

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析; 癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 ……	271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 ……	281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 ……	288
第4分野			
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 ……	307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 ……	315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 ……	319
第5分野			
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 ……	327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 ……	336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 ……	342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 ……	387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 ……	395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第1分野

# 先端的創薬技術の開発に関する研究



## 創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究（平成17年度報告）

所属 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部  
研究者 松田潤一郎

研究要旨 新規発生工学技術として、レンチウイルスベクターの卵卵腔内注入法、マウス莖膜幹細胞の樹立、核移植胚特異的な異常発現遺伝子の同定、増殖力の高いウサギ ES 様細胞株の樹立、ラット ES 細胞や多能性幹細胞樹立法の検討などの開発研究を行った。

### 分担研究者

- (1) 理化学研究所バイオリソースセンター  
小倉淳郎
- (2) (株)ワイエス研究所 上田正次
- (3) 北山ラベス (株) 竹入修二

### A. 研究目的

ゲノム情報の解読の進展により、いわゆるポストゲノムの遺伝子機能解析やゲノム医学、さらにはゲノム創薬を推進するためには、目的の遺伝子を動物で発現させ、その機能解析を個体レベルで行うことが必須である。そこで、本研究では、各種の新規発生工学技術を開発し、遺伝子改変動物や疾患モデル動物を簡便・迅速に作出するなどによって、創薬研究の共通基盤とすることを目的とする。具体的には、マウスでは、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子改変動物作出技術の開発、核移植クローン技術の開発と幹細胞の開発、ウサギについては ES 細胞株の樹立、さらに、創薬研究には必須であるラットについては、とくに有用幹細胞株の樹立を目的に、ES 細胞を含む様々な胚性の幹細胞の樹立を目指した。

### B. 研究方法

#### 1) レンチウイルスベクターによる遺伝子改変動物作製法開発

1、2、および4-8細胞期胚を採取した後、マイクロマニピュレーターを用い微小ガラス針にて、ウイルス液 {CAG プロモーター+EGFP、ウイルスタイター ( $1 \times 10^5$  I.U./ml)} を 10-100 pl の範囲で卵卵腔内へ注入した。ウイルス液を加えた胚は、37°C、5% CO<sub>2</sub> の気層条件下で培養し、24 時間毎に発生段階および蛍光発色を観察した。

#### 2) 卵巣体細胞系幹細胞の樹立

生後13日の雌マウス新生仔より卵巣を取り出し、各種成長因子を含む、Kanatsu-Shinohara (1993) の雄生殖幹細胞 (male germline stem cell; GS 細

胞) 樹立用の培養液で培養を開始した。継代の途上で、stem cell factor あるいは牛胎児血清を添加し、細胞の反応を観察した。適宜、免疫染色あるいは RT-PCR によるタンパク発現および遺伝子発現解析を実施した。得られた幹細胞様細胞は、体外に取り出した卵巣の表面へガラスピペットを用いてコロニーごと注入し、その卵巣を体内へ戻すことにより、卵巣組織への再分布を観察した。

#### 3) 卵子の体外発育

無血清培地下で上記のコロニーを培養しつづけると、卵子様の細胞がコロニーから出てくる。これを長期間培養を続け、RT-PCR による遺伝子発現観察および精子との融合能の解析を行った。

#### 4) 核移植クローン技術の開発

除核卵子へドナー細胞核を注入あるいは電気融合により移植し、卵子のストロンチウムによる活性化後に胚培養および胚移植を行った。単一胚における遺伝子発現レベルの解析には、リアルタイム RT-PCR の手法を用いた。

#### 5) ウサギ ES 細胞の樹立

成熟雌ウサギに FSH を投与48時間後に hCG を投与し、同時に雄と交配することにより受精卵を得た。交配翌日あるいは3日後にそれぞれ卵管と子宮から RD 培養液の灌流により胚を回収した。必要な場合は体外培養を行い、得られた胚盤胞に酸性タイロイド液およびプロナーゼ処理を行い、透明帯を除去した。透明帯除去胚盤胞をマウス胎児線維芽細胞のフィーダー上で 12 well dish で培養を開始した。

#### 6) ウサギ核移植由来 ES 細胞の樹立

過排卵処理後のウサギより成熟未成熟卵子を採取し、遠心により紡錘糸を可視化した後、倒立顕微鏡で視認しながら除核した。卵丘細胞核を注入法により除核卵子へ移植した1時間後に、25分間隔で2回、電気による活性化を行った。2度目の活性化後に、2 mM DAMP + 50 nM tricostatin A (TSA) を含む培養液で2時間培養した。その後、TSAのみを

