

| | |
|---------|--|
| 氏名 | 宮原大地 |
| 学位の種類 | 博士（農学） |
| 学位記番号 | 甲第63号 |
| 学位授与の日付 | 平成28年3月20日 |
| 学位授与の要件 | 信州大学学位規程第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | ニワトリ始原生殖細胞培養系の改良に関する研究 |
| 論文審査委員 | 主査 教授 鏡味 裕 教授 小野 珠乙 教授 平松 浩二 教授 濱野 光市 助教 米倉 真一 教授 新村 末雄（新潟大学） |

論文内容の要旨

ニワトリは、あらゆる動物の中で唯一、始原生殖細胞（PGCs）の長期培養系が開発されている動物である。配偶子を用いた遺伝資源の凍結保存や遺伝子操作が極めて困難な鳥類において、PGCsの培養系は遺伝資源の保存や遺伝子改変のための強力なツールとなる。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、安定的な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きたが、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 の増殖効率が最も高くなるような培養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したところ、バッファローラット肝臓（BRL）細胞をフィーダーとして使用した場合にニワトリ PGCs の増殖効率が最も高くなった。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示された。以上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 CVH および未分化型細胞に発現する糖鎖抗原である 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* を強く発現する未分化型生殖細胞であった。さらに、培養 225 日目の PGCs を宿主胚に移植した場合、培養 PGCs に由来する後代を得ることができた。このことから、本培養系は配偶子形成能を持つ PGCs を 200 日以上にわたって培養可能であることが明らかとなった。

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

前項の解析で、ニワトリ PGCs の *in vitro* での増殖を支持する因子の一つが FGF2 であることが明らかとなった。しかしながら、FGF2 以外の増殖因子は未だ不明である。PGCs の増殖因子をより多く明らかにすることは、培養系のさらなる改良のために必須である。本研究では、ニワトリ PGCs の増殖効率をさらに高めるために、1) で確立された培養系を基礎として FGF2 以外の増殖因子の候補を探索した。その結果、幹細胞因子（SCF）がニワトリ PGCs の増殖に効果的である可能性が示された。鳥類の 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する。このため、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) をそれぞれ樹立し、PGCs に与える増殖効果を検証した。その結果、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り、その効果は chSCF2-BRL フィーダー細胞において最も顕著であった (前項の方法の 5 倍以上)。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。

本研究により、ニワトリ PGCs の増殖効果が最大となる培養系を樹立することができた。さらに、これらの方法で培養した PGCs は機能的な配偶子へと分化する能力を有していることも明らかとなった。以上の知見は、ニワトリをはじめとした鳥類において培養 PGCs を用いた遺伝資源の保全ならびに遺伝子改変ニワトリの作出のために有用である。

