

学位論文の審査結果の要旨

現在、哺乳類を初めとする多くの動物種において配偶子の凍結保存による遺伝資源の保全や、配偶子そのものを対象とした遺伝子改変等の技術が確立されている。しかしながら鳥類では、配偶子の凍結保存や遺伝子改変が極めて困難とされていることから、配偶子の前駆細胞である始原生殖細胞（PGCs）を用いた上記技術の開発が進められてきた。これらの技術を実用化する上で、PGCsを試験管内において大量増殖させる培養系の開発が必要不可欠である。鳥類の代表的なモデル動物であるニワトリでは、あらゆる動物の中で唯一、PGCsの長期培養系が報告されている。しかしながら、従来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、未だ安定的な技術とは成りえていない。

そのような背景のもと、PGCsをより効率的に増殖させ、かつ配偶子形成能を喪失しない培養系の開発が望まれている。本学位論文では、それらの課題にこたえるべく、ニワトリの始原生殖細胞（PGCs）の培養技術の確立およびその改良を行なった一連の研究についてまとめられたものである。

本研究ではまず、ニワトリPGCsを最も効率的に増殖させられる培養系の開発に着手した。具体的には、ニワトリPGCsの増殖に適した環境を提供できるフィーダー細胞、そして培養液に添加する増殖因子について解析した。様々な条件検討の結果、バッファローラット肝臓（BRL）細胞をフィーダー細胞として、さらに線維芽細胞増殖因子2（FGF2）を含有する培養液を使用することが、ニワトリPGCsの培養系として最適であることが明らかとなった（公表論文1）。

以上の培養系が開発されたことにより、ニワトリPGCsを200日以上に渡って維持できることが分かった。これは非常に画期的な成果である反面、上記培養系におけるPGCsの増殖効率は依然として低く、培養系のさらなる改善が必要とされた。増殖効率の高い培養系は、培養PGCsの利用性を大幅に向上させることに直結する。前述の実験により、ニワトリPGCsはFGF2依存性の増殖経路を持つことが明らかとなったが、FGF2以外の増殖因子の添加によってニワトリPGCsの増殖効率をさらに向上させることができると思われる。

さらなる増殖因子のスクリーニングの結果、ニワトリPGCsの増殖因子の候補として幹細胞因子（SCF）を同定した。SCFは、哺乳類のPGCsにおいて必須の増殖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SCFの効果は殆ど明らかにされてこなかった。鳥類のSCFでは、分泌型と膜結合型の2種類のアイソフォームが知られていたため、本研究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（chSCF1-BRL細胞、chSCF2-BRL細胞）

胞)をそれぞれ樹立し、PGCsに与える増殖効果を検証した。上記で開発した培養系とPGCsの増殖効率を比較した結果、いずれのchSCFアイソフォームもPGCsの増殖に効果的であることが明らかとなった。中でも、chSCF2-BRLフィーダー細胞を使用してPGCsを培養した場合、PGCsの増殖効率を前項の方法の5倍以上にまで向上させることに成功した。さらに、chSCF2-BRLフィーダー細胞上で増殖したPGCsを宿主胚へ移植した場合、培養PGCsに由来する後代を得ることに成功した。一方で、FGF2を培養液から取り除くと、chSCF1、chSCF2ともにPGCsの増殖効果を示さなかった。このことから、chSCFsはFGF2のCo-factorであることが強く示唆された(公表論文2)。

このように、本研究は世界に先駆ける知見を多数含んでおり、それに基づいた非常に効率的かつ実用性の高いニワトリPGCsの培養系を提案している。すなわち、本学位論文において開発された技術は、ニワトリをはじめとした鳥類における遺伝資源の保存や遺伝子改変のための有効なツールとなるであろう。また、本学位論文は、下記主要公表論文の結果に基づいて執筆されたものである。公表論文は全編英語で執筆されており、申請者は博士の学位に相応しい英語能力を有していると思われる。

以上のことから、審査員一同は本学位論文の有用性、新規性を十二分に認め、学位審査の結果を「合格」と判断した。

公表主要論文名

- **Daichi Miyahara,** Takafumi Mori, Ryuichi Makino, Yoshiaki Nakamura, Isao Oishi, Tamao Ono, Keijiro Nirasawa, Takahiro Tagami, Hiroshi Kagami. Culture conditions for maintain propagation, long-term survival and germline transmission of chicken primordial germ cell-like cells. The Journal of Poultry Science第51巻87頁～95頁(2014年1月号に掲載)
- **Daichi Miyahara,** Isao Oishi, Ryuichi Makino, Nozomi Kurumisawa, Ryuma Nakaya, Tamao Ono, Hiroshi Kagami, Takahiro Tagami. Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor 2. The Journal of Reproduction and Development (採録決定済、2016年4月号に掲載予定)