含む培養液で4時間培養し、洗った後に胚盤胞へ発生するまで培養した。その後は、上記と同様に ES 細胞の樹立を試みた。

#### 7) ラット ES 細胞樹立の試み

##### ①内部細胞塊(ICM)の培地組成の検討

内部細胞塊(ICM)を安定して増殖させるためには培地組成の適正化が不可欠である。マウスES細胞で用いられている培地組成をラットICM細胞の培養に適用した場合、細胞増殖の停止や細胞形態の変化(分化)が確認されている。安定した細胞増殖を保持するためには、増殖因子や栄養物組成の添加が必要と考えられるため、ヒトES細胞樹立で実績のあるbFGFやITSを加えた。また、昨年度に引き続き、血清の影響をできる限り除去するためにKSR(血清代換え培地)を用い培地組成に検討・改良を加えた。

##### ②ラット内部細胞塊(ICM)の培養条件の検討

内部細胞塊(ICM)の培養には、培地組成に加えて培養温度、培養中の酸素濃度、支持細胞の有無、細胞の単離方法なども重要な因子となる。これらの諸条件を検討する必要があるが、本年度は培養温度および支持細胞の有無について検討した。

##### ③他の多能性幹細胞の取得の試み

ES細胞と同様に多分化能を保持する性質を持つ細胞として、体性幹細胞や生殖幹細胞がある。特に造血幹細胞や生殖幹細胞の元となる始原生殖細胞については研究が進み、マウスやヒトではそれら成果が報告されている。そこで、多分化能を保持した細胞を得るために、本年度は造血幹細胞や始原生殖細胞の採取を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物福祉に配慮し、各機関の動物実験委員会等で許可を受け、動物実験に関する講習を受けた専門家が研究にあたった。

### C. 研究結果

#### 1) レンチウイルスベクターによる遺伝子改変動物作製法開発

2細胞期および4-8細胞期胚の囲卵腔内へレンチウイルスベクター( $1 \times 10^5$  I.U./ml)を顕微注入した実験区においては、培養を開始96時間後に部分的に蛍光発色細胞を有する胚盤胞期胚が、それぞれ22.3%および16.1%観察された(Table 1, Fig. 1)。しかしながら、1細胞期胚へレンチウイルスを注入した実験区では、胚盤胞への発生する胚は存在せず、蛍光発色細胞も認められなかった。また、遺伝子導入効率は4-8細胞期胚を用いた場合より2細胞期胚を用いた場合において高い傾向が認められた。なお、顕微操作の手技としては、先鋭な微小ガラス管を用いるため、比較的容易に囲卵腔内への注入を行うこ

とができた。

#### 2) 卵巣体細胞系幹細胞の樹立

マウス雄GS細胞株樹立用の培養液で培養を続けると、約1日で球状のコロニーが形成され、培養日を経るにつれてその大きさと数を増加させた。そこでstem cell factorを添加すると、コロニー表面より球形の未熟な卵子が放出されてきた。そこで、これらのコロニーの細胞が想定上の卵子の幹細胞である可能性を見極めるために、コロニーの切片を作成し、抗BrdU染色(細胞増殖の指標)と抗vasa染色を実施した。同一切片上で二重染色を行ったが、二重に染色されている細胞は存在せず、増殖細胞は体細胞であることが示唆された。全身が蛍光を発するEGFPマウス(green mouse)から上記と同様にコロニーを作出し、通常のマウスの卵巣へ移植したところ、卵胞の外膜に分布し、莢膜細胞に分化したことが示された(Fig. 2)。コロニーの遺伝子発現を観察したところ、いくつかの莢膜細胞特異的マーカー遺伝子を発現しており、本研究で得られた細胞は、莢膜細胞の幹細胞あるいは前駆細胞であることが示唆された。しかし、LHレセプターは発現せず、FSHレセプター(顆粒膜細胞で発現)を発現していた点については、検討を要する。

#### 3) 卵子の体外発育

新生仔卵巣から発育した卵子は、20日ほどで直径が20-30  $\mu$ mほどになる。この時すでに透明帯の形成が始まり、実際にRT-PCRでもZP1、ZP2、ZP3の発現が確認された。また、capacitationおよび先体反応を誘起した精子を用いて、Heochstによる膜融合解析を行ったところ、卵子に精子との膜融合能が完成していることが明らかになった。この時点で、刷込み遺伝子の解析を行ったが、まだ卵子型の刷込みは始まっていなかった。そこで、血清下で培養を行うと、40-50  $\mu$ mほどまで卵子が発育した。

