

# ウシ精巣に由来する多能性生殖幹細胞株の樹立

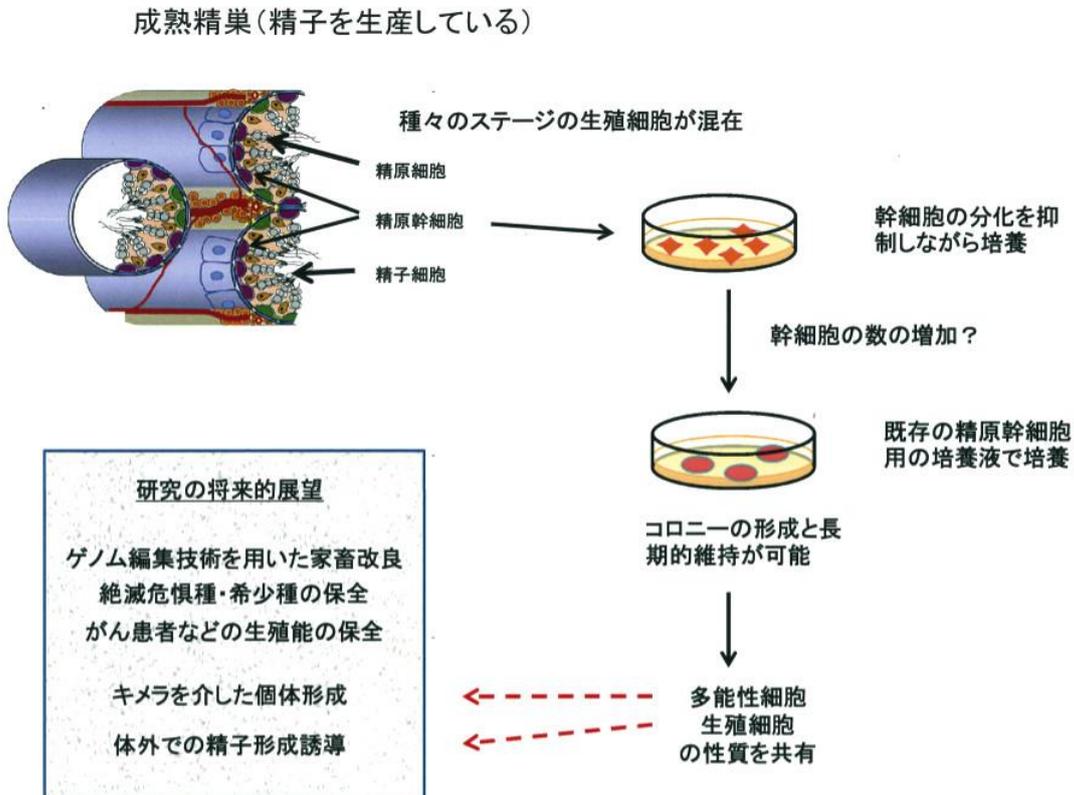
## —精子になるはずのものが多能性細胞に—

### 概要

Suyatno 京都大学大学院農学研究科 博士課程学生と今井 裕 同教授らの研究チームは、ウシの精巣に由来する細胞から、種々の組織・器官に分化する多能性細胞としての性質とともに、将来精子となる生殖細胞としての性質をも併せもつ細胞株の作製に成功しました。

多能性幹細胞は、マウスやヒト以外ではほとんど報告がなく、本研究グループが 2015 年に報告したウシ iPS 細胞が唯一のものです。しかし、この iPS 細胞は外部から遺伝子を導入することによって多能性を維持している細胞であり、家畜の場合には、外来の遺伝子の存在は応用的に限定されます。そこで体を構成する多くの細胞の中から、精巣内に存在し、ほぼ無限に精子を生産し続ける精原幹細胞に着目しました。本研究グループは、これまでに精子形成が始まっていない未成熟な精巣由来の精原幹細胞から多能性細胞を誘導することを報告してきましたが、成熟した精巣からの多能性幹細胞化の樹立は、マウスなど数種のげっ歯類を除けば、今回が世界初の成果となります。今後、家畜改良、有用遺伝資源および希少種・絶滅危惧種の保全、医学領域へのトランスレーショナルリサーチなどに、この幹細胞株を応用する道が開かれたと考えています。

