

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450376

研究課題名(和文) 家禽幹細胞の遺伝的特性解析と細胞育種への応用

研究課題名(英文) Genetic analysis of avian stem cells and the application for poultry breeding

研究代表者

鏡味 裕 (Kagami, Hiroshi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：80308303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ等の家禽においては、幹細胞の分化制御による器官、臓器の再生は世界的にもほとんど成就していない。本研究では、家禽において幹細胞を単離し遺伝的特性を解析した。また、始原生殖細胞を単離し発生分化機構の解析を試みた。これらの細胞をドナーとしレシピエントに移植した。この結果、ドナー幹細胞は生殖細胞系列を含む各種の細胞系譜へと発生分化し得ることが確認された。また始原生殖細胞を用いて効率的に生殖系列キメラを作出し得ることも明らかとなった。また培養始原生殖細胞に対してゲノム編集を行いオボムコイド制御遺伝子のノックアウトを初めて実施した。これら成果は将来的な家禽細胞育種の革新に貢献し得ると思われた。

研究成果の概要(英文)：Regeneration of tissues and organs by stem cell differentiation has hardly been achieved in poultry. In the present studies, stem cells from the early embryo or the primordial germ cells (PGCs) from the circulating blood of the early embryos were isolated and the developmental mechanism was analyzed. These stem cells and primordial germ cells were used as donor and transplanted into the recipient. Donor stem cells derived from chicken early embryo can differentiate into various cell lineages including germ line. It was also revealed that germline chimeras can be efficiently produced using the primordial germ cells in early embryonic circulation. Furthermore, we cultivated efficient culturing methods of primordial germ cells. Genomic editing was performed on these cultured primordial germ cells and knockout of the ovomucoid control gene in egg white was performed for the first time. These results seemed to contribute to innovation of cell breeding in poultry in the future.

研究分野：家禽発生工学

キーワード：ニワトリ 幹細胞 始原生殖細胞 遺伝的特徴 生殖キメラ 細胞育種

1. 研究開始当初の背景

近年、人やマウス等の哺乳類において、線維芽細胞などの終末分化に達した細胞から、様々な組織・器官へと分化しうる能力を持った「人工多能性幹細胞(iPS細胞)」が樹立された。また、iPS細胞を用いて、様々な組織・器官および臓器を再生する取り組みが行われている。さらに、マウスiPS細胞を特殊な培養条件化において分化制御することにより、機能的な精子および卵子を生産する技術が確立された。これらの知見は、生物学に革新をもたらし、再生医療への扉を開いた。しかし鳥類多能性幹細胞の樹立は成し遂げられていない。

2. 研究の目的

本研究においては、ニワトリ等の家禽における幹細胞の厳密な単離を試みる。多能性幹細胞は放卵直後の胚盤葉明域に局在する細胞を単離して利用する。また、初期胚の循環血由来の始原生殖細胞(PGCs)もドナーとして活用する。これらの幹細胞の配偶子形成にむけた発生・分化における遺伝子制御機構の解明も試みる。上記の解析によって得られる、新たな学術知見や研究実施を通じて開発する新技術を統合的に活用し、家禽臓器・個体再生を試みる。更に、これらの知見や技術を基盤とし家禽細胞育種への活用を試みる。

3. 研究の方法

ニワトリ幹細胞の同定・分取を試みた。また、これらの幹細胞の分化制御による臓器・個体再生をニワトリにおいて試みた。地上に放卵直後の胚盤葉(ステージX)における明域中央部より多能性細胞を採取した。得られた細胞塊をピペッティングによって単一解離細胞へと解離した。これらの細胞培養においては、SCF等のサイトカインを培養液に添加し、それらの効果を解析した。さらにこれらの幹細胞をドナーとして活用した。レシピエント胚盤葉下腔に幹細胞を移植した。こうして作出し

たキメラにおいて、移植したドナー細胞のレシピエント胚における分化機構を免疫組織化学的、及び、分子生物学的に解析した。孵化したキメラ雛を通常の飼育条件で飼育した。これらのキメラが性成熟後に、後代検定し、生殖キメリズム解析を行なった。初期胚循環血中の始原生殖細胞は、ACK処理して行なった。これらを用いた生殖系列キメラ作出の可否を評価した。効率的な生殖系列キメラの作出にはPGCsの培養が必須である。そこでPGCsの培養方法の最適条件も併せて検討した。更に培養PGCsを用いて卵白オボムコイドのゲノム編集による遺伝子欠損へ活用した。

