

## ニジマスを用いた精原幹細胞濃縮法の開発 —代理親魚技術における移植の効率化を目指して—

海野 太一（筑波大学 生物学類）

指導教員：林 誠（筑波大学 生存ダイナミクス研究センター）

### 【背景・目的】

ドナーとなる魚種の精原細胞を近縁種の孵化稚魚の腹腔に移植すると、一部の精原細胞のみが宿主の生殖腺に生着し、ドナー由来の機能的な配偶子を生産する<sup>1</sup>。この技術は、代理親魚技術と呼ばれ、水産上有用な魚種の生産や、絶滅危惧種の保全に利用されている。しかし、精巣から分散した細胞（全精巣細胞）を、孵化稚魚腹腔に移植しても、一部の精原細胞しか生着しない。このため、代理親魚技術を多様な魚種へ応用し実用化するためには、全精巣細胞から精原細胞、特に高い生着能を有する精原細胞を濃縮し移植に用いることで、生着率を向上させることが必要不可欠である。そこで私は、生着能の高い細胞を濃縮する方法の開発を目指して研究を行ってきた。

これまでの研究から、宿主生殖腺へと生着した精原細胞は、生殖腺内で増殖し、継続して精子を生産し続けることから、精原幹細胞であると考えられてきた。実際、生着能の高い精原細胞は、組織幹細胞の特徴のひとつである Side population (SP) 中に濃縮されることが知られている<sup>2</sup>。SP とは、細胞膜透過性の蛍光色素で染色しフローサイトメーター (FCM) で解析することにより検出できる染色性の低い細胞集団である。先行研究において、生殖細胞特異的に GFP を発現する *vasa-GFP* 遺伝子導入ニジマスを用いることで、GFP 陽性の精原細胞中から SP を指標に、高い生着能を有する精原幹細胞を濃縮できることが報告されている<sup>2</sup>。しかし、SP のみを指標として、全精巣細胞から高い生着能を有する精原幹細胞を濃縮できるか否かは未だ明らかになっていない。そこで、そこで本研究では、SP のみを指標に、全精巣細胞から生着能の高い精原幹細胞の濃縮を試みた。

### 【方法】

#### ・全精巣細胞の染色

材料には代理親魚技術が確立されているニジマスの野生型と、赤色蛍光タンパク質である DsRed を生殖細胞で特異的に発現する *vasa-DsRed* 遺伝子導入ニジマスを用いた。本研究では、まず SP を検出するための蛍光色素による染色条件の検討を試みた。蛍光色素にはマウス造血細胞で SP の検出に用いられた報告がある MitoTracker Green (MTG) を用いた<sup>3</sup>。マウス造血細胞の染色は、MTG 濃度 30 nM で 37°C にて 20–30 分間行われていた。しかし、冷水魚であるニジマスの細胞は 20°C を超えると死滅してしまう。そこで、温度を 16°C に下げ、染色時間を 45 分に設定し、MTG 濃度を 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 nM と変えて最適な染色条件を検討した。SP の表現型は、幹細胞の細胞膜上に存在する ATP-binding cassette (ABC) transporter の働きによることが報告されている。そこで、染色性の低い細胞集団が SP であるか否かを判別するために、ABC transporter の阻害剤である verapamil を染色時に終濃度 30 µg/mL で加えた。また、MTG 染色が生着率に影響を与えるか否かを検証するため、FCM に供する直前にヨウ化プロピジウム (PI) を終濃度 1 µg/mL で加えた。

#### ・FCM による計測

各細胞の蛍光シグナルは、488 nm と 561 nm の sapphire laser 搭載の MoFlo XDP を用いて検出した。MTG の蛍光シグナルは 529/28 バンドパスフィルター、DsRed の蛍光シグナルは 579/16 バンドパスフィルター、PI の蛍光シグナルは 620/29 バンドパスフィルターにより検出した。SP 分画の設定は、染色時に verapamil を加えていない細胞と加えた細胞間での MTG 蛍光シグナル強度の比較をもとに行った。

#### ・qRT-PCR

SP に生殖細胞が濃縮されているかを検証するため、体細胞マーカーとして *gonadal soma-derived growth factor (gsdf)*、*11-beta-hydroxylase (11β-hyd)*、*3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-hsd)* の発現量を、生殖細胞マーカーとして *vasa*、*dead end (dnd)* の発現量を q-RT-PCR により定量し、全精巣細胞と SP 細胞間で比較した。

### 【結果・考察】

全精巣細胞を MTG 濃度 200 nM で 45 分間染色を行うことにより SP が検出された。SP 細胞の割合は、全精巣細胞の 4.82±0.46% であった。この染色条件下で PI 陽性細胞の割合は増加しなかった。以上の結果から、魚類の精巣細胞においても、MTG を用いて、細胞の生存に影響を及ぼすことなく、SP を検出できることが明らかになった。先行研究では、SP の検出に Hoechst 33342 という別の蛍光色素が用いられたが、この色素の検出には UV レーザーを必要とする。一方、本研究で用いた MTG は一般に普及している 488 nm のレーザーで検出できるため、MTG を用いた SP の検出はより汎用性の高い方法であると考えられる。

次に、SP に生殖細胞が濃縮されているかを検証するため、*vasa-DsRed* 遺伝子導入ニジマスの全精巣細胞と SP 細胞間で生殖細胞の割合を比較した。その結果、全精巣細胞中の生殖細胞の割合 (36.57±2.76%) に比べて SP 細胞中の生殖細胞の割合 (76.57±2.93%; *P*-value < 0.01; Student's *t*-test) は有意に増加していた。さらに qRT-PCR の結果においても、SP 細胞では全精巣細胞に比べ、体細胞マーカーである *gsdf*、*11β-hyd*、*3β-hsd* の発現は著しく低下し、生殖細胞マーカーである *vasa*、*dnd* の発現は上昇していた。以上の結果から、SP に精原細胞が濃縮されていることが明らかになった。

今後、移植実験により、SP 細胞の宿主生殖腺への生着率が、全精巣細胞に比べ有意に上昇していることを確認することで、本研究で開発した「SP を指標とした生着能の高い精原幹細胞濃縮法」が代理親魚技術の効率化に大きく貢献することを示していきたい。

### 【参考文献】

1. Okutsu et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2725-2729 (2006).
2. Hayashi et al. *Biol Reprod* 91: 23 (2014).
3. de Almeida et al. *Cell Stem Cell* 21: 725-729 (2017).