工業) で 5 分間の核染色を行い、カバーガラスをかぶせて封入した。蛍光画像は IX 71 倒立蛍光顕微鏡 (オリンパス、東京、日本) によって取得し、ORCA-ER 冷却 CCD カメラシステム (浜松ホトニクス、静岡、日本) によって画像解析を行なった。取得した画像は、Adobe Photoshop Elements (Adobe Systems、サンノゼ、カリフォルニア、アメリカ) によって処理し、トリミングおよび蛍光画像の重ね合わせを行なった。

使用した抗体の種類、抗原動物、希釈倍率およびリソースを以下に列挙する。ラット抗ニワトリ vasa ホモログ抗血清 (CVH; 1:10000、Nakamura ら 2007 年)、マウス抗ステージ特異的胚性抗原-1 抗血清 (SSEA-1; 1:100、Developmental Studies Hybridoma Bank、アイオワシティ、アイオワ、アメリカ)、Alexa 488 標識ヤギ抗ラット IgG 抗血清 (1:1000、Life Technologies)、Alexa 594 標識ヤギ抗マウス IgM 抗血清 (1:1000、Life Technologies) または TRITC 標識ヤ

ギ抗マウス IgM 抗血清 (BECKMAN COULTER、ブレア、カリフォルニア、アメリカ)。

RT-PCR

各種の培養細胞、雌雄の生殖巣および cPGCs より、RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen、ヴァレンシア、カリフォルニア、アメリカ) の取扱説明書に従って Total RNA を抽出した。この時、cPGCs は Nycodenz 密度勾配遠心分離法 (Zhao と Kuwana 2003、Nakamura ら 2010-a) によって純化されたものを使用した。抽出された RNA を PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ、滋賀、日本) の反応液へ添加して逆転写反応を行ない、cDNA を生成した。次に、TaKaRa EX Taq Hot Start Version (タカラバイオ) の取扱説明書に従って反応溶液を調整し、鋳型 cDNA の反応量を 1ng、溶液総量を 25 μ L として PCR を行なった。使用したプライマー配列ならびに Accession Number は表 3-1 に示した。反応は、95 °C で 2 分間の予備変性を行ったのち、95 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間のサイクルを 40 回繰り返した後、最終伸長反応を 72 °C で 5 分間行い、反応を終了した。PCR 増幅産物は 1.2% TAE-アガロースゲルにて展開した。

生殖巣への移動能解析

培養 PGCs および Nycodenz 密度勾配遠心法によって採集された cPGCs を PKH26GL Fluorescent cell labeling kit (Sigma) によって蛍光標識した。概説すると、培養 PGCs または cPGCs を含む 500 μ L の PBS (-) と 1 μ L の PKH26GL Dye を含む 500 μ L の PBS (-) をそれぞれ混合し、室温で 3 分間の染色を行なった。そして、PGCs 培地を 200 μ L 添加して反応を停止させ、PBS (-) で 3 回洗浄した。染色したそれぞれの細胞を HH14-16 に達した胚の背側大動脈へと 100 個ずつ移植し、胚培養を継続した。HH30-31 に達した移植胚より生殖巣を中腎ごと摘出し、30G の注射針を用いて生殖巣のみを採取した。生殖巣は倒立蛍光顕微鏡下にて観察し、生殖巣内の PKH26 陽性細胞の個数を計数した。画像の処理および取得は、蛍光免疫染色と同様に行なった。

生殖系列キメラの作出と後代検定

培養 PGCs が正常な配偶子形成能を有するかどうか調べるために、BPR から得られた培養 PGCs を用いて生殖系列キメラを作出した。前項と同様、HH14-16 に達した WL 胚の背側大動脈に培養 PGCs を 1,000 個ずつ移植し、孵化するまで培養した。孵化したキメラ個体は人工授精によって BPR と交配した。本実験では、ヒナの羽装によってドナー由来の配偶子形成が行なわれたか否かを判断した。レシピエントである WL は優勢白色羽装の遺伝子型をホモで持ち (I/I)、ドナーである BPR では同遺伝子型が劣勢ホモ (i/i) である。すなわち、黒色 (i/i) のヒナが産まれた場合にはドナーである BPR の培養 PGCs に由来する後代であることを示し、また白色のヒナ (I/i) の場合はレシピエント由来の後代であることをそれぞれ示している。

統計解析

統計解析には、Microsoft Excel 2010 のアドインプログラムである Statcel 3 (Yanai 2010) を使用した。PGCs の増殖能の判定には一元配置分散分析を使用し、効果が有意であると判定された場合には Tukey's HSD によって多重比較分析を行なった。生殖巣への移動能の差異は、スチューデントの t 検定によって解析した。全ての統計解析において、 $P < 0.05$ となった場合に有意であると判定した。データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。

3-3 結果

初代培養時の PGCs の増殖

HH13-15 に達した WL および BPR 初期胚より、血液と共に cPGCs を採取した。PCR による性判別を行なった後に血液を雌雄ごとに分け、それぞれ 20 個体分の血液を品種別に用意した。血液を培養液に直接混合して BRL フィーダー細胞と共に 48 ウェルプレート上で培養した。培養開始から 7-10 日後には血液細胞が死滅して PGCs が識別できるようになったため、培養 10 日目から初代培養 PGCs の増殖能を検証した。なお、計数開始時（培養 10 日目）における PGCs 数は、WL 雄で 20.15 ± 2.11 個/mL、WL 雌で 16.60 ± 2.23 個/mL、BPR 雄で 34.4 ± 2.50 個/mL、BPR 雌で 27.25 ± 2.29 個/mL であった。雄の PGCs は、WL・BPR 共に培養 10 日目から 40 日目までの 30 日間に渡って安定的な増殖を続け、その間に WL では平均 88.6 倍、BPR では平均 245.0 倍まで増殖した（図 3-1A,B）。一方、雌の PGCs は WL・BPR 共にほぼ増殖せず、培養 40 日目までに死滅した（図 3-1A,B）。最終的に、雄胚からのみではあるが、WL と BPR 共に安定的に増殖を続ける培養 PGCs の集団を得ることができた。従って、以降の実験は雄の培養 PGCs を用いて行なうこととした。

各種フィーダー細胞上での PGCs の増殖効果

培養開始から 50 日が経過した WL および BPR の培養 PGCs を 1.0×10^4 個/mL になるように調整し、それぞれ異なるフィーダー細胞上に播種して各種のフィーダー細胞上における PGCs の増殖効果を調べた。培養 30 日後における PGCs 数は、WL で $8.70 \pm 0.66 \times 10^6$ 個/mL（BRL 細胞）、 $2.99 \pm 0.67 \times 10^6$ 個/mL（STO 細胞）、 $5.94 \pm 1.16 \times 10^6$ 個/mL（CEF）であり、BRL フィーダーにおける増殖効率が最も高かった（図 3-2）。BPR では、 $9.72 \pm 0.82 \times 10^6$ 個/mL（BRL 細胞）、 $2.56 \pm 0.12 \times 10^6$ 個/mL（STO 細胞）、 $2.88 \pm 0.29 \times 10^6$ 個/mL（CEF）であり、こちらも BRL フィーダーにおける増殖効率が最も高かった（図 3-2）。従って、WL および BPR の PGCs を培養する際には、BRL 細胞をフィーダー細胞として使用することで PGCs の増殖効率が最

大となることが示された。

PGCs における増殖因子のスクリーニング

ここでは、胚体内において PGCs が最も活発に増殖する時期である HH30 胚の生殖巣体細胞から供給される増殖因子と、PGCs において発現するレセプターの遺伝子発現を RT-PCR を用いて調べることにより、PGCs の増殖に関与するサイトカインのスクリーニングを行なった。生殖巣の体細胞では、*FGF2*、*SCF* の発現および *LIF* の弱い発現が雌雄においてそれぞれ確認され、*EGF* は雄において極めて弱い発現が確認された (図 3-3)。cPGCs では雌雄共に *FGF2R*、*LIFR*、*c-Kit*、*EGFR* の発現が確認された (図 3-3)。また、*LIF* のレセプターである *LIFR* および *SCF* のレセプターである *c-Kit* の遺伝子発現量は、雄 PGCs において多い傾向であった。以上の結果から、PGCs は *in vivo* において *FGF2*、*LIF* および *SCF* のシグナルを受容して増殖を行っており、*EGF* のシグナルは PGCs の増殖のために必須ではないと考えられる。したがって、PGCs の増殖因子としては *FGF2*、*LIF* および *SCF* の 3 因子を候補に、今後の実験を行なうこととした。

各種増殖因子の組み合わせによる PGCs の増殖効果

前項の結果から、*FGF2*、*LIF* および *SCF* を単独ないし複合して培養系に添加することにより、BRL フィーダー細胞上における WL と BPR それぞれの PGCs の増殖に与える影響を調べた。その結果、WL と BPR とともに、*LIF* および *SCF* の単独での添加は PGCs の増殖を支持せず、*FGF2* 存在下のみで PGCs の効果が顕著であった (図 3-4A, B、 $P < 0.05$)。また、*FGF2* のみを添加した培地および *FGF2*、*LIF* および *SCF* を添加した培地を使用することで PGCs の増殖効果が最大となった。このことから、ニワトリ PGCs の *in vitro* における増殖のためには *FGF2* の添加が必須であることが示された。また、*FGF2* の単独使用でも十分な PGCs の増殖効果を得られることが明らかとなった。

培養 PGCs の特徴解析

BRL フィーダー細胞および FGF2 を含有する培地で培養された PGCs は、正常な cPGCs (図 3-5A) に酷似した形態的特徴を呈する細胞であった。すなわち、直径 10-20 μ m の比較的大きな浮遊細胞で、細胞質内の大型の核および脂肪滴を有するなど、PGCs に特徴的な細胞形態が観察された (図 3-5B)。続いて、培養 PGCs が正常な cPGCs に近似な性質を維持しているか否か調べるために、蛍光免疫染色および RT-PCR による特徴解析を行なった。蛍光免疫染色による特徴解析では、未分化型細胞の細胞表面に発現する糖タンパク質である SSEA-1 と、生殖細胞特異的タンパク質である CVH との共局在が認められた (図 3-6A)。RT-PCR による特徴解析では、WL と BPR 共に多能生細胞マーカーである *Nanog* および *PouV*、生殖細胞特異的マーカーである *Cvh* および *Dazl* が発現していた (図 3-6B)。これらの結果から、培養 PGCs は未分化型生殖細胞としての特徴を維持しながら増殖していることが示された。

培養 PGCs の生殖巣への移動能

培養 PGCs が正常な PGCs と同様な挙動を取り得るか調べるために、PKH26 によって蛍光標識された培養 PGCs を HH14-16 に達した胚の背側大動脈へ 100 個ずつ移植して、生殖巣への移動能を調べた。培養 PGCs を移植した胚の生殖巣では PKH26 の蛍光が確認され (図 3-7A)、PKH26 陽性の細胞数は左生殖巣で 18.67 ± 1.45 個、右生殖巣で 10.83 ± 1.25 個であった。しかしながら、同様に移植された cPGCs は、左生殖巣に 31.83 ± 4.23 個、右生殖巣に 22.50 ± 2.14 個が移動しており、その数は左右生殖巣ともに培養 PGCs に比べて有意に多かった (図 3-7B、 $P < 0.05$)。

長期培養後の PGCs における配偶子形成能

最後に、長期培養した PGCs の配偶子形成能を調べるために、培養開始から 225 日または 232 日に達した BPR 由来の培養 PGCs を HH14-16 に達した WL 初期胚の背側大動脈へ 1,000 個ずつ移植した。20 の操作胚に対し、孵化した生殖系列キメラニワトリは合計 13 個体であ

り、そのうち8個体（雄：5羽、雌：3羽）が性成熟まで成長したため（表3-2）、後代検定によりドナー由来の配偶子形成を確認した。ただし、ドナーである培養 PGCs は雄胚に由来する細胞であるため、ドナーPGCs と異なる性の宿主ではドナーPGCs が配偶子分化を正常に完遂しないとする Tagami ら（1997年、2007年）の報告に基づき、雌のキメラニワトリにおける後代検定は行なわなかった。後代検定の結果、培養225日に達した PGCs を移植したキメラニワトリ（ID：325）より3個体（3/50、6%）のドナー由来後代を得ることができた（表3-3）。しかしながら、得られたドナー由来後代は全て死亡しており、生存する後代を得ることは出来なかった（図3-8）。

3-4 考察

本章では、これまで好適な培養条件が明らかでなかったニワトリ PGCs の培養系を最適化し、PGCs の増殖能が最も高く、さらに正常な PGCs と同様に生殖巣への移動能および配偶子形成能を維持するような長期培養条件を提案するに至った。これにより、雄由来 PGCs のみではあるが、安定的な増殖率を長期にわたって維持する「培養 PGCs 株」を樹立することも可能となった。これら一連の成果は、ニワトリ PGCs の増殖機構における新たな知見をもたらすのみならず、培養 PGCs を利用した家禽遺伝資源の保全ならびに遺伝子改変ニワトリ作出などの取り組みに有用である。

PGCs の増殖における系統間差・雌雄間差

本章における実験系は、van de Lavoie ら（2006 年）が報告した培養系を基準として、フィーダー細胞やサイトカインの組み合わせを変えることにより、ニワトリ PGCs の増殖に与える影響を調べた。これらの実験に先立ち、WL または BPR から得られた cPGCs を培養系に移して増殖させ、安定的に増殖するまで培養した。興味深いことに、初代培養時における WL および BPR に由来する PGCs の増殖能には品種間差が見られた。Nakamura ら（2011 年）は、WL、BPR およびファイオミから得られた cPGCs を HH14 の WL 初期胚へと同数移植した場合に、HH27 の生殖巣内におけるそれぞれの PGCs の増殖能が異なることを示している。本実験では、WL に比べて BPR の PGCs で *in vitro* における増殖能が高かったことから、培養系への適応性や要求する増殖因子が 2 品種間で異なることにより、このような結果が得られたのかもしれない。

本実験ではさらに、雌胚に由来する PGCs を培養すると、WL と BPR とともにほとんど増殖することなく死滅することを示した。最終的に、安定的な増殖を行なう培養細胞系を樹立できたのは WL と BPR 共に雄胚に由来する PGCs のみであった。Kagami ら（1997 年）および Tagami ら（1997 年、2007 年）は、胚盤葉または cPGCs を異性の胚へ移植する実験により、

胚盤葉由来 PGCs と cPGCs の性的可逆性に明確な差が見られることを報告している。すなわち、胚盤葉由来 PGCs は異性の生殖巣内において性転換を行なうが、cPGCs を異性の胚へ移植した場合は性転換する PGCs の割合が極端に低くなるのである。これらの報告は、ニワトリの PGCs は胚盤葉から血流循環期までの間に PGCs 自身での性分化が開始されていることを示唆している。本実験ではさらに、雌 PGCs における *LIFR* および *c-Kit* の遺伝子発現量が雄 PGCs に比べて少ない傾向であることを示した。この結果は PGCs の雌雄差を直接的に証明するものではないが、雌 PGCs における増殖メカニズムが雄とは異なる可能性を示唆している。また、本実験において見られたような PGCs 増殖性の雌雄差は、これまで報告された PGCs 培養系に関する研究でも同様に報告されている (van de Lavoie ら 2006 年、Macdonald ら 2010 年、Song ら 2014 年)。以上の知見を総合すると、雌 cPGCs は培養開始時点において既に雌雄分化を開始しており、雌雄間で要求する増殖因子が異なる可能性が考えられる。すなわち、雌 cPGCs に適した培養系を新たに構築する必要がある。

PGCs の増殖における最適な条件

上述したように、本研究で採用した培養系では雌の PGCs を培養することが出来なかったものの、雄の PGCs が活発に増殖する培養細胞系を樹立することができ、また 100 日以上の培養を継続することができた。したがって、雄の PGCs を対象にフィーダー細胞および増殖因子の組み合わせを検討し、PGCs の培養系を最適化することとした。筆者はまず、BRL フィーダー細胞の使用が PGCs の増殖性を最も高めることを明らかにした。先行研究では、BRL 細胞の培養上清には LIF、SCF のほか IGF-1 などの増殖因子が含まれることが明らかにされているほか (Smith ら 1988 年、Zsebo ら 1990 年-a、Hill ら 1985 年)、未知の増殖補助因子や接着促進分子なども分泌していると考えられる。BRL 細胞が PGCs の増殖に直接的に与える影響については今もって明らかではないが、BRL 細胞は STO 細胞や CEF などの線維芽細胞に比して PGCs の増殖に対して好適な環境を提供したと考えられる。

本研究では、FGF2 を含有する培養液の使用が PGCs の増殖効果を最も高めることを示した。

一方で、SCF および LIF を単独または複合して添加した場合では、いずれの条件も PGCs の増殖を改善しなかった。先行研究においては、FGF2 は PGCs の増殖および生存に必須な因子であることが示されており、その効果は FGF2 受容体の低分子阻害剤 (PD173074) や MEK 阻害剤 (PD0325901) などによって抑制されることが明らかにされている (Choi ら 2010 年、Macdonald ら 2010 年)。また、MEK の主要な下流シグナル分子である ERK は、PD173074 および PD0325901 の処理によってリン酸化が抑制されることも明らかとなっている (Choi ら 2010 年)。これらの報告並びに本研究の結果は、FGF2 が MEK/ERK 回路を介して PGCs の増殖および生存に関与することを強く示唆している。他方、Macdonald ら (2010 年) は MEK/ERK シグナルの阻害のみならず PI3K の阻害剤である LY294002 の使用によっても PGCs の増殖が抑制され、アポトーシスの頻度が大幅に増加することを報告している (Macdonald ら 2010 年)。マウス PGCs では PI3K の活性化に関与するのは SCF およびそのレセプターである c-Kit であることが知られているが (Farini ら 2007 年)、筆者らの実験の結果、SCF の使用はニワトリ PGCs の増殖に大きな影響を与えないことが示された。Choi ら (2010 年) の検証により、ニワトリ PGCs では FGF2 の有無に関係なく PI3K/Akt のリン酸化が起こっていることが示されていることから、ニワトリ血清あるいは BRL フィーダー細胞から供給される未知の因子がニワトリ PGCs において PI3K の活性化を促しているのかもしれない。

