

課題名	鳥類生殖細胞の凍結保存技術の高度化
課題管理者	中村 隼明 広島大学 生物圏科学研究科
実施期間	2018 - 2019 年度
概要・実施体制	<p>【2018 年度】</p> <p>研究目的は、未分化性を維持したニワトリ始原生殖細胞の培養系を樹立すること、ならびにガラス化法を用いたニワトリ始原生殖細胞の凍結保存法を開発することである。</p> <p>【2019 年度】</p> <p>本事業の目標は、ニワトリを対象とし、胚発生の過程において出現する始原生殖細胞(PGCs)の培養・凍結保存の技術基盤を高度化し、遺伝資源の凍結保存を実用可能なレベルまで引き上げることである。この目標を達成するために、当年度は(1)ニワトリ PGCs 培養系の改善と、(2)ガラス化法を用いたニワトリ PGCs の凍結保存法の開発に取り組む。(1)では、網羅的な遺伝子発現解析によってニワトリ PGCs の分化を制御する因子を探索し、機能活性化あるいは阻害によって候補因子を絞り込む。得られた知見に基づいて、サイトカインや低分子を用いてニワトリ PGCs の培養条件の改善を図る。(2)では、ガラス化能を維持したまま細胞毒性を低く抑える耐凍剤の比較選定し、ニワトリ PGCs のガラス化に最適な凍結保護液の組成を検討する。これにより、従来の緩慢凍結法では低い PGCs 融解後の回収率を向上させる。</p>
成果	<p>研究 1)未分化性を維持した PGCs 培養系の樹立: 本研究では、ニワトリ始原生殖細胞(= PGCs)の基礎培地として、Whyte ら(Stem Cell Res 2015)によって開発された低浸透圧の Avian KnockOut メディウムに FGF2 (=F)、ActivinA(=A)、insulin(=I)、ニワトリ血清(=cs)、オボトランスフェリン(=ot)、が含まれた FAIcsot 培地を用いた。FAIcsot 培地を用いてニワトリ PGCs を培養した結果、産卵品種である白色レグホーン(家畜改良センター系統)では増殖・株化ができたが、卵肉兼用品種である横班プリマスロック(家畜改良センターXS 系統)や在来品種である日本鶏 6 品種の PGCs は増殖することなく消失した。また、白色レグホーンにおける PGCs の株化効率は、オスと比較してメスが有意に低かった(12.5% vs 30%)。続いて、in vitro におけるニワトリ PGCs の増殖に重要な因子を探索するために、ニワトリ血清を含まない FAIot 培地を用いて白色レグホーンの株化 PGCs を培養した。その結果、株化 PGCs の増殖効率は、ニワトリ血清を 0.2%含む培地 (FAIcsot)の 10%程度であり、in vitro におけるニワトリ PGCs の増殖には血清由来成分が重要であることが明らかになった。続いて、ES 細胞や iPS 細胞の培養に用いられる代替血清が、株化 PGCs の増殖を支持できるか検討した。その結果、FAIot 培地に代替血清を 1%添加することで、FAIcsot 培地と同等あるいはそれ以上の株化 PGC の増殖が認められた。研究 2)ガラス化法を用いた PGCs の凍結保存法の開発: 本研究では、ニワトリ PGCs のガラス化法を開発するために、ニワトリ PGCs の浸透圧的収縮に対する耐性を評価した。白色レグホーンの株化 PGCs を 0.2~1.0M のスクロースに浸漬して経時的に観察した結果、スクロースの濃度依存的に細胞サイズが小さくなり、0.7M 以上の濃度では完全に収縮した。また、株化 PGCs のサイズは浸漬 1 分後以降変化がなかったことから、浸透圧的収縮は高張液に浸漬して 1 分以内に起こることが示唆された。続いて、株化 PGCs を 0.2~1.0M のスクロースに浸漬して 5 分後にトリバンブルー染色による生死判定を行った。その結果、株化 PGCs の生存率は 0.7M 以上の濃度で低下したことから、0.5M のスクロースでの処理が効果的であると示唆された。また、トレハロースを用いることで株化 PGCs へのダメージが低減されることを予備的に見出している。</p>