#### 4) 体細胞クローン胚における遺伝子発現解析

卵丘細胞クローン(CC)胚および造血幹細胞(HSC)クローン胚とも、胚特異的遺伝子発現の開始は1細胞期後期に開始しており、いわゆるzygotic clockは正常に働いていた。CCおよびHSCとも、ドナー細胞特異的な遺伝子発現は核移植後に、正常に停止していた。しかし2細胞期における6つの胚特異的遺伝子のうち、CCで4つ、HSCで5つが発現量が低下していた。特にHSCにおいては、2-cell以降の遺伝子発現の制御に重要なHdac1(histone deacetylase-1)の発現が低く、これが後の発生低下の原因になっていることがわかった(Fig. 3)。また、実際にH3K9とH4K8の高アセチル化を確認した。

#### 5) ウサギES細胞の樹立

ウサギ胚盤胞をwell中に数個単位で培養したところ、約1週間で扁平な未分化細胞様のコロニー

が出現した。酵素を使わずに、機械的に継代を続けることにより、現在14代まで順調に増殖している。コロニー細胞はアルカリフォスファターゼ強陽性、Nanog および Oct4 陽性である。単離した細胞の形状は、核/細胞質比が高く、核小体のも存在し、マウスの ES 細胞に類似している。また、体外で胚様体も効率よく作出できることがわかった。一部のバッチは、レンチウイルスベクター法により普遍的発現プロモーター+EGFP 遺伝子を導入した。約半数以上の細胞が蛍光を発生し、蛍光コロニーを選択的にピックアップすることにより、これらの EGFP コロニーも順調に継代が続いている。

#### 6) ウサギ核移植由来 ES 細胞の樹立

体細胞を用いた再構築成功率は、用いた卵子当たり約90%、そして胚盤胞への発生率は約40-50%であった。胚盤胞への発生率はTSA処理により明らかに改善した。透明帯除去胚盤胞が培養器の底に定着していることは確認しており、今後ESの樹立を開始する。

#### 7) ラット ES 細胞樹立の試み

##### ①内部細胞塊(ICM)の培地組成の検討

ラット(F344/Jcl および F344/Jcl と ACI/N Jcl の交雑種)の子宮内で可能な限りICMを増殖させた胎生5日目胚よりICMを分離してマウスES細胞用の培地組成を基本に改良した培地(Table 2)で培養したところ、各組成の培地でそれぞれES細胞様コロニーを認めた。アルカリフォスファターゼ活性を未分化の指標としたが、3回の継代で血清軽減培養液を用いて培養したES細胞様コロニーに形態変化と細胞増殖停止を認め、アルカリフォスファターゼ陽性コロニーを確認できなかった(Table 3)。また、細胞増殖能の持続のために修正培養液を用いて培養したES細胞様コロニーはその効果を得ることなく、4もしくは5回目の継代で細胞増殖が停止し、アルカリフォスファターゼ陽性コロニーが消失した(Table 4)。

##### ②内部細胞塊(ICM)の培養条件の検討

ラット(F344/Jcl および F344/Jcl と ACI/N Jcl の交雑種)の子宮内で可能な限りICMを増殖させた胎生5日目胚よりICMを分離してマウスES細胞用の培地組成を基本に改良した培地(Table 2)で培養した。培養温度が内部細胞塊(ICM)の培養に与える影響を調べたところ、37℃および38℃で培養したいずれの条件でも明瞭なICMの増殖を認めたが、その後の継代作業によって38℃で培養したES細胞様コロニーは細胞増殖停止とともに形態変化を示した(Table 5)。また、支持細胞の有無がICMの培養に与える影響を調べたところ、支持細胞なしで培養したICMで明瞭なコロニー隆起を示したが、その後の継代作業によってそのES細胞様コロニーが消失

した。

各組成の培地でそれぞれES細胞様コロニーを認めた。アルカリフォスファターゼ活性を未分化の指標としたが、3回の継代で血清軽減培養液を用いて培養したES細胞様コロニーに形態変化と細胞増殖停止を認め、アルカリフォスファターゼ陽性コロニーを確認できなかった。また、細胞増殖能の持続のために修正培養液を用いて培養したES細胞様コロニーはその効果を得ることなく、4もしくは5回目の継代で細胞増殖が停止し、アルカリフォスファターゼ陽性コロニーが消失した。