本培養系で培養された PGCs は、WL と BPR とともに増殖の速いグループでは 1-2 日に 1 回程度の分裂を行っていた。この増殖速度は、先行研究で検証された倍化時間 (約 5-6 日 (Yang と Fujihara, 1999 年-a) ・約 2-3 日 (Choi ら 2010 年)) に比べて短く、PGCs は安定的な増殖を長期にわたって継続した。したがって、本培養条件は現時点においてニワトリ PGCs の増殖速度が最も速くなるような培養系であると思われる。

培養 PGCs の特徴解析

哺乳類では、PGCs を培養系に移すと胚性生殖細胞 (EG 細胞) と称される多能性細胞へと転換し、ES 細胞様のコロニーを形成しながら増殖する (Matsui ら 1991 年、1992 年)。すなわ

ち、哺乳類の培養 PGCs はその特徴を喪失することが知られている。また、ニワトリの培養 PGCs に関する報告でも、培養条件によっては未分化性の喪失 (Chang ら 1997 年)、生殖巣への移動能の喪失 (Naito ら 2012 年)、配偶子形成能の低下 (Macdonald ら 2010 年、Naito ら 2010 年) など、PGCs としての性質が変化した事例が存在する。本研究において培養された PGCs は、EG 細胞のようなコロニーを形成せず、浮遊ないし弱接着性の細胞として増殖しており、さらに生殖細胞特異的タンパク質である CVH と未分化型細胞特異的抗原である SSEA-1 を共発現する細胞であった。また RT-PCR により多能性細胞マーカー遺伝子である *Nanog* および *PouV* の強い遺伝子発現が検出された。これらのタンパク質/遺伝子の発現は、正常な cPGCs と酷似していたことから、培養 PGCs は正常な cPGCs に近似な未分化型生殖細胞としての特徴を保持しつつ増殖した細胞であることが示された。

培養 PGCs が正常な PGCs と同様に生殖巣へと移動する能力を持つか調べるために、BPR に由来する培養 PGCs および正常な cPGCs を PKH26 によって蛍光標識し、それぞれ 100 個ずつ移植した。移植された細胞を示す PKH26 の蛍光はそれぞれの生殖巣において確認されたが、培養 PGCs は cPGCs に比べて生殖巣へ移動する能力が低下していた。ニワトリ PGCs が生殖巣へ移動するために必要な化学誘引因子 (ケモカイン) の一つとして CXCL12/SDF-1 が知られているが (Stebler ら 2004 年)、筆者らが予備的に行なった検証では CXCL12 のレセプターである *CXCR4* の遺伝子発現は cPGCs と培養 PGCs との間で差がなかった (データ未掲載)。このことは、CXCL12/CXCR4 シグナル以外の誘引機構が PGCs の移動に関わっていることを示唆すると同時に、PGCs の特徴が培養中に変化したことを示している。

BPR 由来の培養 PGCs を 1,000 個ずつ移植した胚を孵化させて性成熟まで飼養し、後代検定によって培養 PGCs 由来の配偶子形成が起こっているかどうか調べた。その結果、3 個体 (3/50、6%) のドナー由来後代を得ることに成功し、培養 PGCs は受精可能な配偶子形成を行なう能力を有していることが示された。しかしながら、移植した PGCs 数に比してドナー由来後代の割合が低いのみならず、全て自力で孵化できずに死亡した個体であった。本実験では、PGCs を 225 日または 232 日間に渡って長期培養していることから、培養 PGCs は長期

培養中に性質が変化し、結果的に個体発生に対して悪影響を与えた可能性がある。とはいえ、本培養系を用いることにより PGCs が受精可能な配偶子へと分化する能力を 200 日以上にわたって維持できることも明らかとなった。これまでの培養系では、PGCs を数日から 100 日程度しか維持できず、比較的短期間の培養であっても培養後に PGCs が配偶子形成能を喪失した事例もある (Chang ら 1995 年、1997 年、Yang と Fujihara、1999 年-a, b、Naito ら 2010 年、2012 年)。受精可能な配偶子を形成する能力を 200 日以上にわたって維持できるような PGCs 培養系に関する報告はこれまでに無いことから、本培養系の開発は本研究の大きな成果の一つと考えられる。

3-5 表

表 3-1 使用したプライマーの名称およびプライマーの配列

Gene	Sequence	Annealing temp.	Product size (bp)	Accession No. or Ref.
<i>FGF2 F</i>	AGCGGCTCTACTGCAAGAAC	55°C	347	NM_205433
<i>FGF2 R</i>	AGCTTTCTGTCCAGGTCCAG			
<i>FGF2R F</i>	GTGGCAGTGAAGATGCTGAA	55°C	348	NM_205319
<i>FGF2R R</i>	TGGCTAAACCGAAGTCTGCT			
<i>LIF F</i>	CCAATGTCTGGAGCAGACC	55°C	418	XM_425293
<i>LIF R</i>	TTGAAGGCGCTCTTGTCCTT			
<i>LIFR F</i>	AGTGTCCATCTGCGTTGGTT	55°C	568	NM_204575
<i>LIFR R</i>	CCATTTCCATTGCCACAGC			
<i>SCF F</i>	GTCAAAGCCCAGAGTTCCTG	55°C	604	NM_205130
<i>SCF R</i>	GGCTGGAGCTGCTAATGAAG			
<i>c-Kit F</i>	GCCAGGGTGTGAATGAGAT	55°C	540	NM_204361
<i>c-Kit R</i>	GTCATTTGACCAGCTCAGCA			
<i>EGF F</i>	TTGCTGTAGCGGTGTTTGGAG	55°C	504	NM_001001292
<i>EGF R</i>	CCATTTCCATTGCCACAGC			
<i>EGFR F</i>	GCTGGGAATCTGCCTCACTT	55°C	544	NM_205497
<i>EGFR R</i>	ACGGCTGTCTGCATCAATCA			
<i>Nanog F</i>	CAGCAGACCTCTCCTTGACC	55°C	435	NM_001146142
<i>Nanog R</i>	CCAGATACGCAGCTTGATGA			
<i>PouV F</i>	CTCAGAGGAGCTGGAGCAGT	55°C	588	NM_001110178
<i>PouV R</i>	TTGTGGAAAGGTGGCATGTA			
<i>Cvh F</i>	GCATGCTCGATATGGGTTT	55°C	551	NM_204708
<i>Cvh R</i>	ACGACCAGTTCGTCCAATTC			
<i>Dazl F</i>	GTCAACAACCTGCCAAGGAT	55°C	519	NM_204218
<i>Dazl R</i>	CACTGTGGTGGAGCCTGATA			
<i>ACTB F</i>	ACTGGATTTTCGAGCAGGAGA	55°C	581	NM_205518
<i>ACTB R</i>	AGTCAAGCGCCAAAAGAAAA			
<i>WCS F</i>	CCCAAATATAACACGCTTCACT	56°C	416	Clinton <i>et al.</i> , 2001
<i>WCS R</i>	GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC			
<i>RGS F</i>	AGCTCTTTCTCGATTCCTGTG			
<i>RGS R</i>	GGGTAGACACAAGCTGAGCC			

表 3-2 操作胚の孵化率および性成熟に達した羽数

Days of PGCs Culture	Number of		
	Manipulated embryos	Hatched chicks	Sexually mature (Male / Female)
225	7	5	3 (2/1)
232	13	8	5 (3/2)

表 3-3 後代検定の結果

ID	Days of PGCs culture	Number of		
		White (<i>I/i</i>) offspring	Black (<i>i/i</i>) offspring	Donor derived offspring (%)
325	225	50	3	6
326	225	36	0	0
328	232	35	0	0
330	232	35	0	0
331	232	50	0	0

3-6 図

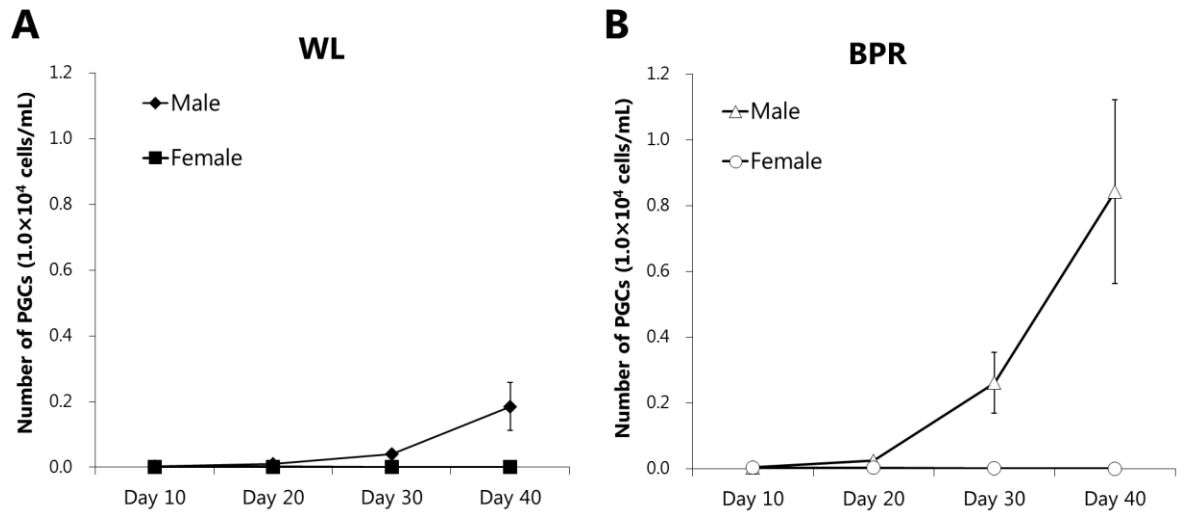


図 3-1 初代培養時における PGCs の増殖

HH13-15 の胚から得られた cPGCs を含む血液を BRL フィーダー細胞上にて培養し、培養 10 日目以降の細胞数を品種および雌雄ごとに示した。A) WL 由来 PGCs の増殖曲線を示す ($n = 40$)。B) BPR 由来 PGCs の増殖曲線を示す ($n = 40$)。

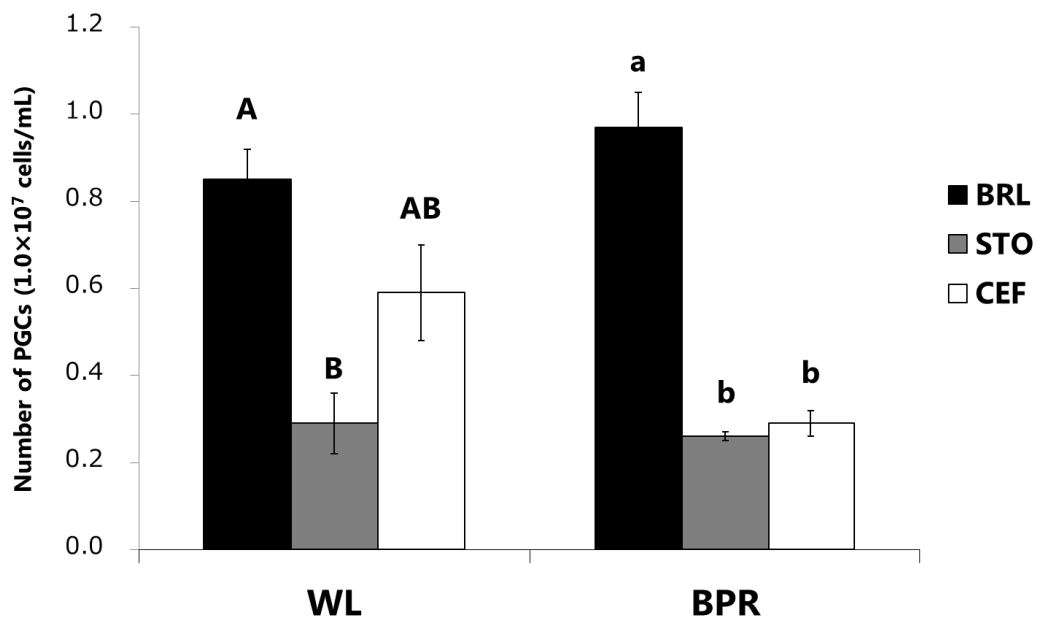


図 3-2 各種フィーダー細胞上における PGCs の増殖

WL および BPR に由来する培養 PGCs を 1.0×10^4 個/mL に調整し、各種フィーダー細胞上で 30 日間の培養を行なった ($n=4$)。左側のグラフが WL、右側のグラフが BPR の結果をそれぞれ示している。異符号間に Tukey's HSD による有意差あり ($P < 0.05$)。

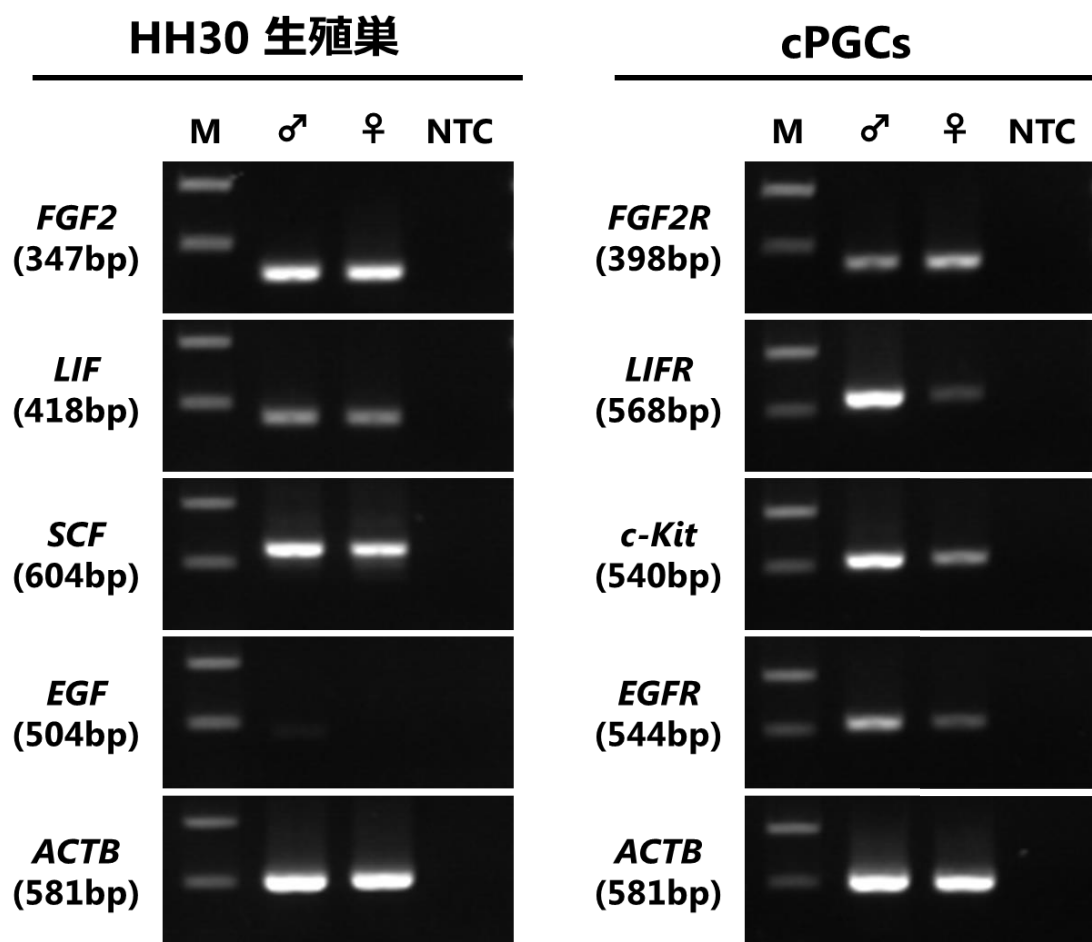


図 3-3 PGCs の増殖に関与する増殖因子の探索

HH30 の生殖巣体細胞における増殖因子の発現と、cPGCs における対応するレセプターの発現とを RT-PCR によって調べた。左側のカラムは雌雄の HH30 生殖巣体細胞における増殖因子の発現パターンを示す。右側は雌雄の cPGCs におけるレセプターの発現パターンを示す。M : DNA サイズマーカー (上のバンドは 1,000bp、下のバンドは 500bp をそれぞれ表している)。♂ : 雄胚から得られた生殖巣体細胞ならびに cPGCs を示す。♀ : 雌胚から得られた生殖巣体細胞ならびに cPGCs を示す。NTC : cDNA の代わりに Nuclease-Free 水を用いて PCR を行なったサンプルを示す。