4. 研究成果

ニワトリ初期胚から厳密に幹細胞を単離する実験系が開発された。またPGCsの厳密な分離方法も確立した。これらの細胞をドナーとしてレシピエントに移植したところ、効率的な生殖系列キメラが作出された。PGCsの最適な培養条件を決定するために、PGCsの培養に使用するフィーダー細胞の選定を行なった。フィーダー細胞には、BRL細胞、STO細胞、CEF細胞を用い、それぞれのフィーダー細胞上にPGCsを播種して増殖効率の解析を行った。この実験の結果から、BRL細胞を用いた場合に最も高い増殖効率を得られることを確認した。また、ニワトリPGCsの培養液に添加する増殖因子としては線維芽細胞増殖因子2(FGF2)が最も有効であることが明らかとなった。また、培養PGCsの特徴解析を行なったところ、未分化型生殖細胞としての特徴を有した状態で増殖していることが明らかとなった。培養したニワトリPGCsの受精能を確認するため、生殖系列キメラの作出を試みた。BRLフィーダー細胞ならびにFGF2を含有する培養液によって培養したPGCsをドナー細胞として用い、ニワトリ胚発生段階14~16のレシピエント胚の背側大動脈に移植して生殖系列キメラを作製した。この結果、ドナーPGCsはキメラ胚の生

殖巢へと移住し、受精能を持つ配偶子へと分化することが明らかとなった。続いて、PGCsの重要な増殖因子の一つと推定される幹細胞因子(SCF)がPGCsの増殖に及ぼす影響を解析した。ニワトリSCF(chSCF)では4つのアイソフォームが同定されているが、本研究では哺乳類SCFのオルソログであるchSCF1およびchSCF2を選択し、そのタンパク質を安定発現するBRLフィーダー細胞を樹立し、その上でPGCsを培養することでchSCF1およびchSCF2のPGCs増殖能を解析した。その結果、chSCF2-BRLフィーダーでPGCsを培養した時、PGCsの培養効率が従来の培養系に比べて5倍以上増加することが明らかとなった。その一方で、chSCFのアイソフォームはいずれも、FGF2非存在下ではその効力を発揮せず、PGCsの増殖能力を示さなかった。その結果から、chSCFはFGF2と協同してPGCsの増殖を促進する因子であることが強く示唆された。PGCsの増殖効率が最も高かったchSCF2-BRL細胞上で増殖したPGCsが配偶子形成能を有するか否かを解析するために、生殖系列キメラを作出し、後代検定を行なった。その結果、ドナー細胞である培養PGCsに由来する後代が得られた。以上のことから、chSCF2-BRL細胞上で増殖したPGCsが配偶子形成能を有していることが明らかとなった。これらの培養PGCsはオボムコイド等のゲノム編集用の幹細胞として利用することが期待された。以上の成果は鳥類発生工学における最先端成果であり、当該領域において世界を先導する成果であるものと判断された。これらの成果を基盤とし、一層研究を進展する事により家禽細胞育種へ大きく貢献し得ると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1) Takaya T, Nihashi Y, Kojima S, Ono T, Kagami H. (2017) Autonomous xenogenic cell fusion of murine and chick skeletal muscle myoblasts. Anim Sci J 88: 1880-1885.(査読有)

2) Pramod RK, Lee BR, Kim YM, Lee HJ, Park YH, Ono T, Lim JM, Han, JY.(2017) Isolation, Characterization and In vitro culturing of spermatogonial stem cells in Japanese quail (*Coturnix japonica*) Stem Cells Dev. 26: 60-70. (査読有)

3) Oishi I, Yoshii K, Miyahara M, Kagami H, Tagami T. (2016) Targeted Mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports, 6, Article number 23980. (査読有)

4) Lee HC, Choi HJ, Lee HG, Lim JM, Ono T, Han JY. (2016) Fertilisation of cryopreserved sperm and unfertilised quail ovum by intracytoplasmic sperm injection. Stem Cells Dev, 25: 68-79. (査読有)

5) Kagami H. (2016) Perspectives on avian stem cells for poultry breeding. Anim Sci J, 87:1065-1075. (査読有)

6) Miyahara D, Oishi I, Makino R, Kurumizawa N, Nakaya R, Ono T, Kagami H, Tagami T. (2016) Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor. J Reprod Dev, 62:143-149. (査読有)

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

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

鏡味 裕 (KAGAMI, Hiroshi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：80308303

(2)研究分担者

小野 珠乙 (ONO, Tamao)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：10177264

鈴木 俊介 (SUZUKI, Shunsuke)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：30431951