本研究は、2018 年 2 月 20 日に学術誌「Molecular Reproduction and Development」にオンライン公開されました。



## 1. 背景

マウスでは、胚性幹細胞（ES 細胞）や iPS 細胞から、正常胚とのキメラ形成を介して、生殖系列細胞や組織・器官形成へと細胞分化を誘導し、これら多能性幹細胞の遺伝的バックグラウンドを次世代に伝えることが可能になっています。マウス以外では、このような性質をもつ細胞株は、多能性関連遺伝子を導入して作製したウシ iPS 細胞が知られています。しかし、外来の遺伝子導入に依存しない多能性幹細胞株はこれまでに報告がありません。一方、マウスでは、精巣由来の精原幹細胞から ES 細胞と同様な性質をもつ細胞株（GS 細胞）が知られており、キメラ形成能を示すとともにノックアウトマウスの作製も可能です。そこで、本研究ではウシの精巣から、外来の遺伝子を導入することなく多能性幹細胞株の樹立が可能か検討しました。

## 2. 研究手法・成果

研究対象とした精巣は、生後 3 カ月齢の未成熟な精巣と、生後 1 年以上の精子形成をしている成熟精巣です。両者の精巣から回収した精原幹細胞を、幹細胞の増殖と生存性を維持する働きのある成長因子、GDNF と LIF の存在下で培養しました。その結果、未成熟精巣から回収した細胞の場合はマウスの ES 細胞のようなコロニーが出現し長期培養が可能でしたが、成熟精巣からの細胞の場合は 1 週間の培養に限られました。両者の精巣から回収した精原幹細胞の数を比較すると、成熟精巣ではその数が有意に低く、幹細胞の一部は精原細胞へと分化しつつあり、結果的に幹細胞の数が減少していると考えられました。そこで、成熟精巣からの幹細胞を、パーコール密度勾配遠心法によるポジティブ選抜とジェラティンコート培養皿によるネガティブ選抜によって濃縮して培養に用いました。さらに、細胞分化の進行を止めるために、GSK3 インヒビター（阻害物質）である BIO を用いて約 2 か月間培養し、その後未成熟精巣由来の幹細胞と同じ培養条件下に移して培養したところ、長期培養が可能な幹細胞株を得ることができました。

次に、未成熟精巣と成熟精巣から得られた細胞株について、その細胞生化学的な性質を検討しました。両者とも多能性に関連する遺伝子を発現するとともに、精原幹細胞で発現している遺伝子の発現も認められ、多能性と生殖細胞としての性質を併せもつ幹細胞株と考えられました。一方で、両者のコロニーの形態には差があり、未成熟精巣由来の細胞株はマウス ES 細胞のような形態を、成熟精巣由来のそれはブドウの房のようなコロニーの形態を示しました。ウシの体外受精胚とそれぞれの培養細胞を集合させると、前者は胚とキメラを形成する能力を示しましたが、後者はキメラ形成能が極めて限定的でした。従って、未成熟精巣由来の細胞株の方がより多能性が強く、成熟精巣由来の細胞株は生殖細胞としての性質が勝っていると考えられました。

本研究の最も重要な成果は、精子形成を盛んに行っている異質細胞集団から数が限定的な精原幹細胞を濃縮し、体外で無限増殖可能な体外培養系を確立したことにあります。この系は、ヒトを含む多くの動物種で同様な培養系を樹立するうえでのモデルになり、未だ研究途上にある体外での精子形成誘導培養系開発の糸口になることが期待できます。

## 3. 波及効果、今後の予定

本研究で外来遺伝子を導入することなく多能性幹細胞株が樹立されたことから、精巣由来の細胞に限らず、胚由来の細胞も含め、多くの動物種での多能性幹細胞株の作出に重要な情報を提供すると思われます。樹立細胞株はキメラ形成能を有し、生殖細胞としての性質も有することから、キメラを介して、また将来的には体外