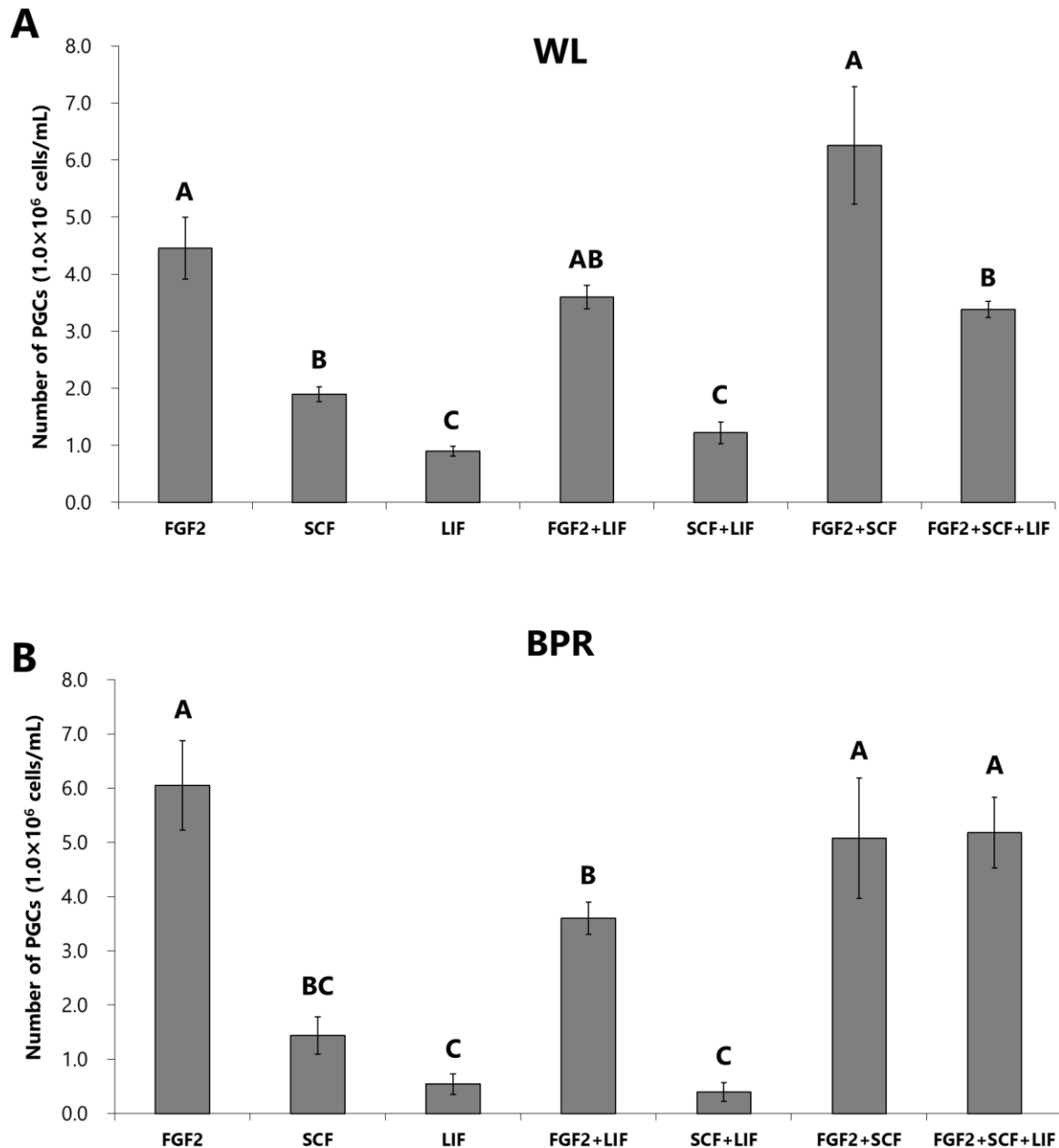


図 3-4 各種サイトカインの組み合わせによる PGCs の増殖

WL および BPR に由来する培養 PGCs を 1.0×10^4 個/mL に調整して BRL フィーダー細胞上に播種し、各種サイトカインを添加した条件で 30 日間の培養を行なった。A) WL 由来 PGCs における各種サイトカインの増殖効果を示す ($n=4$)。B) BPR 由来 PGCs における各種サイトカインの増殖効果を示す ($n=4$)。それぞれのグラフにおける異符号は Tukey's HSD による有意差を示す ($P < 0.05$)。

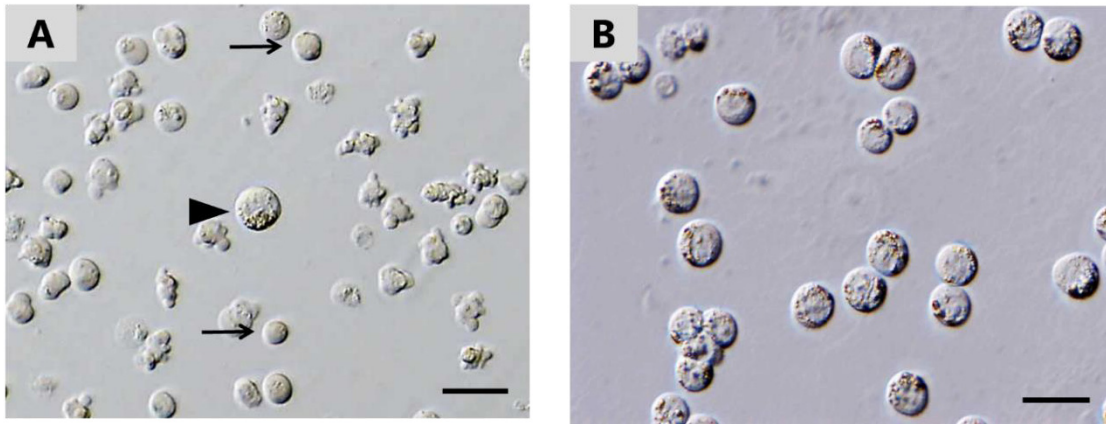


図 3-5 cPGCs および培養 PGCs の形態

A) HH14 胚から得られた cPGCs (矢頭)。矢印は血球細胞 (一部) を示す。B) 培養 247 日の PGCs。PGCs の後ろに見えるのは BRL フィーダー細胞。スケールバーはそれぞれ 20 μ m を示す。

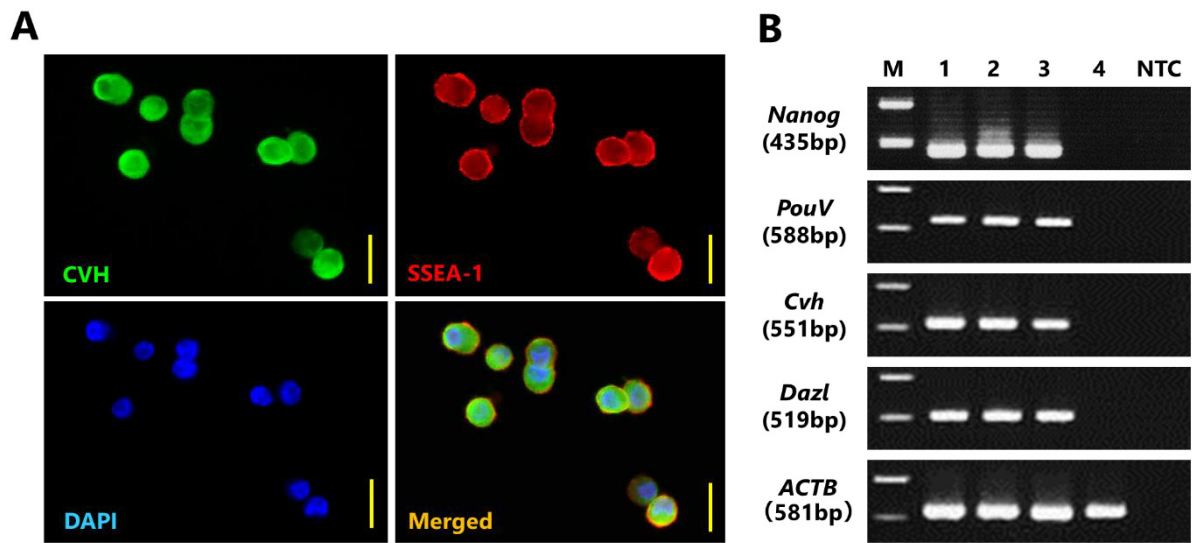


図 3-6 培養 PGCs の特徴解析

蛍光免疫染色および RT-PCR による培養 PGCs の特徴解析の結果を示す。A) 培養 PGCs の蛍光免疫染色像。生殖細胞特異的タンパク質である CVH (緑色) は細胞質内に、未分化型細胞に発現する糖タンパク質である SSEA-1 (赤色) は細胞膜上にそれぞれ発現している。スケールバーはそれぞれ 20 μ m を示す。B) WL および BPR に由来する培養 PGCs、WL 由来の純化された cPGCs および CEF における多能性マーカー遺伝子 (*Nanog*、*PouV*) と生殖細胞特異的遺伝子 (*Cvh*、*Dazl*) の遺伝子発現解析を RT-PCR により行なった。M: DNA サイズマーカー (上のバンドは 1,000bp、下のバンドは 500bp をそれぞれ表している)。1: WL に由来する培養 PGCs 株から得られた cDNA サンプルを示す。2: BPR に由来する培養 PGCs 株から得られた cDNA サンプルを示す。3: WL に由来する cPGCs から得られた cDNA サンプルを示す。4: ニワトリ胚性繊維芽細胞 (CEF) から得られた cDNA サンプルを示す。NTC: cDNA の代わりに Nuclease-Free 水を用いて PCR を行なったサンプルを示す。

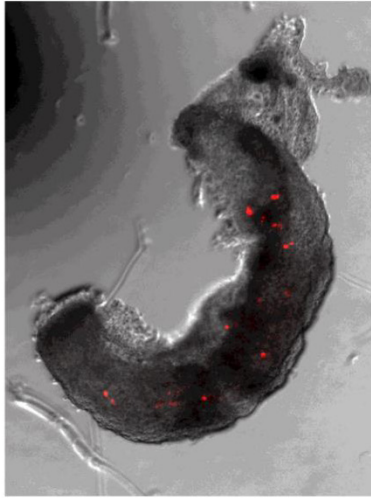
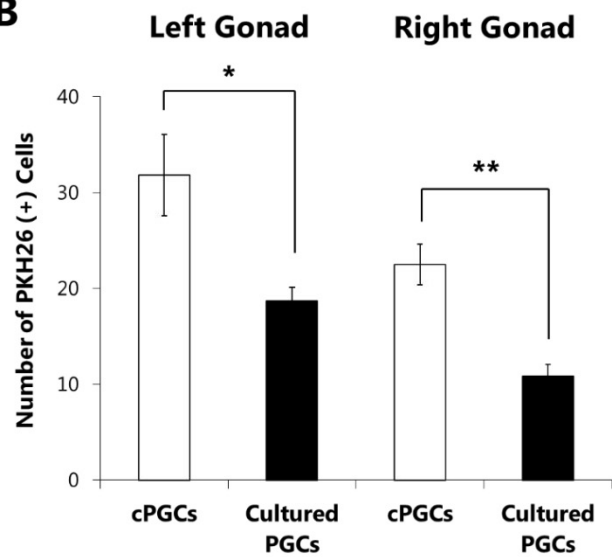
A**B**

図 3-7 培養 PGCs の生殖巣への移動能解析

BPR 由来の培養 PGCs ならびに純化された cPGCs を PKH26 で蛍光標識し、100 個ずつ HH14-16 の WL 初期胚背側大動脈へと移植した。A) 培養 PGCs を移植後、HH30 まで発生させた胚から採取した左生殖巣。赤色の蛍光は移動した培養 PGCs を示す。B) それぞれの細胞を移植した胚の生殖巣における PKH26 陽性細胞の個数を cPGCs と培養 PGCs および左右間で比較した ($n=10$)。スチューデントの t 検定に基づく有意水準は、* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ としてそれぞれ示した。



図 3-8 培養 225 日目の PGCs から得られた後代

BPR 由来培養 PGCs を 1,000 個移植した雄の生殖系列キメラ (ID : 121) を BPR の雌と交配することにより得られた培養 PGCs 由来の後代。黒色の羽装は、宿主 (WL : *II*) の精巣において培養 PGCs に由来する配偶子形成が行なわれ、さらに BPR の卵子 (*i/i*) との受精が正常に行なわれたことを示している。

第4章

ニワトリ始原生殖細胞の増殖に及ぼす幹細胞因子の影響

4-1 実験の背景と目的

第3章において、ニワトリ PGCs の培養に際しては FGF2 が含まれる培地および BRL フィーダー細胞を使用することで、PGCs の増殖効率が最大となることが示された。しかしながら、PGCs の増殖に関連する因子は、現時点において FGF2 以外は明らかにされていない。ニワトリ PGCs の増殖に関与する因子をより多く明らかにすることは、ニワトリ PGCs 培養系のさらなる改良や最適化を行なうために必須である。第3章での実験で、筆者はニワトリ PGCs の増殖への関与が推定される因子の候補を探索した。その結果、PGCs が最も活発に増殖する HH30 の生殖巣において幹細胞因子 (SCF) が雌雄共に高発現しており、その発現量は FGF2 と同程度であった。さらに雌雄の cPGCs においても SCF のレセプターである *c-Kit* の発現がそれぞれ確認された。このことは、*in vivo* においてニワトリ PGCs が SCF を受容して増殖することを示唆している。

SCF は、レセプター型チロシンキナーゼである *c-Kit* のリガンドとして知られ、BRL 細胞の培養上清に含まれる血球芽細胞や免疫細胞の増殖・分化に重要な液性因子として同定された (Zsebo ら 1990 年-a, b, Toksoz ら 1992 年)。SCF ミュータントマウスや培養細胞を用いた解析では、SCF は上記の機能の他、免疫細胞の増殖および成熟 (McNiece ら 1991 年)、精子形成 (Sato ら 2012 年)、メラノサイトの遊走 (Matsui ら 1990 年) など、生体内において多彩な役割を持つことが知られている。哺乳類の SCF には、細胞から分泌される分泌型 SCF (SCF1) と、細胞膜上に留まる膜結合型 SCF (SCF2) の2種類のアイソフォームが存在する (Anderson ら 1990 年, McNiece と Briddell 1995 年)。SCF のアイソフォームは、選択的スプライシングによって生成され、その生成機構および基本構造はヒトやマウス等の哺乳類のみならず、高

等脊椎動物で広く保存されている。SCF の基本的な構造単位はいずれのアイソフォームにおいても共通しており、細胞の外に露出した可溶性のサイトカイン機能ドメイン、細胞膜通過ドメイン、細胞質内ドメインから成る。ヒト SCF1 (248aa) の場合、サイトカイン機能ドメインと細胞膜通過ドメインとの間に位置するエクソン 6 領域にタンパク質切断ドメインを有し、この部分が酵素で加水分解されることにより、生理活性型の可溶性 SCF (165aa) として細胞外に放出される (Anderson ら 1990 年、Zsebo ら 1990 年-a、McNiece と Briddell、1995 年)。一方、ヒト SCF2 (220aa) では、エクソン 6 領域が欠損しているためにタンパク質切断ドメインを有さない。その結果、SCF2 タンパク質は細胞膜に繫留された状態で存在する (Anderson ら 1990 年、Flanagan ら 1991 年、McNiece と Briddell、1995 年)。

マウスの SCF は、PGCs の増殖・抗アポトーシス・生殖巣予定領域への移動を制御する極めて重要な因子である (Dolci ら 1991 年、Matsui ら 1991 年、1992 年、De Felici ら 1992 年、Runyan ら 2006 年、Gu ら 2009 年、2011 年)。また、SCF/c-Kit の相互作用は PI3K/Akt の活性化を誘導し、PGCs の増殖や抗アポトーシスに関与することが分かっている (De Miguel ら 2002 年、Farini ら 2007 年)。これらの知見に基づき、SCF は *in vitro* におけるマウス PGCs の培養に必須の因子として使用されている (Matsui ら 1991 年、1992 年、2014 年)。また、マウス PGCs は培養条件下において胚性生殖細胞 (EG 細胞) と称される細胞集団へ変化することによってのみ維持が可能であるが、近年では Akt のリン酸化の亢進が EG 細胞形成のために必須であることが明らかにされている (Kimura ら 2008 年、Matsui ら 2014 年)。すなわち、SCF は Akt の活性化を介してマウス PGCs の EG 細胞形成を促進することにより、マウス PGCs の *in vitro* での維持に貢献していると考えられる。

鳥類の SCF は、Zhou ら (1993 年) によってニワトリの分泌型 SCF が初めて同定され、次いで Petite と Kulick (1996 年) によってニワトリおよびウズラの膜結合型 SCF が同定された。鳥類 SCF はまた、ES 細胞の増殖 (Pain ら 1996 年)、神経細胞の増殖 (D'Costa ら 2000 年)、骨芽細胞の増殖と分化 (van't Hof ら 1997 年)、血球芽細胞の増殖と分化 (Hayman ら 1993

年、Bartůněk ら 1996 年) に関与することがそれぞれ判明しているなど、その機能の多くは哺乳類のものと共通である。その一方で、ニワトリ PGCs はマウス PGCs とは異なり、SCF 依存性の増殖を行わないという結果が筆者らを含めた複数の研究において示されている (Choi ら 2010 年、Macdonald ら 2010 年、Miyahara ら 2014 年)。

ニワトリ PGCs とマウス PGCs における SCF 利用性の差異は、一見するとニワトリとマウスでの増殖機構の差異であると解釈できる。しかしながら、Zhou ら (1993 年) および Petite と Kulick (1996 年) の報告では、ニワトリの SCF とマウス、ヒトなどの哺乳類 SCF とのアミノ酸相同性は 52-53% となっており、特にそのアミノ酸変異は SCF の機能ドメインである Four-Helical Cytokine Core Domain に集中していることから、これまでのニワトリ PGCs 培養系に用いられてきた哺乳類 SCF は、ニワトリ PGCs の増殖に対して効果を及ぼしていないことが推定される。したがって、ニワトリ PGCs における SCF の機能を正確に検証するためには、ニワトリ SCF (chSCF) を使用した培養系を選択する必要があると考えられる。また、これらの知見に基づき、chSCF は PGCs の増殖に有効であることを示唆する報告も複数存在している (Karagenc と Petite 2000 年、Glover ら 2012 年)

chSCF は、現在のところ分泌型、膜結合型を含めた 4 つのアイソフォーム (chSCF1-4) が同定されている (Wang ら 2007 年)。アミノ酸全長が最も長いタイプである chSCF1 (Accession No. DQ870920、287aa) は、哺乳類と同様にエクソン 6 領域中の 195-196aa にタンパク質切断ドメインを有し、分泌型 chSCF に相当すると考えられる (Zhou ら 1993 年)。また chSCF2 (Accession No. DQ870921、253 aa) も哺乳類同様にエクソン 6 領域を欠損した膜結合型 chSCF に相当することが明らかとなっている (Petite と Kulick 1996 年)。chSCF3 (Accession No. DQ870922、227 aa) はエクソン 4 領域の 60aa が欠損しており、また chSCF4 (Accession No. DQ870923、193 aa) はエクソン 4 および 6 領域が欠損している (Wang ら 2007 年、図 4-1)。

