

ニワトリ細胞育種開発への培養始原生殖細胞の活用

信州大学農学部・教授 鏡味 裕

■ 目的

ニワトリ始原生殖細胞(PGCs)を用いた生殖系列キメラニワトリ作出技術を応用することにより、家禽における育種効率の改善、遺伝資源の保存、トランスジェニックニワトリ作出などへの貢献が期待されている。しかしながら、PGCsは1つの胚に数個～100個程度しか存在しないため、PGCsを*in vitro*で大量培養することにより、上記戦略の大幅な前進が期待される。本研究では、ニワトリPGCsの大量培養系を樹立するとともに、*in vitro*において長期培養されたPGCsが配偶子を形成する能力を持ちうるか否かを検証することを目的とした。また、培養系における血清由来分化因子等の未知因子などが与える影響を排除するため、PGCsの無血清培養も同時に試みた。

■ 方法

横斑プリマスロック(BPR)の初期胚血流中を循環するPGCsをガラスマイクロピペットにて採取し、性判別を行った後に培養を開始した。この時、KnockOut DMEM(Gibco)を基礎培地として採用し、使用するフィーダー細胞およびサイトカインを改変することにより、PGCs培養系の検証を行った。また、最も増殖効率の高かった培養系を用いて長期培養(200日以上)された培養細胞を用いて生殖系列キメラニワトリを作出した。性成熟に達したキメラニワトリ個体を後代検定し、培養細胞に由来する後代が得られるか否かを検証した。

■ 結果および考察

血清を添加した実験群では、培養10日から20日を経過した時点で、活発に増殖を続けるPGC様細胞(PGC-LCs)の集団を得ることが出来た。特に、一部の培養系においてはPGC-LCsは指数関数的に増殖し、長期継代培養を行っても細胞の形態および増殖能は変化しなかった。一方、無血清培養群では、あらゆる培養条件下においてPGC-LCsの集団を得ることはできず、培養細胞は10日以内に死滅した。

血清添加培養群で得られたPGC-LCsを免疫組織化学ならびにRT-PCRにて解析したところ、PGCsに極めて酷似した未分化型生殖細胞としての特徴を保持しつつ増殖していることが示された。様々なフィーダー細胞、サイトカイン等の組み合わせを検証した結果、PGC-LCsの培養には、BRL細胞をフィーダーとして使用し、bFGFおよびSCFを添加した培地が最も適していることが明らかとなった。加えて、bFGFのみを添加した培養系においても、PGC-LCsの増殖効率に有意差は見られなかった($P>0.05$)。よって、PGC-LCsの培養系にはbFGFの添加が主要な増殖因子として作用していることが考えられる。続いて、培養200日を超えたPGC-LCsを、白色レグホンの初期胚に移植して生殖系列キメラを作出したところ、培養細胞に由来する後代を得ることに成功した。このことから、長期培養を行ったPGC-LCsは生殖系列へと寄与することが可能であり、正常な配偶子へと分化したと考えられる。

■ 結語

本研究では、配偶子分化能を有する未分化型生殖細胞としての特徴を有する培養細胞株を樹立することに成功した。これにより、PGC-LCsの培養系を応用することで、家禽育種効率の改善、遺伝資源の保存などへの貢献が期待される。さらに、*in vitro*にて長期間のスクリーニングを行うことで、遺伝子改変ニワトリ等新規有用家禽の効率的な作出法開発に応用が可能であると思われる。また、無血清培養条件下ではPGC-LCsの増殖がほとんど見られなかったため、今後さらなる検証が必要である。