での精子形成誘導技術を介して、個体を作ることが可能になると期待できます。これらの能力を利用して、ゲノム編集技術を利用した家畜改良や、個体の絶対数が希少な動物種の保全技術としての応用が可能になると考えています。

ヒトではこの種の幹細胞株は依然として得られていませんが、幼少期の抗がん剤治療によって精巣から幹細胞が消失する前に幹細胞の一部を回収し、増殖させて冷凍保存することにより、成人後に保存しておいた幹細胞から精子を誘導して子供を得ることも可能になると期待されます。

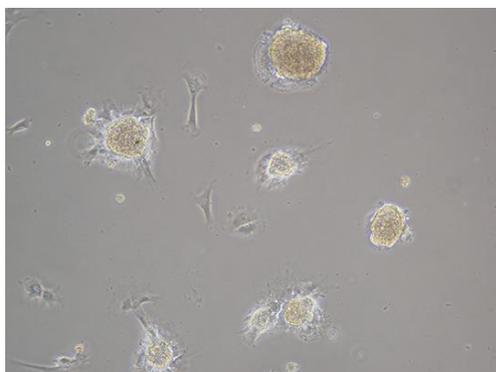
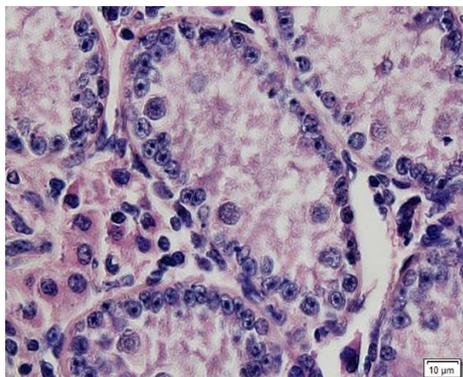
今後、本技術を応用技術としてさらに発展させるためには、キメラ胚形成後に樹立細胞が生殖細胞へと分化できるかについての検討と、樹立細胞を体外で減数分裂を経て精子形成へと誘導する技術の開発に委ねることになります。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科研費基盤研究 B の支援を受け、研究資材（ウシ精巣）は京都大学農学研究科附属牧場、岐阜県畜産研究所から提供を受けた。

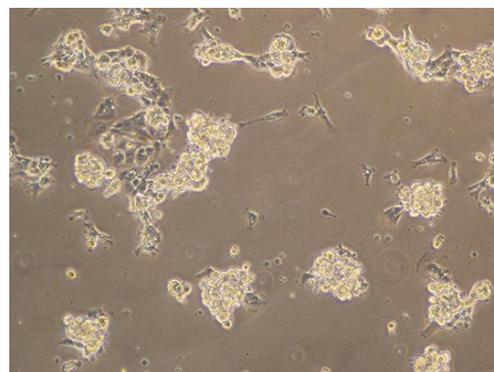
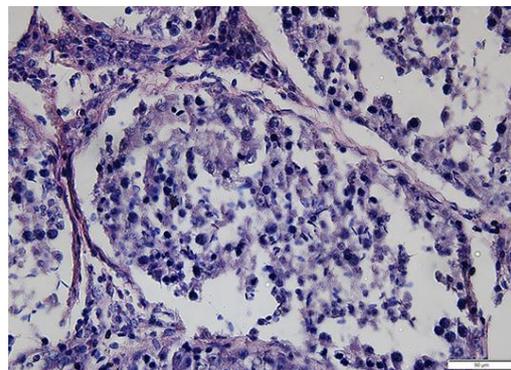
##### <イメージ図>

3 か月齢の精巣



培養液+GDNF+LIF 条件で得られたコロニー

21 か月齢の精巣



培養液+BIO で約 2 か月培養後、培養液+GDNF+LIF 条件で培養して得られたコロニー

**<論文タイトルと著者>**

タイトル : Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult testes.

著者 : Suyatno, Y. Kitamura, S. Ikeda, N. Minami, M. Yamada and H. Imai

掲載誌 : Molecular Reproduction and Development Doi : 10.1002/mrd.22958