本実験では、chSCF1 および chSCF2 を用いてニワトリ PGCs の増殖試験を行なうこととした。なぜなら、chSCF1 および chSCF2 は様々な鳥類の SCF とアミノ酸相同性が高いだけでな

く、哺乳類 SCF1 および SCF2 のオルソログであることから機能面での比較が可能のためである。以上より、本実験では chSCF1 および chSCF2 を安定発現する BRL フィーダー細胞を用いて、chSCF1 および chSCF2 が培養 PGCs の増殖にどのような影響を与えるか調べた。

4-2 材料および方法

供試動物および動物の取り扱い

国立研究開発法人農業・食料産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 (NILGS) において飼養されている白色レグホン (WL) および横斑プリマスロック (BPR) より、人工授精によって受精卵を得た。実験に使用したニワトリは、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物実験等実施規程 (平成 23 年 4 月 1 日付け 23 規程第 122 号) ならびに畜産草地研究所動物実験等実施要領 (平成 23 年 4 月 1 日付け 23 畜草第 040111 号) に従って飼養・管理するとともに動物福祉に配慮して適切に取り扱った。

RNA 抽出および RT-PCR

孵卵 19 日目の卵巣または各種の培養細胞より、RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen、ヴァレンシア、カリフォルニア、アメリカ) の取り扱い説明書に従って Total RNA を抽出した。抽出された RNA (1 μ g) を PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ、滋賀、日本) の反応液へ添加して逆転写反応を行ない、cDNA を生成した。次に、TaKaRa EX Taq Hot Start Version (タカラバイオ) の取扱説明書に従って反応溶液を調整し、鋳型 cDNA の反応量を 1ng、溶液総量を 25 μ L として PCR を行なった。使用したプライマー配列ならびに Accession Number は表 4-1 に示した。反応は、95 °C・2 分間の予備変性を行ったのち、95 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間のサイクルを 40 回繰り返した後、最終伸長反応を 72 °C で 5 分間行い、反応を終了した。PCR 増幅産物は 1.2% TAE-アガロースゲルにて展開した。

chSCFs を安定発現するフィーダー細胞の樹立

本実験では、ATCC より分与された BRL 細胞 (CRL-1442) をフィーダー細胞として使用した。BRL 細胞は、10% のウシ胎子血清 (FBS; Biosera、リングマー、イギリス) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ、アメリカ) にて

培養した。孵卵 19 日胚の卵巣より生成された cDNA を使用し、*chSCF1* (Accession No. DQ870920) および *chSCF2* (Accession No. DQ870921) の全長を RT-PCR によって取得した。この時に使用したプライマーの配列は表 4-1 に示した。そして、精製した増幅産物を pGEM-T-Easy ベクター (Promega、フィッチバーグ、ウィスコンシン、アメリカ) にそれぞれサブクローニングし、DNA 配列決定により *chSCF1* および *chSCF2* の配列が正しく挿入されているか確認した。続いて、*chSCF1* または *chSCF2* の配列を *piggyBac* トランスポゾンによる遺伝子導入用ベクターである PB530A-2 ベクター (System Biosciences、マウンテンビュー、カリフォルニア、アメリカ) に挿入した。このベクターは、EF1a プロモーター制御下に *chSCF1* または *chSCF2* を発現し、SV40 プロモーター制御下にネオマイシン耐性遺伝子 (*Neor*) を発現するように構築された。上記のベクターと *piggyBac* トランスポゼースがコードされたベクターを、Lipofectamine 2000 (Life Technologies、カールスバッド、カリフォルニア、アメリカ) を用いて BRL 細胞へと co-transfection した。トランスフェクション後、培養液を 0.5mg/mL の G-418 が含まれる 10% FBS-DMEM に置換し、2 週間以上の薬剤選択を行なった。

PGCs の培養

WL から得られた受精卵を 53-56 時間発生させ、HH13-15 の胚を得た。アセトン処理を行なったガラスマイクロピペットを用いて背側大動脈より PGCs が含まれる血液を採取し、PCR による性判別を行なった。雌雄判別が完了した血液を PGCs 増殖培地に混合し、予め BRL フィーダー細胞を準備した 48 ウェルプレートに播種した。PGCs 増殖培地は、KnockOut DMEM (KO-DMEM; Life Technologies) と BRL 細胞で馴化した KO-DMEM を半量ずつ含有した培養液を基礎培地として、これに 7.5% FBS ES-qualified (Life Technologies)、2.5% CS、1×Non-essential amino acid (Life Technologies)、1mM GlutaMAX (Life Technologies)、1mM ピルビン酸ナトリウム (Life Technologies)、1×Nucleosides (ミリポア、ビレリカ、マサチューセッツ、アメリカ)、0.5mM モノチオグリセロール (和光純薬工業、大阪、日本)、5ng/mL ヒト FGF2 (和光純薬工業) をそれぞれ添加して調整した。培地交換は 2 日ごとに半量ずつ

行い、継代は 7-10 日ごとに行なった。また、PGCs の増殖に応じて 6 ウェル組織培養プレートを上限として培養系をスケールアップした。

PGCs の増殖試験

おおよそ培養 100 日が経過して増殖能が安定した培養 PGCs 株を 1.0×10^4 個/mL の密度に調整し、5 μ g/mL のマイトマイシン C (和光純薬工業) 処理によって増殖を停止させた chSCF1-BRL 細胞、chSCF2-BRL 細胞あるいは無処置 BRL 細胞の上にそれぞれ播種した。この時、PGCs の培養液には 5ng/mL の FGF2 が含まれる PGCs 増殖培地を使用した。上記の条件で PGCs を 20 日間培養し、細胞数は 10 日ごとに計測した。また、chSCF1 または chSCF2 のみの効果が PGCs の増殖に十分かどうかを確かめるために、PGCs 増殖培地から FGF2 を除いた培養液を調整し、上記と同様の培養条件で使用した。さらに、chSCF による PGCs の増殖と PI3K/Akt シグナルの活性化との関連性を調べるために、chSCF 存在下において PI3K/Akt シグナルの阻害剤である LY294002 (Cayman Chemical、アナーバー、ミシガン、アメリカ) を最終濃度 10 μ M となるように PGCs 増殖培地へと添加し、PGCs の増殖能を調べた。

PCR による性判別

背側大動脈より採取した血液のうち、おおよそ 0.5 μ L を性判別用サンプルとして使用した。血液は、予め用意した DNA 抽出バッファー (100mM NaCl、50mM Tris-HCl、1mM EDTA、5mg/mL Proteinase K) に混合し、56 $^{\circ}$ C で 30 分間のインキュベーションを行なって DNA を粗抽出した。その後、95 $^{\circ}$ C で 5 分間の加熱を行なって Proteinase K を失活させたものを性判別用 DNA サンプルとした。そして、性判別用 DNA サンプルを 1 μ L、反応溶液の全量を 25 μ L として Quick Taq HS Dyemix (TOYOBO、大阪、日本) にて PCR を行なった。この時、W 染色体特異的配列および 18S リボソームを増幅するプライマーをそれぞれ使用した (Clinton ら 2001、表 4-1)。反応は、95 $^{\circ}$ C で 2 分間の予備変性を行った後、95 $^{\circ}$ C で 30 秒間、56 $^{\circ}$ C で 30 秒間、68 $^{\circ}$ C で 30 秒間のサイクルを 25 回繰り返して、反応を終了した。PCR 増幅産物は 1.2%

TAE-アガロースゲルにて展開し、416bp 付近に現れる W 染色体特異的増幅産物の有無により雌雄を判定した。

蛍光免疫染色

HH14 から得られた cPGCs を含む血液および培養 PGCs を PBS (-) に浮遊させ、MAS-GP コートスライドガラス (松浪硝子、大阪、日本) にマウントして素早く乾燥させた。再水和の後に 4% パラホルムアルデヒド-りん酸緩衝液 (ナカライテスク、京都、日本) を用いて室温にて 5 分間固定した。洗浄後、Image-iT signal enhancer (Life Technologies) をマウントして室温で 30 分間ブロッキングした。その後、一次抗体が含まれる 5%正常ヤギ血清-PBS (-) を細胞に滴下し、4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、PBS (-) にて 3 回洗浄し、二次抗体を含むブロッキング溶液と室温で 30 分間反応させた。洗浄後、1 μ g/mL の Hoechst 33342 (同仁化学、熊本、日本) で 5 分間の核染色を行い、カバーガラスをかけて封入した。蛍光画像は Eclipse E-1000 正立蛍光顕微鏡 (Nikon、東京、日本) によって取得した。取得した画像は、Adobe Photoshop Elements (Adobe Systems、サンノゼ、カリフォルニア、アメリカ) によって処理し、トリミングおよび蛍光画像の重ね合わせを行なった。

使用した抗体の種類、抗原動物、希釈倍率およびリソースを以下に列挙する。ラット抗ニワトリ vasa ホモログ抗血清 (CVH; 1:10000、Nakamura ら 2007 年)、マウス抗ニワトリ c-Kit 抗血清 (1:500、Southern Biotech、バーミングハム、アリゾナ、アメリカ)、ウサギ抗 Akt 抗血清 (1:200、Cell Signaling Technology、ダンバーズ、マサチューセッツ、アメリカ)、ウサギ抗 Phospho-Akt 抗血清 (1:200、Cell Signaling Technology)、マウス抗ステージ特異的胚性抗原-1 抗血清 (SSEA-1; 1:100、Developmental Studies Hybridoma Bank、アイオワシティ、アイオワ、アメリカ)、Alexa 488 標識ヤギ抗ラット IgG 抗血清 (1:1000、Life Technologies)、Alexa 594 標識ヤギ抗マウス IgM 抗血清 (1:1000、Life Technologies)、Alexa594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗血清 (1:1000、Life Technologies)。

ウェスタンブロッティング

培養 PGCs より Minute Total Protein Extraction Kit (Invent Biotechnology、エデン・プレイリー、ミネソタ、アメリカ) の取り扱い説明書に従い、変性条件下にて総タンパク質を抽出した。約 10 μ g の総タンパク質を 4-12% Bolt Bis-Tris Plus Gel (Life Technologies) にて展開し、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルク-PBST 中にて室温で 1 時間ブロッキングし、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) にて希釈した一次抗体溶液と共に 4 °C で一晩反応させた。一次抗体反応後、PBST で 3 回洗浄し、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で希釈した HRP 標識二次抗体と共に室温で 30 分間反応させた。メンブレンを PBST で 3 回洗浄し、イムノスターLD (和光純薬工業) またはイムノスターベーシック (和光純薬工業) によって化学発光を行い、X 線フィルム (GE Healthcare、リトル・チャルフォント、イギリス) に感光させた。

使用した抗体の種類、抗原動物、希釈倍率およびリソースを以下に列挙する。ウサギ抗 Akt 抗血清 (1:2,000、Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 Phospho-Akt Ser 473 抗血清 (pAkt; 1:2,000、Cell Signaling Technology)、マウス抗 γ -Tubulin 抗血清 (1:100,000、Sigma-Aldrich)、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗血清 (1:50,000、Cell Signaling Technology)、HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗血清 (1:50,000、Cell Signaling Technology)。

生殖系列キメラの作出と後代検定

培養 PGCs が正常な配偶子形成能を有するかどうか調べるために、培養 PGCs を用いて生殖系列キメラを作出した。HH14-16 に達した BPR 胚の背側大動脈に培養 PGCs を 1,000 個ずつ移植し、孵化するまで培養した。孵化したキメラ個体は人工授精によって BPR と交配し、孵化したヒナの羽装を判定した。ドナーである WL 由来培養 PGCs は優勢白色羽装の遺伝子型をホモで持ち (*II*)、レシピエントである BPR は劣勢ホモ型 (*i/i*) である。すなわち、白色のヒナ (*I/i*) が産まれた場合はドナーである培養 PGCs に由来する後代であることを示し、また黒色のヒナ (*i/i*) の場合はレシピエント由来の後代であることをそれぞれ示している。

統計解析

統計解析には、Microsoft Excel 2010 のアドインプログラムである Statcel 3 (Yanai 2010 年) または Statcel 4 (Yanai 2015 年) を使用した。各 chSCF アイソフォームが PGCs の増殖に与える影響または阻害剤 (LY294002) の投与が PGCs の増殖に与える影響の解析には一元配置分散分析を使用し、効果が有意であると判定された場合には Tukey's HSD によって多重比較分析を行なった。また、chSCF アイソフォームのみの増殖能を判定する実験では、培養 8 日目時点の PGCs 数をウェルチの t 検定によって比較した。全ての統計解析において、 $P < 0.05$ となった場合に有意であると判定した。データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。

4-3 結果

chSCF アイソフォームを安定発現するフィーダー細胞の解析

ニワトリ PGCs における chSCF の増殖効果を確かめるために、哺乳類における分泌型 SCF (SCF1) および膜結合型 SCF (SCF2) のオルソログである chSCF1 および chSCF2 を安定的に発現する BRL 細胞を樹立した。piggyBac トランスポゾンによって chSCF1 および chSCF2 の発現ベクター (図 4-2A) を BRL 細胞へと導入し、G-418 による薬剤選択を 2 週間以上行なった。薬剤選択後、5 回以上の継代を行なった BRL 細胞から Total RNA を抽出し、RT-PCR によって BRL 細胞における *chSCF1* および *chSCF2* の遺伝子発現を確認した。この時、chSCF のアイソフォームをそれぞれ識別可能なプライマー (表 4-1、図 4-1) を使用して、それぞれの増幅産物が得られるか否か判定した。その結果、それぞれの細胞において chSCF1 の増幅産物 (604bp) および chSCF2 の増幅産物 (502bp) が確認された (図 4-2B)。また、chSCF1/2 を導入していない無処置 BRL 細胞では、chSCF1 および chSCF2 の増幅産物は確認されなかった。したがって、chSCF1 および chSCF2 を安定発現する BRL 細胞 (chSCF1-BRL 細胞および chSCF2-BRL 細胞) が樹立されたと考えられた。これに加えて、chSCF1-BRL 細胞および chSCF2-BRL 細胞における *chSCF1* および *chSCF2* の遺伝子発現量は、継代を 20 回以上行なっても変化しないことを確認している。

cPGCs および培養 PGCs における c-Kit の発現

培養を行なっていない cPGCs および培養 PGCs が chSCF1 および chSCF2 を受容するか確認するために、chSCFs のレセプターである c-Kit の発現を蛍光免疫染色によって確認した。cPGCs および培養 PGCs において、生殖細胞特異的マーカータンパク質である CVH および c-Kit との共発現が確認された (図 4-3A, B)。CVH および c-Kit の共発現は免疫染色を行なった全ての細胞において観察されたことから、ニワトリにおける cPGCs および培養 PGCs は *in vivo*、*in vitro* において chSCFs を受容して増殖する可能性が示された。

PGCs における chSCF の増殖効果

WL 由来の培養 PGCs を 1.0×10^4 個/mL の密度に調整し、chSCF1-BRL・chSCF2-BRL あるいは無処置 BRL フィーダー細胞の上にそれぞれ播種し、20 日間の培養を行なった。培養 20 日目における PGCs 数は、chSCF1-BRL フィーダー細胞で $3.38 \pm 0.75 \times 10^5$ cells/mL、chSCF2-BRL フィーダー細胞で $1.06 \pm 0.35 \times 10^6$ cells/mL、無処置 BRL フィーダー細胞で $1.81 \pm 0.83 \times 10^5$ cells/mL であり、chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養した PGCs が有意に増殖した ($P < 0.05$ 、図 4-4A)。このことから、chSCF2-BRL フィーダー細胞は chSCF1-BRL 細胞の平均約 3 倍以上、無処置 BRL フィーダー細胞の平均約 5 倍以上の PGCs 増殖効果を示すことが明らかとなった。続いて、chSCF1-BRL 細胞または chSCF2-BRL 細胞の単独使用が *in vitro* における PGCs の増殖に十分かどうか解析するために、FGF2 を含有しない培養液を使用して PGCs を培養した。その結果、FGF2 を添加しない培養液では、いずれのフィーダー細胞も PGCs の増殖効果を改善せず、培養 8 日目における PGCs 数は FGF2 を含有する培養液で培養したグループに比べて有意に少なかった ($P < 0.05$ 、図 4-4B)。このことから、chSCFs のみでは PGCs の増殖効果を持たず、chSCFs が増殖効果を発揮するためには FGF2 の添加が必須であることが示された。

chSCF を用いて培養された PGCs の特徴解析

chSCF1 および chSCF2 によって増殖した PGCs の形態的特徴には通常の培養 PGCs と比べて大きな変化が見られず、いずれの PGCs も *in vivo* の cPGCs に近似な形態、すなわち球状の浮遊型細胞で細胞質内に大型の核および多量の脂肪滴を含有するなどの特徴を示した (図 4-5A)。加えて、全ての培養 PGCs はマウス PGCs に見られるような EG 細胞様のコロニーを形成しなかった。

chSCF2-BRL 細胞上で大量増殖した PGCs において、生殖細胞特異的タンパク質である CVH 抗体および未分化型細胞に発現する糖タンパク質である SSEA-1 抗体による蛍光免疫染色を行なった。培養 PGCs は CVH を細胞質内に、SSEA-1 を細胞表面に発現しており、未分化型

生殖細胞としての特徴を維持しながら増殖していることが示された (図 4-5B)

chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs における Akt のリン酸化状態

続いて、chSCF2 がどのようにして PGCs を増殖させているか調べるために、chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養した PGCs において免疫染色ならびに Western Blotting により Akt および pAkt の発現を解析した。免疫染色の結果、chSCF2 の有無に関わらず Akt の発現が観察され、また chSCF2-BRL 細胞上で培養した PGCs では pAkt が細胞質内に散在することが示された (図 4-7)。一方、無処置 BRL 細胞で培養された PGCs では pAkt の発現が弱い傾向が見られた。Western Blotting の結果、Akt および pAkt に由来するバンドが 60kDa 付近に観察され、免疫染色と同様に chSCF2-BRL 細胞上で培養された PGCs で Akt のリン酸化が亢進していた (図 4-7)。また、PI3K/Akt シグナルの阻害剤である LY294002 を使用した場合、PGCs の増殖率が顕著に低下し ($P < 0.05$ 、図 4-8A)、さらに Akt のリン酸化状態が抑制されることも明らかとなった (図 4-8B)。

chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs の配偶子形成能

chSCF2-BRL フィーダー細胞によって大量増殖させた PGCs が宿主胚内で配偶子形成を行なうかどうか調べるために、1,000 個の培養 PGCs を HH14-16 の BPR 胚に移植して生殖系列キメラニワトリを作出した。9 の操作胚に対し、孵化した生殖系列キメラニワトリは合計 4 個体であり、そのうち 3 個体 (雄 : 2 羽、雌 : 1 羽) が性成熟まで成長したため (表 4-2)、後代検定によりドナー由来の配偶子形成が起こっているかどうかを確認した。ただし、ドナーである培養 PGCs は雄胚に由来する細胞であるため、ドナー PGCs と異なる性別の宿主ではドナー PGCs が配偶子分化を正常に完遂しないとする Tagami ら (1997 年、2007 年) の報告に基づき、雌のキメラニワトリにおける後代検定は行なわなかった。後代検定の結果、一羽のキメラニワトリ (ID : 121) より 2 羽 (2/32) のドナー由来後代 (*I/i*) を得ることができ、この後代は正常に孵化、成長した (表 4-3、図 4-9)。

4-4 考察

本研究では、chSCF1 および chSCF2 を安定発現する BRL 細胞をフィーダー細胞として用いることによってニワトリ PGCs における chSCF の増殖効果を検証し、chSCF2-BRL 細胞が PGCs の増殖を最も強く支持することを初めて明らかにした。また、chSCF2 は PI3K/Akt シグナルの活性化を介して PGCs を増殖させている可能性があること、chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs は正常な配偶子へと分化できることを明らかにした。これら一連の結果は、ニワトリ PGCs の増殖に chSCF2 が有効であることを示すのみならず、ニワトリ PGCs の増殖機構を明らかにする上で重要な知見を提供するものである。

4-1 chSCF の増殖効果

SCF は *Sf* locus にコードされる c-Kit のリガンドであり、生体内において多彩な役割を持つ。また、SCF/c-Kit の相互作用はマウス PGCs の *in vitro* における増殖と生存（抗アポトーシス）に重要である（Dolci ら 1991 年、Matsui ら 1991 年、1992 年、De Felici ら 1992 年）。SCF アイソフォームのうち SCF1 は、*in vitro* におけるマウス PGCs の生存のみに対して選択的な役割を持ち、増殖には関与していないことが知られている（Dolci ら 1991 年）。一方で、SCF2 はマウス PGCs の増殖および生存に関与しており、SCF2 を発現するフィーダー細胞の使用は *in vitro* におけるマウス PGCs の長期培養に有効であることが知られている（Dolci ら 1991 年、Matsui ら 1992 年）。ニワトリでは、chSCF は ES 細胞の増殖（Pain ら 1996 年）、神経細胞の増殖（D'Costa ら 2000 年）、骨芽細胞の増殖と分化（van't Hof ら 1997 年）、血球芽細胞の増殖と分化（Hayman ら 1993 年、Bartůněk ら 1996 年）などに重要な役割を果たすことが知られていた。しかしながら、ニワトリ PGCs の増殖に及ぼす SCF の機能は明らかにされてこなかった。筆者は、本章並びに第 3 章において、chSCF のレセプターである c-Kit が cPGCs および培養 PGCs において発現することを明らかにした。このことはニワトリ PGCs の増殖が、*in vivo* および *in vitro* において chSCF の影響を受けている可能性を示唆している。そこで、chSCF1 お

よび chSCF2 を安定発現する BRL 細胞をフィーダー細胞として使用することにより、培養 PGCs におけるそれぞれの chSCF アイソフォームの増殖効果を検証した。その結果、chSCF2-BRL フィーダー細胞を使用した場合に PGCs の増殖能が最も高くなることを見出し、培養 20 日目における PGCs の増殖率は chSCF1-BRL フィーダー細胞の約 3 倍、無処置 BRL フィーダー細胞の約 5 倍であった。また、有意差は見られなかったものの、chSCF1-BRL フィーダー細胞も同様に PGCs の増殖率を無処置 BRL フィーダー細胞の 2 倍以上改善していた。一連の結果は、chSCF アイソフォームがニワトリ PGCs の増殖に対して効果的であり、特に chSCF2 はその効果が高いことを示している。しかしながら、chSCF1 と chSCF2 との間に PGCs 増殖効果の差異が生じた原因については、残念ながら根拠となるデータを得られていないため、詳細は不明である。Miyazawa ら (1995 年) は、ヒト造血因子依存性白血病細胞株 (MO7e 細胞) を用いた実験において、SCF2 は SCF1 よりも c-Kit のチロシンキナーゼ活性を長時間 (SCF1 の 3 倍以上) にわたって維持することを報告している。恐らく、chSCF2 もまたこのような機構によって PGCs の細胞質内における c-Kit により惹起される増殖 (補助) シグナルの持続時間を chSCF1 よりも延長したことで PGCs の増殖効率を改善したのかもしれない。

続いて、FGF2 非存在下において chSCF1 および chSCF2 の増殖効果を検証したところ、興味深いことにいずれの chSCF アイソフォームも PGCs の増殖効果を示さなかった。この結果は、chSCF 単独では PGCs の増殖効果を持たないことを意味しているのみならず、chSCF が増殖効果を発揮するためには FGF2 の存在が不可欠であることを示している。すなわち、chSCF アイソフォーム (特に chSCF2) は、FGF2 の co-factor であることが示唆される。したがって、chSCF2 は FGF2 (あるいはその下流シグナル分子) との相互作用によって PGCs の増殖に役割を果たしていると考えられる。

ニワトリ PGCs の培養に関する先行研究では、大腸菌で発現させた chSCF1 を PGCs の培養に使用した例も存在する。しかし、chSCF1 はその他のサイトカインに比べて PGCs の増殖を改善しなかった (Yang と Fujihara, 1999 年-b, Karagenc と Petite 2000 年)。また、いずれの研究でも chSCF2 については考慮されておらず、FGF2 をはじめとするその他のサイトカイン

類との比較はほとんど行なわれてこなかった。上述したように、筆者のデータでは chSCF2 が PGCs の *in vitro* での増殖効率を大きく改善し、またその増殖促進効果は FGF2 との協調によって発現する可能性を示唆している。したがって、本研究はニワトリ PGCs における chSCFs の増殖効果を検証した初めての例であるといえる。

4-2 ニワトリ PGCs における chSCF2 の作用メカニズム

上述したように、SCF はマウス PGCs の PI3K/Akt シグナルを活性化することによってマウス PGCs の増殖、生存(抗アポトーシス)、EG 細胞形成に貢献すると考えられている (De Miguel ら 2002 年、Farini ら 2007 年、Kimura ら 2008 年、Matsui ら 2014 年)。ニワトリ PGCs では、FGF2 によって活性化される MEK/ERK の他、PI3K/Akt シグナルもまた PGCs の増殖に重要であることが報告されている (Macdonald ら 2010 年)。加えて、FGF2 の有無は Akt のリン酸化レベルに影響しないことから、FGF2 は PI3K/Akt シグナルに影響を与えていないことが示唆される (Choi ら 2010 年)。そこで筆者は、chSCF2 が PGCs を増殖させるにあたって PI3K/Akt シグナルを活性化させているかもしれないと考えた。免疫染色および Western Blotting の結果は、chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養し PGCs において Akt のリン酸化状態が亢進していることを示している。また、PI3K 依存的 Akt リン酸化を阻害する LY294002 を培養系に添加すると、chSCF2 存在下であっても PGCs の増殖効率が大幅に低下し、Akt のリン酸化状態も抑制される傾向にあった。これらの結果は、chSCF2 は PI3K/Akt シグナルを活性化することによりニワトリ PGCs の増殖に役割を果たしていることを示唆している。

4-3 chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs の特徴および配偶子形成能

前項の結果より、chSCF2 はニワトリ PGCs において PI3K/Akt シグナルの活性化を誘導する可能性が示唆された。この結果から、ニワトリ PGCs もマウス PGCs 同様に EG 細胞形成を起こすことが予想されるが、いずれの chSCF アイソフォームも PGCs の形態的特徴に大きな影響を与えず、EG 細胞様のコロニーは出現しなかった。また、chSCF2-BRL フィーダー細胞

上で大量増殖した PGCs において、生殖細胞特異的マーカータンパク質である CVH および未分化型細胞に発現する糖タンパク質である SSEA-1 の共発現が確認されたことから、chSCF2 はニワトリ PGCs を未分化型生殖細胞としての特徴を保持しつつ増殖させていることが示された。

続いて、chSCF2 の効果によって大量増殖した PGCs が配偶子形成を正常に行うか否か、生殖系列キメラの後代検定によって検証した。その結果、培養 PGCs に由来する白色の後代 (*I/i*) を得ることができた。このことは chSCF2-BRL フィーダー細胞上で増殖した PGCs が通常の PGCs と同様に機能的な精子へと分化したことを示唆している。筆者らを含めた一部の研究では、培養 PGCs は長期培養中に未分化性や生殖巣予定領域への移動能、さらには配偶子形成能を低下または喪失してしまうことが報告されているが (Yang と Fujihara 1999 年-a、Naito ら 2010 年、Naito ら 2012 年、Miyahara ら 2014 年)、本研究における chSCF2-BRL 細胞を用いた培養系では少なくとも PGCs の配偶子形成能に影響を及ぼさないことが示された。

4-5 表

表 4-1 実験に使用したプライマーセット

Gene	Sequence	Annealing temp.	Product size (bp)	NCBI accession No. or Ref.
<i>chSCF cloning F</i>	TTCCTTATGAAGAAGGCACAAACT	61°C	864 / 762	DQ870920 / DQ870921
<i>chSCF cloning R</i>	CAGCTACACTTGTAGATGTTCTTT			
<i>chSCF F</i>	GTCAAAGCCCAGAGTTCCTG	55°C	604 / 502	DQ870920 / DQ870921
<i>chSCF R</i>	GGCTGGAGCTGCTAATGAAG			
<i>Rat GAPDH F</i>	CAGGGCTGCCTTCTCTTGTG	55°C	503	NM_017008
<i>Rat GAPDH R</i>	ACCAGTGGATGCAGGGATGA			
<i>WCS F</i>	CCCAAATATAACACGCTTCACT	56°C	416	Clinton <i>et al.</i> , 2001
<i>WCS R</i>	GAAATGAATTATTTCTGGCGAC			
<i>RGS F</i>	AGCTCTTCTCGATTCCGTG		256	
<i>RGS R</i>	GGGTAGACACAAGCTGAGCC			

表 4-2 操作胚の孵化率および性成熟に達した羽数

Days of PGCs Culture	Number of		
	Manipulated embryos	Hatched chicks	Sexually mature (Male / Female)
124	3	1	1 (0/1)
131	6	3	2 (2/0)

表 4-3 後代検定の結果

ID	Eggs set	No. of hatched chicks	No. of recipient PGC-derived chicks (<i>i/i</i>)	No. of cultured PGC-derived chicks (<i>I/i</i>)	% of cultured PGC-derived chicks
103	32	29	29	0	0
121	65	32	30	2	6.25
Total	97	61	59	2	3.39

4-6 図

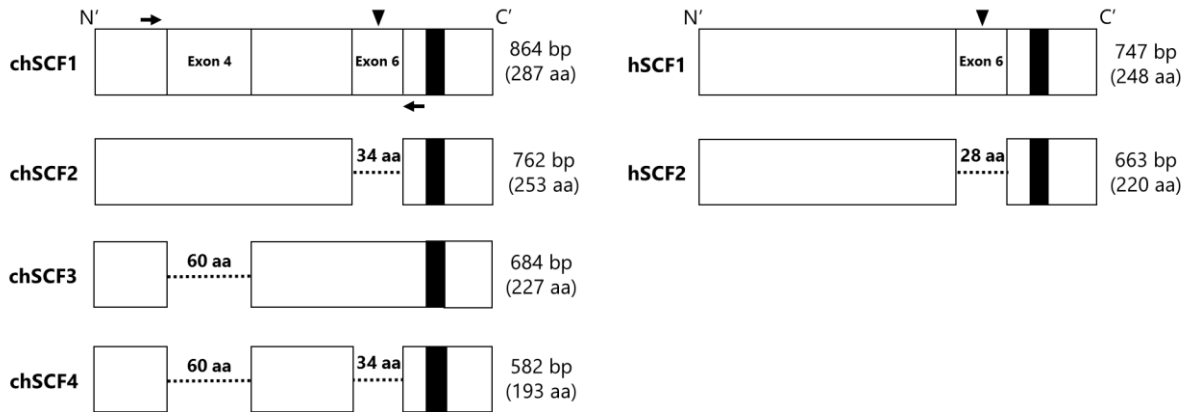


図 4-1 chSCF およびヒト SCF アイソフォームの模式図

左側のカラムに chSCF1-4、右側のカラムにヒト SCF の cDNA 全長およびアミノ酸全長を示す。各アイソフォーム間の点線は欠損している領域を示し、3' (C') 側の黒く塗りつぶした部分は細胞膜通過ドメインをそれぞれ示している。エクソン 6 領域にある矢頭はタンパク質切断サイトを示し、chSCF1 の 5' (N') 側および 3' (C') 側の矢印は図 4-2B で使用された各 chSCF バリエントを識別するプライマーの設計位置を示している。

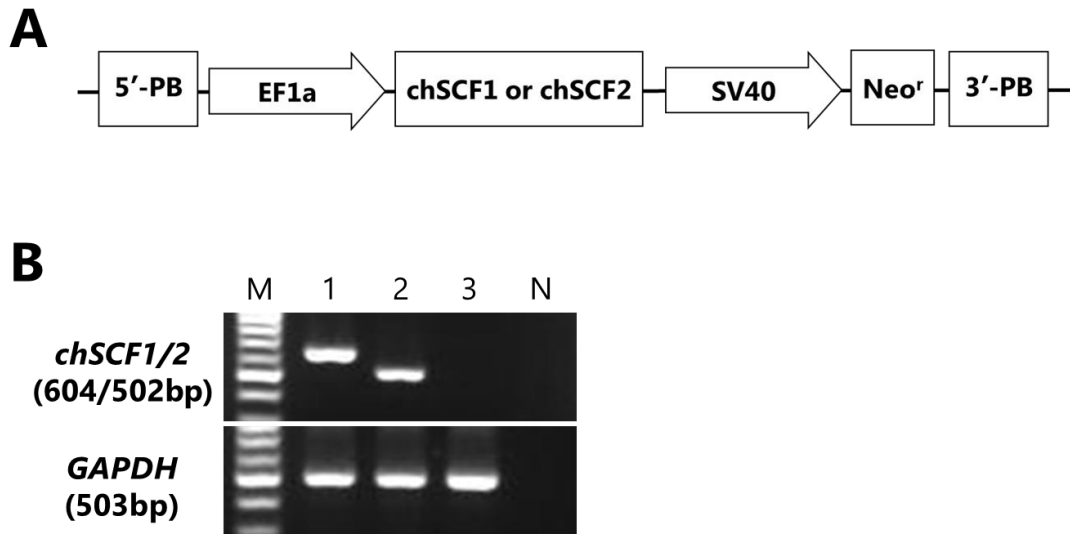


図 4-2 chSCF 発現ベクターの構造と chSCF アイソフォームを発現する BRL 細胞の解析

A) BRL 細胞への遺伝子導入に使用した chSCF1 または chSCF2 を発現するベクターの構造を示す。5'-PB および 3'-PB : *piggyBac* エlementを示す。*piggyBac* トランスポゼースはこの Element に挟まれた部分を認識してベクターより切り出し、導入された細胞の染色体へと組み込む。EF1a : EF1a プロモーターを示す。SV40 : SV40 プロモーターを示す。Neo^r : ネオマイシン耐性遺伝子を示す。B) 上記のベクターを導入後に 0.5mg/mL の G-418 を含む増殖培地にて 2 週間以上の薬剤選択を行い、薬剤選択終了後に 5 回の継代を行なった chSCF1-BRL および chSCF2-BRL 細胞における chSCF アイソフォームの遺伝子発現解析結果を示す (RT-PCR)。chSCF1 に由来するバンドは 604bp、chSCF2 に由来するバンドは 502bp 付近、ラットの GAPDH に由来するバンドは 502bp 付近にそれぞれ現れる。M : 100bp DNA サイズマーカーを示す。濃いバンドが 500bp を表している。1:chSCF1-BRL 細胞の cDNA を示す。2:chSCF2-BRL 細胞の cDNA を示す。3 : 遺伝子導入を行っていない正常 BRL 細胞の cDNA を示す。BRL 細胞はラットの SCF を発現するが、chSCFs を発現していない。N : cDNA の代わりに Nuclease-Free 水を用いて同様に PCR を行なった陰性コントロールを示す。

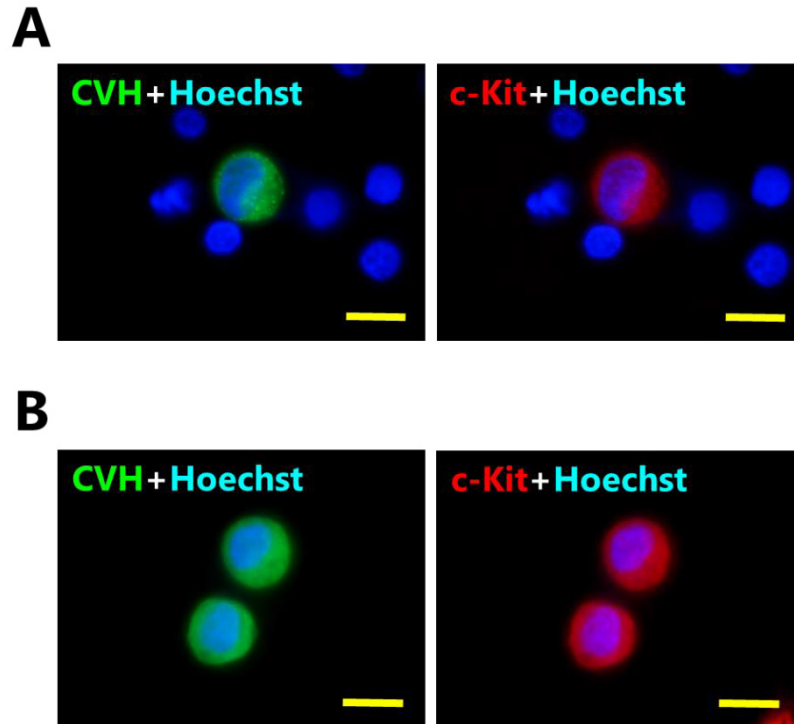


図 4-3 cPGCs および培養 PGCs における c-Kit の発現

HH14 胚の血液から得られた cPGCs および培養 PGCs における生殖細胞特異的マーカータンパク質である CVH および chSCF のレセプターである c-Kit の蛍光免疫染色。CVH は細胞質内、c-Kit は細胞質および細胞膜上に発現している。A) cPGCs における CVH および c-Kit の蛍光免疫染色を示す。CVH 陰性の細胞は血球細胞を示しており、血球細胞では c-Kit も陰性である。B) 培養 PGCs における CVH および c-Kit の蛍光免疫染色の結果を示す。スケールバーは全て 10 μ m を示す。

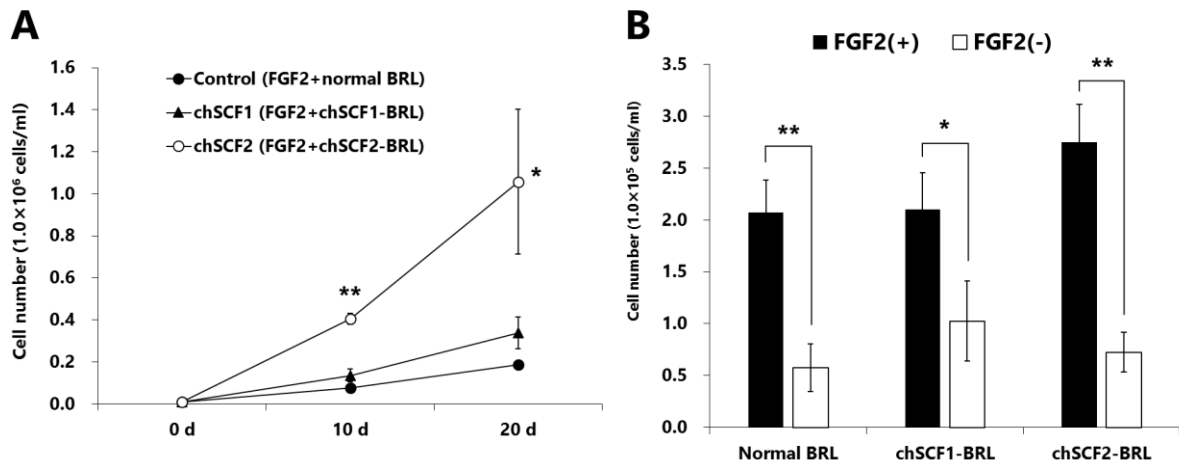


図 4-4 chSCF アイソフォームの増殖効果

A) WL の雄に由来する培養 PGCs を 1.0×10^4 個/mL に調整し、chSCF1-BRL フィーダー細胞、chCF2-BRL フィーダー細胞、正常 BRL 上で 20 日間培養した際の増殖曲線。Tukey's HSD による統計的有意水準は、* : $P < 0.05$ または ** : $P < 0.01$ として示した。また、数値は全て平均値 \pm 標準誤差で示した ($n=4$)。B) FGF2 非存在下において、上記と同様の条件で 8 日間の培養を行なった PGCs 数を示す。ウェルチの t 検定による統計的有意水準は、* : $P < 0.05$ または ** : $P < 0.01$ として示した。また、数値は全て平均値 \pm 標準誤差で示した ($n=4$)。

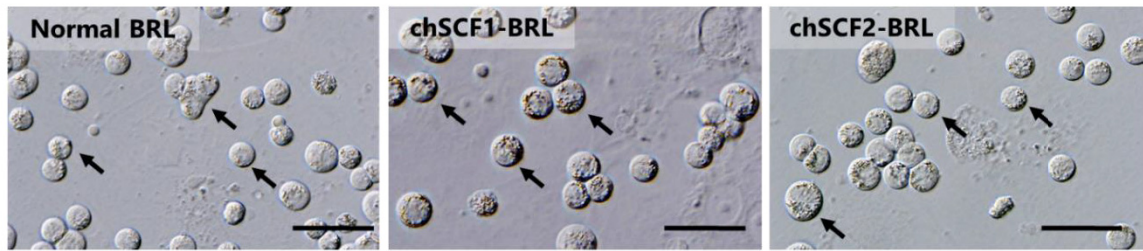
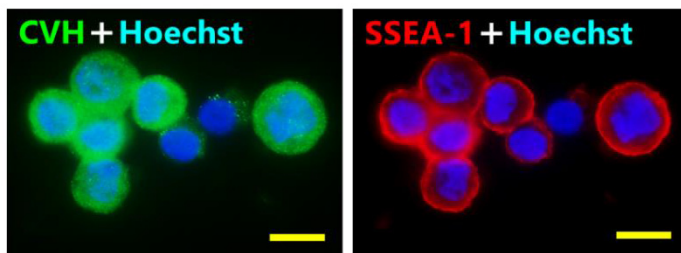
A**B**

図 4-5 培養 PGCs の特徴解析

各種培養条件下における PGCs の形態的特徴および蛍光免疫染色による特徴解析の結果を示す。A) 各種培養条件下において培養中の PGCs の微分干渉像。それぞれのパネル上の矢印は典型的な培養 PGCs を示す。培養 PGCs は、円形で浮遊ないし弱接着性を呈し、細胞質内に大型の核および多数の脂肪滴を持っていた。PGCs の後部に見える接着細胞は各種フィーダー細胞。スケールバーはそれぞれ 50 μ m を示す。B) chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs の蛍光免疫染色像。生殖細胞特異的タンパク質である CVH (緑色) は細胞質内に、未分化型細胞に発現する糖タンパク質である SSEA-1 (赤色) は細胞膜上にそれぞれ発現している。スケールバーはそれぞれ 10 μ m を示す。

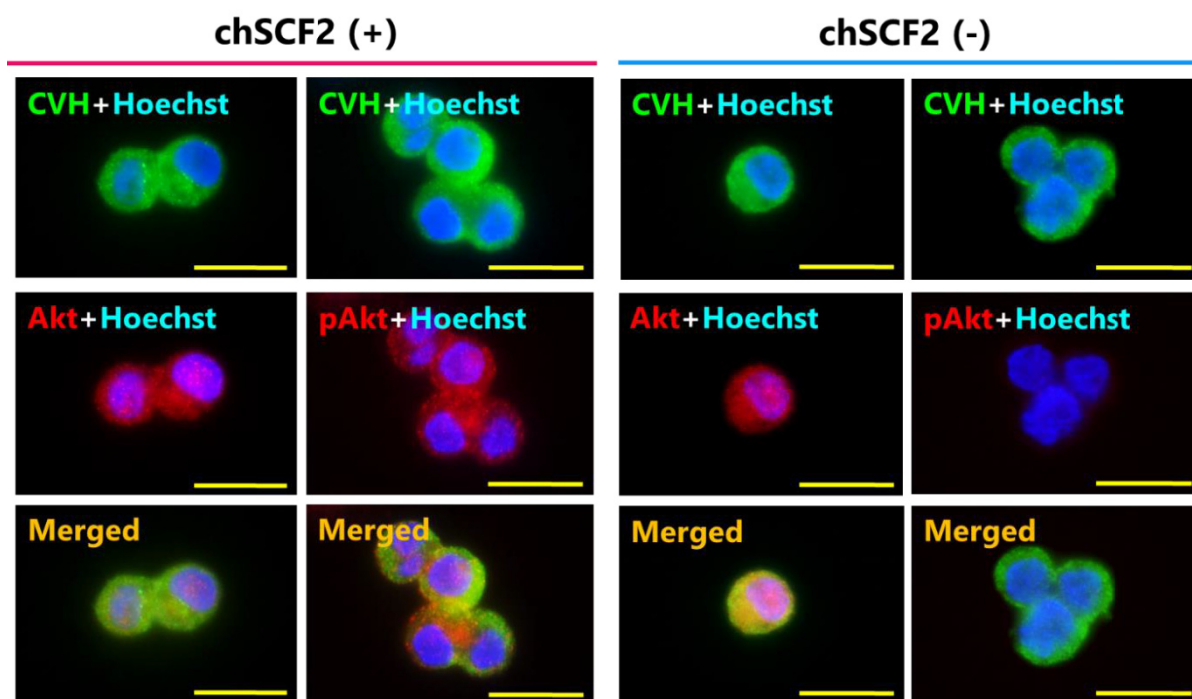


図 4-6 chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養した PGCs における Akt および pAkt の発現

chSCF2-BRL フィーダー細胞または無処置 BRL フィーダー細胞の上で培養した PGCs において、生殖細胞特異的タンパク質である CVH との二重蛍光免疫染色により Akt および pAkt の発現を検出した。CVH は細胞質内、Akt および pAkt も細胞質内に広く分散して存在する。

A) chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養した PGCs における Akt および pAkt の発現パターンを示す。B) 無処置 BRL フィーダー細胞上 (chSCF2 (-)) で培養された PGCs における Akt および pAkt の発現パターンを示す。スケールバーは全て 20 μ m を示す。

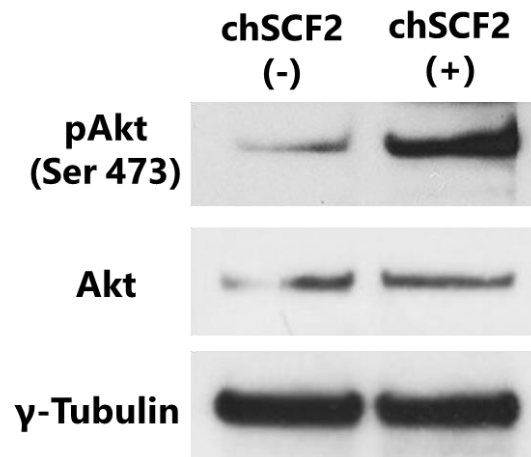


図 4-7 chSCF2 による Akt のリン酸化

無処置 BRL フィーダー細胞上または chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs において、Western Blotting により Akt のリン酸化状態を解析した結果を示す。Akt および pAkt は 60kDa 付近にバンドが出現し、 γ -tubulin は 48kDa 付近にバンドが出現する。chSCF2 (-) : 正常 BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs を示す。chSCF2 (+) : chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs を示す。

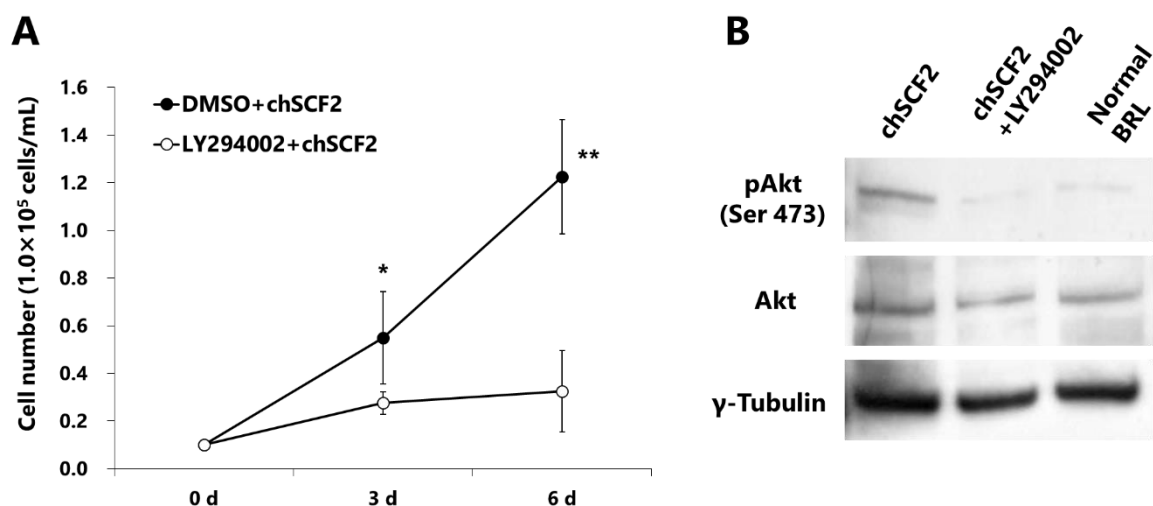


図 4-8 LY204002 による PI3K/Akt シグナルの阻害

PI3K 依存的な Akt のリン酸化を阻害する LY294002 を DMSO によって溶解し、最終濃度 $10\mu\text{M}$ となるように PGCs の培養系 (培養液に FGF2 を含む) へと投与した。A) 培養 PGCs を 1.0×10^4 個/mL に調整し、chSCF2-BRL フィーダー細胞上で 6 日間の培養を行なった。Tukey's HSD による統計的有意水準は、* : $P < 0.05$ または ** : $P < 0.01$ として示した。また、数値は全て平均値 \pm 標準誤差で示した ($n=4$)。B) LY294002 によって PI3K/Akt シグナルを阻害した PGCs における Akt のリン酸化状態を Western Blotting により解析した結果を示す。Akt および pAkt は 60kDa 付近にバンドが出現し、 γ -tubulin は 48kDa 付近にバンドが出現する。chSCF2 : chSCF2-BRL フィーダー細胞上で FGF2 を含有する培養液を用いて培養された PGCs を示す。chSCF2+LY294002 : 上記の培養条件に、最終濃度 $10\mu\text{M}$ の LY294002 を添加して培養された PGCs を示す。Normal BRL : 正常 BRL フィーダー細胞上で FGF2 を含有する培養液を用いて培養された PGCs を示す。



図 4-9 chSCF2-BRL フィーダー細胞上で培養された PGCs の後代

chSCF2-BRL フィーダー細胞上で大量増殖した WL の雄に由来する PGCs (I/I) を BPR (i/i) 胚に 1,000 個移植して生殖系列キメラを作出し、キメラ個体と雌 BPR との交配によってドナー PGCs 由来の配偶子形成が起こるかどうか解析した。白色の後代 (I/i) はドナーである培養 PGCs 由来の後代を示し、黒色の後代 (i/i) は宿主である BPR 由来の後代を示す。

第5章 総合考察

本研究では、これまで好適な培養条件が明らかでなかったニワトリ PGCs の好適な培養系を開発することにより、増殖能が最も高く、かつ正常な PGCs と同様に生殖巣への移動能および配偶子形成能を維持するような PGCs 長期培養系を提案することができた。すなわち、ニワトリ PGCs の増殖を支持する因子として FGF2 および chSCF2 が有効であること、また chSCF2 の増殖効果は FGF2 との協調関係にあることを初めて明らかにした。本研究の成果により、ニワトリ PGCs を培養するための最適な条件は、FGF2 を含む培養液および chSCF2-BRL 細胞をフィーダーとして使用することであると結論付けられた。

本稿の随所で述べたとおり、ニワトリ PGCs の効率的な増殖を促す培養系を開発することは、PGCs 数の少ない希少な家禽および野性鳥類等における遺伝資源の利用性および保存性を高めるとともに、PGCs の遺伝子改変ならびに遺伝子改変された PGCs の *in vitro* スクリーニングを行なう際に有用である。本研究では、ニワトリの cPGCs をモデルとして、鳥類初期発生胚から得られる生殖細胞の培養技術の改良に取り組んだ。ニワトリ cPGCs は、GGCs に比べて採取できる数が少ないという欠点はあるものの、PGCs そのものを純化しやすいことや、宿主胚に移植した場合には確実に配偶子形成を行なうという特徴を持つことから、培養細胞の性質評価が比較的容易であるという利点がある。

van de Lavoie ら（2006 年）によってニワトリ PGCs の長期培養系が樹立されてから、ニワトリ PGCs の培養技術開発に関する研究は急速に進展した。これにより、ニワトリ PGCs の増殖に必要なフィーダー細胞やサイトカインなどが、徐々にではあるが明らかにされてきた。しかしながら、それぞれの研究で異なる培養系が使用されていることや、PGCs の採取ステージが異なることなど、均一な培養条件下でそれぞれの因子が PGCs の増殖に与える影響を検証した報告は存在しない。すなわち、どのような培養条件が PGCs の増殖に適しているか不

明であった。また、仮に新規の培養系を樹立したとしても、それが既存の培養系に比して優れているのか劣っているのかを明確に判断する基準が存在しないために、PGCs の培養を行なうにあたってそれぞれの研究グループで独自の培養系を構築することが必要であった。このことは、PGCs 培養技術を一層煩雑化させ、結果的に PGCs 培養技術の汎用性を大きく押し下げている主要因であると考えられる。したがって、少なくとも PGCs の増殖性を指標とした培養系の最適化と標準化が急務であり、実験的な再現性を保障することはもとより、現時点において PGCs の増殖率が最大となる培養系の開発を行なうことが求められてきた。

培養 PGCs の増殖率が最大となる培養系を検証するためには、それぞれのフィーダー細胞やサイトカインの PGCs 増殖効果を同一培養条件下において検証することが必要である。本研究におけるフィーダー細胞および添加サイトカインの比較検討により、ニワトリ PGCs の培養を行なうに当たっては BRL 細胞をフィーダーとして、FGF2 を添加した培養液を使用することで、PGCs の増殖効率が最大となることが明らかとなった。これらの結果は、BRL 細胞をフィーダーとすることで PGCs を培養できるとする van de Lavoie ら（2006 年）の結果、および FGF2 が PGCs の増殖を促進する主要な因子であるとする Choi ら（2010 年）の結果を支持することとなった。とはいえ、本研究において各種フィーダー細胞および増殖因子が PGCs に与える影響を同時に検証したことによって PGCs の培養に最適な条件を見出したことは、今後の PGCs 培養系の改良のために有用と考えられる。なぜならば、本研究によって最適化された培養条件を元にしてニワトリ PGCs の培養系をさらに改良することや、細胞の性質が均質化された培養 PGCs 株を使用することによって安定的かつ再現性の高い実験などが実現可能となるからである。加えて、上記の培養系は PGCs が受精可能な精子を形成する能力を培養 200 日以上にわたって維持できることも分かった。とはいえ、得られた後代が全て死亡していた原因が長期培養のストレスによるものなのか、変質した PGCs が優先的に培養されたことによるものなのかは、現時点では不明である。したがって、PGCs の正常性を維持するために必要な培養系の改良と同時に、受精および正常な個体発生が可能な配偶子を形成する

能力を持った PGCs の特徴解析なども今後行なっていく必要がある。

上述したとおり、PGCs の培養系が最適化・標準化されたことで、その培養系に基づいて PGCs の培養系の改良および培養条件の比較検討を行なうことが可能となった。筆者のものを含めたこれまでの PGCs 培養系は、増殖効率が低いこと、また培養系によっては生殖巣への移動能や配偶子分化能等に代表される PGCs としての特徴を喪失してしまうことが大きな課題であった。すなわち、PGCs を単に増殖させるだけではなく、PGCs としての特徴（生殖系列の基幹となる細胞性状）を維持させつつ大量増殖させる培養系の開発が必要である。したがって、筆者は培養系の更なる改良を企図して、FGF2 以外の PGCs 増殖因子の候補である chSCF の増殖効果を調べた。chSCF1 および chSCF2 は、いずれのアイソフォームもニワトリ PGCs の *in vitro* における増殖を支持し、特に chSCF2 は従来の培養系に比して PGCs の増殖効率を大幅（培養 20 日で 5 倍以上）に高めることが明らかとなった。chSCF2 の作用によって増殖した PGCs は長期間に渡って受精可能な配偶子を形成する能力を維持していたことから、chSCF2 の効果は PGCs の配偶子形成能に悪影響を与えていないと考えられる。

本研究ではまた、chSCF2 の効果によって増殖した PGCs において PI3K/Akt シグナル経路が活性化していることを示し、またその増殖効果は PI3K/Akt シグナルの阻害剤である LY294002 によって顕著に抑制されることを示した。Macdonald ら（2010 年）は、PGCs の培養系に LY294002 を投与することによって PGCs の増殖停止およびアポトーシスが誘導されることを示した。これらの結果は、chSCFs が PI3K/Akt シグナルを介して PGCs の増殖および生存に役割を果たす因子の一つであることを示唆しており、その効果は chSCF2 において顕著であることが推察される。

本研究および先行研究によって得られた成果を総合すると、ニワトリ PGCs の増殖には FGF2 による MEK/ERK 経路の活性化、および chSCF2 による PI3K/Akt 経路の活性化が重要と考えられる。すなわち、配偶子形成能を維持した状態で PGCs を維持できる培養系を構築するためには、少なくとも上記 2 つのシグナル経路を活性化することが必要であることが示

された。

Karagenc と Petite (2000 年) は、胚盤葉由来 PGCs を培養する際に chSCF1 を添加することにより、PGCs の生存率を 10-20%改善できることを報告している。しかし、chSCF1 の添加はニワトリ PGCs の増殖能を十分に改善するに至っていなかった。また、Yang と Fujihara (1999 年-a, b) による報告においてもまた、chSCF1 を培養系に添加しても cPGCs の増殖性は従来の報告に比して大きく変化しないことが示された。これらの研究結果から、chSCF1 は PGCs の増殖に関与しないことが示唆される。その一方で、本研究における検証では chSCF1 は chSCF2 に比して効果が低いものの、PGCs の増殖を平均 2 倍以上改善できることを示している。しかし、FGF2 非存在下では chSCF1 および chSCF2 とともに PGCs の増殖効率を改善しなかったことから、chSCFs は FGF2 の co-factor であることが強く示唆される。これは、ニワトリ PGCs における chSCFs の増殖効果を検証する上での重大な発見である。なぜなら、これまでの研究では chSCF1 の単独投与のみが行なわれており、FGF2 をはじめとしたその他の増殖因子との組み合わせや、それらの因子が相互作用する可能性などについては全く検証されてこなかったからである。したがって、本研究は chSCFs の真の増殖効果を検証した初めての報告といえる。また、chSCF1 および chSCF2 と相互作用する FGF2 の下流分子の探索を進めることにより、ニワトリ PGCs の増殖メカニズムのさらなる理解にもつながると思われる。

マウス PGCs を *in vitro* 培養系で維持・増殖させるためには、PGCs を EG 細胞へと変化させる必要がある。EG 細胞は、マウス ES 細胞に近似なドーム状のコロニーを形成しながら増殖し、胚盤胞へ移植することにより生殖系列を含めたあらゆる細胞系譜におけるキメラ形成能を有する多能性細胞の一種として知られている (Matsui ら 1991 年、1992 年)。マウス PGCs は、その発生分化過程で全ゲノムの 98%以上にも及ぶ大規模な脱メチル化を引き起こすことが知られており、EG 細胞はこの時期の PGCs から樹立される。すなわち、全ゲノム中のメチル化が低頻度な状態にあるマウス PGCs は、特殊な培養条件下においては多能性細胞へと転

換しうる「潜在的な多能性」を有していると考えられている（Yabuta ら 2006 年、Kurimoto ら 2008 年）。第 4 章で述べたとおり、マウス EG 細胞の形成には SCF による Akt の活性化が必要である（Kimura ら 2008 年、Matsui ら 2014 年）。同時に、マウス EG 細胞は FGF2 および LIF による増殖および分化の抑制が必須である（Matsui ら 1992 年）。すなわち、マウス EG 細胞は FGF2、SCF、LIF に依存した形成、増殖および生存メカニズムを持つと考えられる（Matsui ら 1990 年、1992 年、De Miguel ら 2002 年、Farini ら 2007 年）。

ニワトリの PGCs は、現時点で FGF2 および chSCFs（特に chSCF2）依存性の増殖を行なうことが示されている。マウスと同様にニワトリの培養 PGCs においても、生殖系列のみならず体細胞系譜にも寄与できる能力を持った EG 様細胞が偶発的に出現する（Park と Han、2000 年、Park ら 2003 年、van de Lavoie ら 2006 年）。しかしながら、ニワトリの培養 PGCs における EG 様細胞の出現メカニズムは分かっておらず、ほとんどの場合は EG 様のコロニーを作ることなく増殖する。上述の報告ではいずれのタイプの chSCF も培養系には使用されておらず、本研究における検証でも chSCF1 および chSCF2 の作用によって PGCs が EG 様細胞化することはなかったことから、SCF の機能はマウス PGCs とニワトリ PGCs との間で異なっているのかもしれない。他方、Glover ら（2013 年）の報告では Akt のシグナル強度に依存してニワトリ PGCs の性質が変化することが示唆されていることから、chSCFs の添加量によっては培養 PGCs に異なる反応を惹起する可能性が残されている。このように、chSCFs の機能には未知の部分が残されているため、今後さらに解析を行う必要がある。

他方、第 3 章での実験において、ニワトリ PGCs では chSCF の他にも LIF のシグナルを受容する可能性が示されている。SCF と同様に、ニワトリ PGCs の培養系にはこれまでヒトあるいはマウスの LIF が使用されており、それらの LIF とニワトリ LIF（chLIF）とのアミノ酸相同性は 40%程度である（Horiuchi ら 2004 年）。このことから、哺乳類 LIF もまたニワトリ PGCs に対して十分な効果を及ぼしていない可能性がある。ニワトリ ES 細胞では、哺乳類の LIF は ES 細胞の未分化維持や増殖に重要なシグナル分子である STAT3 のリン酸化を誘導しないが、chLIF を添加した場合には STAT3 のリン酸化が顕著に誘導される（Horiuchi ら 2004

年)。また、chLIF を用いて培養されたニワトリ ES 細胞では、ES 細胞の未分化状態を維持するための中核的な役割を担う Nanog タンパク質の発現が長期間にわたって持続する (Nakano ら 2011 年)。これらの報告および筆者のデータは、ニワトリ PGCs の培養においてもニワトリ ES 細胞と同様に chLIF が有効であることを示唆しており、chLIF の有効性について今後調査する必要がある。

本研究において培養された PGCs は、いずれの条件においても受精可能な配偶子へと分化する能力を保持しながら増殖していた。しかしながら、移植された細胞数 (1,000 個) に対して、後代への寄与率は低率であった。宿主胚に内在する PGCs は多い場合でも 100 個程度であることを考えれば、培養 PGCs の配偶子形成能は内在性 PGCs に比べて低くなっていると考えられる。第 3 章において示されたように、培養 PGCs は正常な PGCs に比べて生殖巣への移動能が低くなっており、このことは長期培養中に PGCs としての性質が変化していることを示唆している。また、培養 PGCs の生殖系列への寄与率の程度を考えると、生殖巣への移動が完了した培養 PGCs の中でもごく少数の細胞のみが配偶子形成を行なう能力を有していると考えられる。残念なことに、現在の培養系では内在性 PGCs と競合した場合に、生殖巣への移動能・配偶子形成能ともに劣ることが明らかとなった。したがって、培養 PGCs の生殖系列への寄与率を向上させるためには、培養 PGCs そのものの性質を改善するか、内在性 PGCs を不活性化するなどの方法を取る必要がある。

内在性 PGCs を不活性化してドナー細胞の寄与率を向上させる方法としては、ドナー PGCs の移植前の宿主胚から血液を除去する (Naito ら 1994 年)、X 線や γ 線などの放射線照射 (Carsience ら 1993 年、Atsumi ら 2009 年、Macdonald ら 2010 年、Nakamura ら 2012 年)、ブスルファンなどの生殖細胞に毒性をもつ薬剤による処理 (Song ら 2005 年、Nakamura ら 2008 年、2010 年-a、Naito ら 2015 年) などがある。特に、幹細胞に対する選択的毒性をもつブスルファンの使用は宿主側の生殖細胞をほぼ完全に除去し、ドナー生殖細胞の寄与率を平均 98.4%まで向上させることが可能である (Nakamura ら 2010 年-a)。本研究では培養 PGCs の移

植に際して内在性 PGCs の不活性化処理を行っていないことから、これらの処理を行なうことにより、培養 PGCs の宿主生殖系列における寄与率を向上できるかもしれない。

その一方で、培養 PGCs の移植のみで宿主の生殖系列の大部分をドナー由来のものに置換できたとする報告もある (van de Lavoie ら 2006 年、Park と Han、2012 年、2013 年、Song ら 2013 年)。これらの研究では、宿主胚の cPGCs に対して圧倒的多数 (3,000 個以上) の培養 PGCs (または培養 GGCs) を初期胚血液中へ移植すると同時に、培養期間を短縮することで PGCs/GGCs の変質を最小限に留めるような工夫を行なっている。本研究の場合、生殖系列キメラニワトリを作出するまでに PGCs を 100-200 日以上に渡って培養している。これにより培養期間中に PGCs の性状が変化した可能性が考えられることから、PGCs の性状を高い水準で長期維持できるような条件の探索と共に、培養期間を短縮する工夫が必要と思われる。本研究で樹立された chSCF2-BRL フィーダー細胞と FGF2 を用いる培養系は PGCs の増殖速度を飛躍的に向上させる培養系であったことから、上記の工夫は十分に達成可能であると考えられる。

本研究でニワトリ PGCs の *in vitro* での増殖に効果的であった FGF2 (本研究ではシグナルペプチドを含むヒト組み換え FGF2 を採用) と chSCF2 は、鳥類における遺伝子配列の保存性ならびにアミノ酸相同性が高い増殖因子である。特に chSCF2 は、ニワトリのみならずウズラ (98%, *Coturnix japonica*, AAC59934)、トキ (95%, *Nipponia nippon*, XP_009462259)、アヒル (94%, *Anas platyrhynchos*, XP_012960092) などの様々な鳥類とのアミノ酸相同性が極めて高く、家禽のみならず様々な鳥類の PGCs の培養に適用できると考えられる。我が国の貴重な家禽遺伝資源である日本鶏や野生鳥類の中には、受精卵の採取が困難なものや内在性 PGCs 数が著しく少ないものも存在する。遺伝資源の保全・収集を目的として PGCs を採取することは、一方でそれらの鳥類の僅少な受精卵を犠牲にすることを意味している。Nakamura ら (2010 年-b) が問題提起しているように、希少家禽または野生鳥類の PGCs を収集するためとはいえ、保全対象とする鳥の受精卵を大量に損耗することは好ましくない。本研究におい

て樹立・最適化された PGCs の培養技術は、希少な家禽または野生鳥類に由来する PGCs を凍結保存および移植が可能な数にまで増殖させることができる可能性がある。こうして大量増殖させた PGCs を、上述したような技術を用いて不妊化させた宿主胚へと移植することにより、鳥類遺伝資源の保全および復元に向けた取り組みが実用レベルにまで向上すると思われる。また、筆者は最近、上記の培養系によって少産な家禽の一種であるウコッケイに由来する PGCs を培養することに成功している。したがって、上記培養系は少なくとも白色レグホン、横斑プリマスロック、ウコッケイの PGCs を培養できる培養系であることが示されている。現在、ウコッケイの培養 PGCs は *in vitro* において安定した増殖を続けており、大量増殖後に凍結保存を行なってウコッケイの遺伝資源の保全および復元に役立てていく予定である。

本研究で改良された培養系を含む現用の培養系は、PGCs の増殖のために大量の動物由来血清を使用している。動物由来血清は、精製ロットや供給量などに依存して性状が大きく変化することから、PGCs 培養系の安定性を必ずしも保障できない。また、血清に含まれる因子の大部分は未知であるため、培養細胞を介した宿主側の遺伝子汚染や感染症の引き金となり得る可能性がある。したがって、血清を用いない PGCs 培養系の樹立が急務であり、PGCs が増殖するために必要な因子ならびに増殖メカニズムを明らかにすることが必要である。前述したとおり、PGCs の増殖因子としては FGF2 以外には明らかにされていなかったが、本研究により chSCFs がニワトリ PGCs の生存に必要な PI3K/Akt シグナルの活性化因子の一つであることが明らかとなった。これらの成果を活用することにより、将来的には動物由来血清を用いずにニワトリ PGCs を培養する技術の開発につながる可能性がある。

遺伝子組み換えニワトリ作出技術は、培養 PGCs が使用可能となったことや遺伝子工学的手法が発達したことにより、その効率が飛躍的に改善された。従来は、胚盤葉細胞や cPGCs を対象としたリポフェクション法ならびにウィルスベクター法などによるランダムかつ低頻度なトランスジェネシスによって遺伝子改変を行っていた (Watanabe ら 1994 年、McGrew ら 2004 年、Motono ら 2008 年)。しかし近年では、PGCs の培養技術が一定の完成を見たこと

によって、非ウイルスによるトランスジェネシスが可能となった。すなわち、*Tol2* や *piggyBac* トランスポゾンによる染色体への遺伝子導入 (Macdonald ら 2012 年、Park と Han、2012 年)、*Flipase* を用いた部位特異的変異導入 (Lee ら 2015)、ゲノム編集による特定遺伝子破壊 (Park ら 2014 年) などである。これらの技術を適用するには、培養 PGCs における長期間の増殖およびスクリーニングが不可欠である。本研究によって樹立された培養系は、ニワトリ PGCs 自身での配偶子形成能を維持しつつ、増殖効率を従来の培養系の 5 倍以上にまで改善できる。本培養系を用いることにより、遺伝子導入を行った PGCs のスクリーニングやクローン化に要する時間を従来の培養系に比べて大幅に短縮することが可能となる。

ニワトリは全ての動物において唯一、PGCs としての性質を保ったままで長期培養できる動物である。このことは、培養 PGCs に対する薬剤処理や遺伝子改変を含めた様々な操作を可能にする。また、ニワトリは胚発生が体外で進行することから、胚操作および発生過程の観察が容易である。ニワトリにおけるこれらのアドバンテージは、従来はトランスジェニックマウス等による表現型の解析に留まっていた生殖細胞の発生分化過程を解析する研究に対して非常に強力なツールになり得ることは言うまでもない。

以上のように、培養 PGCs を基盤とした様々な技術開発および基礎生物学的な研究が可能になりつつある。本研究において改良された PGCs の培養条件は、これらの取り組みをさらに効率化することにつながり、ニワトリを用いた上記技術の実用化は学術・産業レベルでの重大なインパクトを与えるだろう。

第 6 章 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました信州大学学術研究院（農学系）鏡味裕教授に心より感謝いたします。また、本論文の副査を担当くださり、研究に関する温かい御指導並びに御助言を賜りました信州大学学術研究院（農学系）小野珠乙教授、平松浩二教授、濱野光一教授、米倉真一助教、新潟大学 自然科学研究系 生命・食料科学系 列 新村末雄教授に深く感謝致します。

終始懇切なご指導を頂き、研究の遂行に多大なるご支援を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所 家畜育種繁殖研究領域の田上貴寛 主任研究員、葺澤圭二郎 研究領域長、長田美奈子さんに深謝致します。また、実験動物の維持、管理、受精卵の提供に際しまして、多大なるご支援とご協力を頂きました畜産草地研究所 業務 2 課 養鶏担当の皆様感謝致します。

研究に関する技術支援のみならず、終始温かいご指導・ご助言を賜りました国立研究開発法人産業技術総合研究所生命工学領域 バイオメディカル研究部門の大石勲博士に深謝致します。

一連の研究に対する温かいご指導・ご助言を頂きました大学共同利用機関法人自然科学研究機構 基礎生物学研究所の中村隼明博士に感謝致します。また、本研究の基幹となる培養 PGCs 株の樹立ならびに実験の遂行に際して格別のご協力を賜り、また公私に渡り切磋琢磨した信州大学大学院農学研究科の森貴史君、ならびに細胞を用いた実験の補佐を担当してくださいました信州大学大学院農学研究科の牧野龍一君に感謝いたします。

実験動物の維持管理などのご支援を賜り、共に研究に励んだ信州大学農学部動物発生遺伝学研究室の先輩・同輩・後輩の皆様には感謝いたします。

最後に、どんな時も私を温かく見守り、研究者としての道を歩むことを後押しして下さいました家族の皆様には感謝いたします。

第 7 章

引用文献

Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D, Williams DE. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990; 63: 235-243.

Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Kato Y, Shirahige K, Saitou M. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell* 2013; 27: 516-529.

Atsumi Y, Yazawa Y, Usui F, Nakamura Y, Yamamoto Y, Hiramatsu K, Kagami H, Ono T. Depletion of Primordial Germ Cells (PGCs) by X-irradiation to Extraembryonic Region of Chicken Embryos and Expression of Xenotransplanted Quail PGCs. *J Poult Sci* 2009; 46:136-143.

Bartůněk P, Pichlíková L, Stengl G, Boehmelt G, Martin FH, Beug H, Dvorák M, Zenke M. Avian stem cell factor (SCF): production and characterization of the recombinant His-tagged SCF of chicken and its neutralizing antibody. *Cytokine* 1996; 8: 14-20.

Carsience RS, Clark ME, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 1993; 117: 669-675.

Chang IK, Tajima A, Chikamune T, Ohno T. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. *Cell Biol Int* 1995; 19 143-149.

Chang IK, Jeong DK, Hong YH, Park TS, Moon YK, Ohno T, Han JY. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol Int* 1997; 21: 495-499.

Choi JW, Kim S, Kim TM, Kim YM, Seo HW, Park TS, Jeong JW, Song G, Han JY. Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS One* 2010; 5: e12968.

DOI: 10.1371/journal.pone.0012968.

Clinton M, Haines L, Belloir B, McBride D. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. *Br Poult Sci* 2001; 42: 134-138.

D'Costa S, Kulik MJ, Petite JN. Expression and purification of biologically active recombinant quail stem cell factor in *E. coli*. *Cell Biol Int* 2000; 24: 311-317.

De Felici M, Dolci S, Pesce M. Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture. *Int J Dev Biol* 1992; 205-213.

De Melo Bernardo A, Sprengels K, Rodrigues G, Noce T, Chuva De Sousa Lopes SM. Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation. *Biol Open* 2012; 1: 1146-1152.

De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10458-10463.

Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS, Donovan PJ. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 1991; 352: 809-811.

Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev Biol* 1976; 49; 321-337.

Farini D, La Sala G, Tedesco M, De Felici M. Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Dev Biol* 2007; 306: 572-583.

Flanagan JG, Chan DC, Leder P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 1991; 64:1025–1035

Ge C, Yu M, Petite JN, Zhang C. Epidermal growth factor-induced proliferation of chicken primordial germ cells: involvement of calcium/protein kinase C and NFkB1. *Biol Reprod* 2009; 80: 528-536.

Ginsburg M, Eyal-Giladi H. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development* 1987; 101: 209-219.

Glover JD, McGrew MJ. Primordial Germ Cell Technologies for Avian Germplasm Cryopreservation and Investigating Germ Cell Development. *J Poult Sci* 2012; 49: 155-162.

Glover JD, Taylor L, Sherman A, Zeiger-Poli C, Sang HM, McGrew MJ. A novel piggyBac

transposon inducible expression system identifies a role for AKT signalling in primordial germ cell migration. *PLoS One* 2013; 8: e77222.

Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A, Wylie C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* 2009; 136: 1295-1303.

Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani MA, Wylie C. Membrane-bound steel factor maintains a high local concentration for mouse primordial germ cell motility, and defines the region of their migration. *PLoS One* 2011; 6: e25984.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951; 88: 49-92.

Hanyu-Nakamura K, Sonobe-Nojima H, Tanigawa A, Lasko P, Nakamura A. Drosophila Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells. *Nature* 2008; 451: 730-733.

Hayman MJ, Meyer S, Martin F, Steinlein P, Beug H. Self-renewal and differentiation of normal avian erythroid progenitor cells: regulatory roles of the TGF alpha/c-ErbB and SCF/c-kit receptors. *Cell* 1993; 74: 157-169.

Hill DJ, Crace CJ, Nissley SP, Morrell D, Holder AT, Milner RD. Fetal rat myoblasts release both rat somatomedin-C (SM-C)/insulin-like growth factor I (IGF I) and multiplication-stimulating activity in vitro: partial characterization and biological activity of myoblast-derived SM-C/IGF I. *Endocrinology* 1985; 117:2061-2072.

Horiuchi H, Tategaki A, Yamashita Y, Hisamatsu H, Ogawa M, Noguchi T, Aosasa M, Kawashima T, Akita S, Nishimichi N, Mitsui N, Furusawa S, Matsuda H. Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state. *J Biol Chem* 2004; 279: 24514-24520.

Kagami H, Tagami T, Matsubara Y, Harumi T, Hanada H, Maruyama K, Sakurai M, Kuwana T, Naito M. The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 501-510.

Karagenc L, Petite JN. Soluble factors and the emergence of chick primordial germ cells in vitro. *Poult Sci* 2000; 79: 80-85.

Kim JN, Kim MA, Park TS, Kim DK, Park HJ, Ono T, Lim JM, Han JY. Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. *Mol Reprod Dev* 2004; 68: 81-87.

Kim MA, Park TS, Kim JN, Park HJ, Lee YM, Ono T, Lim JM, Han JY. Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras by transfer of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Theriogenology* 2005; 63: 774-782.

Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, Nakano T. AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development* 2008; 135: 869-879.

Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev* 2008; 22: 1617-1635.

Kuwana T, Hashimoto K, Nakanishi A, Yasuda Y, Tajima A, Naito M. Long-term culture of avian embryonic cells in vitro. *Int J Dev Biol* 1996; 40: 1061-1064.

Lambeth LS, Cummins DM, Doran TJ, Sinclair AH, Smith CA. Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. *PLoS One* 2013; 8: e68362.

Lee HJ, Lee HC, Kim YM, Hwang YS, Park YH, Park TS, Han JY. Site-specific recombination in the chicken genome using Flipase recombinase-mediated cassette exchange. *FASEB J* 2015 (in press).

Li ZD, Deng H, Liu CH, Song YH, Sha J, Wang N, Wei H. Production of duck-chicken chimeras by transferring early blastodermal cells. *Poult Sci* 2002; 81: 1360-1364.

Liu C, Khazanehdari KA, Baskar V, Saleem S, Kinne J, Wernery U, Chang IK. Production of chicken progeny (*Gallus gallus domesticus*) from interspecies germline chimeric duck (*Anas domesticus*) by primordial germ cell transfer. *Biol Reprod* 2012; 86: 101.

Macdonald J, Glover JD, Taylor L, Sang HM, McGrew MJ. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One* 2010; 5: e15518.

DOI: 10.1371/journal.pone.0015518.

Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, Sang HM, McGrew MJ. Efficient

genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 1466-1472.

Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* 1990; 347: 667-669.

Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991; 353: 750-752.

Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70: 841-847.

Matsui Y, Takehara A, Tokitake Y, Ikeda M, Obara Y, Morita-Fujimura Y, Kimura T, Nakano T. The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by AKT activation. *Development* 2014; 141: 4457-4467.

McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2004; 5: 728-733.

McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7. *J Immunol* 1991; 146: 3785-3790.

McNiece IK, Briddell RA. Stem cell factor. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 14-22.

Mi Y, He B, Li J, Zhang C. Progesterone regulates chicken embryonic germ cell meiotic initiation independent of retinoic acid signaling. *Theriogenology* 2014; 82: 195-203.

Miyahara D, Mori T, Makino R, Nakamura Y, Oishi I, Ono T, Nirasawa K, Tagami T, Kagami H. Culture conditions for maintain propagation, long-term survival and germline transmission of chicken primordial germ cell-like cells. *J Poult Sci* 2014; 51: 87-95.

Miyazawa K, Williams DA, Gotoh A, Nishimaki J, Broxmeyer HE, Toyama K. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* 1995; 85: 641-649.

Mizushima S, Takagi S, Ono T, Atsumi Y, Tsukada A, Saito N, Sasanami T, Okabe M, Shimada K. Novel method of gene transfer in birds: intracytoplasmic sperm injection for green fluorescent protein expression in quail blastoderms. *Biol Reprod* 2010; 83: 965-969.

Motono M, Yamada Y, Hattori Y, Nakagawa R, Nishijima K, Iijima S. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *J Biosci Bioeng* 2010; 109: 315-321.

Mozdziak PE, Angerman-Stewart J, Rushton B, Pardue SL, Petite JN. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult Sci* 2005; 84: 594-600.

Naito M, Tajima A, Tagami T, Yasuda Y, Kuwana T. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 321-325.

Naito M, Sano A, Tagami T, Harumi T, Matsubara Y, Kuwana T. Effect of Mytomycin C Treatment on Feeder Cells and the Proliferation of Cultured Chicken Primordial Germ Cells Isolated from Embryonic Blood. *J Poult Sci* 2001; 38: 343-347.

Naito M, Harumi T, Kuwana T. Long Term in vitro Culture of Chicken Primordial Germ Cells Isolated from Embryonic Blood and Incorporation into Germline of Recipient Embryo. *J Poult Sci* 2010; 47: 57-64.

Naito M, Harumi T, Kuwana T. Expression of GFP Gene in Cultured PGCs Isolated from Embryonic Blood and Incorporation into Gonads of Recipient Embryos. *J Poult Sci* 2012; 49: 116-123.

Naito M, Harumi T, Kuwana T. Long-term culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and production of germline chimaeric chickens. *Anim Reprod Sci* 2015; 153:50-61.

Nakajima Y, Hattori T, Asano A, Ishikawa N, Tajima A. Migration and differentiation of gonadal germ cells under cross-sex germline chimeras condition in domestic chickens. *J Reprod Dev* 2014; 406-410.

Nakamura A, Amikura R, Mukai M, Kobayashi S, Lasko PF. Requirement for noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* 1996; 274: 2075-2079.

Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult Sci* 2007; 86: 2182-2193.

Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Atsumi Y, Ito Y, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chickens. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 900-907.

Nakamura Y, Usui F, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol Reprod* 2010; 83:130-137. <a>

Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujiidori). *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 1237-1246

Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Watanabe H, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Viability and Functionality of Primordial Germ Cells after Freeze-thaw in Chickens. *J Poult Sci* 2011; 48: 57-63.

Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Ono T, Kagami H, Takeda K, Nirasawa K, Tagami T. X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens. *J Reprod Dev* 2012; 58: 432-437.

Nakano M, Arisawa K, Yokoyama S, Nishimoto M, Yamashita Y, Sakashita M, Ezaki R, Matsuda H, Furusawa S, Horiuchi H. Characteristics of Novel Chicken Embryonic Stem Cells Established Using Chicken Leukemia Inhibitory Factor. *J Poult Sci* 2011; 48: 64-72.

Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436:207-213.

Ono T, Murakami T, Mochii M, Agata K, Kino K, Otsuka K, Ohta M, Mizutani M, Yoshida M, Eguchi G. A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching. *Dev Biol* 1994; 161: 126-130.

Ono T, Machida Y. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999; 122; 255-259.

Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 1996; 122: 2339-2348.

Park TS, Han JY. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 475-482.

Park TS, Hong YH, Kwon SC, Lim JM, Han JY. Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ (EG) cells into recipient embryos. *Mol Reprod Dev* 2003; 65: 389-395.

Park TS, Han JY. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 9337-9341.

Park TS, Han JY. Conservation of migration and differentiation circuits in primordial germ cells

between avian species. *J Reprod Dev* 2013; 59: 252-257.

Park TS, Lee HJ, Kim KH, Kim JS, Han JY. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 12716-12721.

Perry MM. A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 1988; 331: 70-72.

Petitte JN, Clark ME, Liu G, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 1990; 108: 185-189.

Petitte JN, Kulik MJ. Cloning and characterization of cDNAs encoding two forms of avian stem cell factor. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1307: 149-151.

Rauci F, Fuet A, Pain B. In vitro generation and characterization of chicken long-term germ cells from different embryonic origins. *Theriogenology* 2015; 84: 732-742.

Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 2006; 133: 4861-4869.

Sato T, Yokonishi T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Matoba S, Ogonuki N, Ogura A, Yoshida S, Ogawa T. Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 16934-16938.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336: 688-690.

Smith CA, Roeszler KN, Bowles J, Koopman P, Sinclair AH. Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 85.

Song Y, D'Costa S, Pardue SL, Petite JN. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 438-444.

Song Y, Duraisamy S, Ali J, Kizhakkayil J, Jacob VD, Mohammed MA, Eltigani MA, Amisetty S, Shukla MK, Etches RJ, van de Lavoie MC. Characteristics of long-term cultures of avian primordial germ cells and gonocytes. *Biol Reprod* 2014; 90: 1-8.

Stebler J, Spieler D, Slanchev K, Molyneaux KA, Richter U, Cojocaru V, Tarabykin V, Wylie C, Kessel M, Raz E. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev Biol* 2004; 272: 351-361.

Swift CH. Origin and early history of primordial germ cells in the chick. *Am J Anat* 1914; 15: 483-516.

Tagami T, Kagami H, Matsubara Y, Harumi T, Naito M, Takeda K, Hanada H, Nirasawa K. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mol Reprod Dev* 2007; 74:68-75.

Tagami T, Matsubara Y, Hanada H, Naito M. Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Dev Growth Differ* 1997; 39:267-271.

Tajima A, Hayashi H, Kamizumi A, Ogura J, Kuwana T, Chikamune T. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J Exp Zool* 1999; 84: 759-764.

Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 1993; 40: 509-519.

Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J Exp Zool* 1998; 280: 265-267.

Tang X, Zhang C, Jin Y, Ge C, Wu Y. Pro-proliferating effect of homologous somatic cells on chicken primordial germ cells. *Cell Biol Int* 2007; 31: 1016-1021.

Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, Martin FH, Williams DA. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7350-7354.

Tonus C, Cloquette K, Ectors F, Piret J, Gillet L, Antoine N, Desmecht D, Vanderplasschen A, Waroux O, Grobet L. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod Fertil Dev* 2014. DOI: 10.1071/RD14194. (In press).

Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 2003; 301:1239-1241.

Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 2000; 127: 2741-2750.

van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 2006; 441: 766-769.

van't Hof RJ, von Lindern M, Nijweide PJ, Beug H. Stem cell factor stimulates chicken osteoclast activity in vitro. *FASEB J* 1997; 11: 287-293.

Wang Y, Li J, Ying Wang C, Yan Kwok AH, Leung FC. Epidermal growth factor (EGF) receptor ligands in the chicken ovary: I. Evidence for heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) as a potential oocyte-derived signal to control granulosa cell proliferation and HB-EGF and kit ligand expression. *Endocrinology* 2007; 148: 3426-3440.

Watanabe M, Naito M, Sasaki E, Sakurai M, Kuwana T, Oishi T. Liposome-mediated DNA transfer into chicken primordial germ cells in vivo. *Mol Reprod Dev* 1994; 38:268-274.

Wernery U, Liu C, Baskar V, Guerineche Z, Khazanehdari KA, Saleem S, Kinne J, Wernery R, Griffin DK, Chang IK. Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line Houbara bustard offspring: potential for repopulating an endangered species. *PLoS One* 2010; 5: e15824.

Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* 2006; 75: 705-716.

Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y, Saitou

M. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 2008; 40:1016-1022.

Yamamoto Y, Usui F, Nakamura Y, Ito Y, Tagami T, Nirasawa K, Matsubara Y, Ono T, Kagami H. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol Reprod* 2007; 77: 115-119.

Yanai H. Statcel-The Useful Addin Forms on Excel, 3rd edition, OMS Publications 2010, 294p, ISBN978-4434154133

Yanai H. Statcel-The Useful Addin Forms on Excel, 4th edition, OMS Publications 2015, 312p, ISBN978-4-434-21162-1

Yang G, Fujiwara N. Long-term proliferation of chicken primordial germ cells cultured in vitro. *J Reprod Dev* 1999; 45: 161-166. <a>

Yang G, Fujiwara N. Survival and proliferation of refined circulating primordial germ cells cultured in vitro. *J Reprod Dev* 1999; 45: 177-181.

Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T. A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 521-528.

Zhao DF, Kuwana T. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br Poult Sci* 2003; 44: 30-35.

Zhou JH, Ohtaki M, Sakurai M. Sequence of a cDNA encoding chicken stem cell factor. *Gene* 1993; 30: 269-270.

Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, Satyagal VN, Tung W, Bosselman RA, Mendiaz EA, Langley KE. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990; 63: 195-201. <a>

Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC, Jacobsen FW, Langley KE, Smith KA, Takeish T, Cattanach BM, Galli SJ, Suggs SV. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990; 63: 213-224.