③他の多能性幹細胞の取得の試み：本年度は造血幹細胞と始原生殖細胞の採取を試みた。造血幹細胞の採取は、その細胞の濃縮に必要な機器(FACS)等がないため、大腿骨からの灌流および培養にとどまったが、幹細胞以外の血球系で増殖するのみであった。また、始原生殖細胞の採取は、前回同様、14.5-16.5日齢の胎児で採取を行ったが、その細胞が未分化能を維持してはいたものの細胞増殖を確認することはできなかった。

#### D. 考察

##### 1) レンチウイルスベクターによる遺伝子改変動物作製法開発

胚卵腔注入においては、透明帯除去胚との共培養によるよりも、低いタイター( $1 \times 10^5$  I.U./ml)、かつ少量(10-100 pl)のウイルスベクターで遺伝子導入が可能である事が確認された。さらに、低濃度のベクターを用いるため、高濃度のウイルス液による毒性にさらされる可能性が低く、胚発生も比較的安定していると思われた。但し、2細胞期胚の胚卵腔への注入によっても、胚盤胞に発生した段階ではモザイク状の遺伝子発現しか認められなかった。今後、より安定して広範囲の細胞へ遺伝子が導入されるような方法の開発が望まれる。

##### 2) 卵巣体細胞系幹細胞の樹立

今年、雄生殖巣内にステロイドホルモン産生細胞(ライディッヒ細胞)の幹細胞が存在することが明らかにされた。本研究では、その雌の相同細胞に当たる莢膜細胞も幹細胞が存在し、体外で分裂増殖し、卵巣へ移植することにより正常に分布することを明らかにできた。この成果は、卵巣における莢膜細胞の由来や機能獲得やホルモン産生の機序などについて、in vitroの系を用いて解析できる貴重な細胞系列になると期待される。

##### 3) 卵子の体外発育

体外で卵子を発育させる技術は、卵子の体細胞との相互作用や刷込み遺伝子のインプリント獲得などの解析に重要な情報を与える。本研究では、初めて卵子単独で透明帯形成や融合能獲得がなされる

ことを初めて証明した。これまでは、顆粒層細胞や卵丘細胞が卵子の発育に必須と言われていたが、我々の用いた培養系はそれらの細胞の機能を補うこととなり、卵子の発育に必須のファクター等を明らかにすることができると期待される。特に直径40-50  $\mu\text{m}$ 程度にまで培養できたということは、刷込み遺伝子の卵子型刷込みが開始されている可能性があり、今後詳細な解析を行う予定である。

#### 4) 体細胞クローン胚における遺伝子発現解析

核移植クローン技術は、系統動物の保存および新規開発に非常に有効な手段である。しかし、マウスは未受精卵が体外での操作に敏感であるために、これらの技術は家畜に比べて高度な技術が必要であると言える。すでに発表したように、その幹細胞である造血幹細胞は逆に効率が悪く、細胞の分化度とクローンの効率には相関関係がないことが示された。本年は、それらを裏付けるための遺伝子発現解析を行い、特異的な低発現クローンドナーの原因を初めて明らかにした。低Hdac1発現は、造血幹細胞のstemness維持に重要であると言われている。組織特異的幹細胞は一定の方向へ分化するように運命づけられており、この性質は卵子内の核移植では再プログラム化されないと考えられる。今後は、クローンの効率が何によって決定されるのか、様々な条件下でのクローン実験を行い、調べる必要がある。

#### 5) ウサギES細胞の樹立

本研究では、ウサギのES様細胞株を樹立し、体外で遺伝子導入が可能であることを示すことができた。真のES細胞としては、キメラ形成能と多分化能を示す必要がある。胚様体までは分化できることが明らかなので、今後の結果に期待したい。最終的にはマウスと同様のキメラ経由法で、ジーンターゲットウサギを作出を目指す予定である。

#### 6) ウサギ核移植由来ES細胞の樹立

核移植由来胚盤胞の作出は、ヒトのテーラーメイド医療の最も期待される技術である。本研究では、ウサギをモデルとして、本技術を確立するために行った。TSAはヒストン脱アセチル化阻害剤であり、このためクロマチン構造が比較的オープンな状態にすることが知られている。そして、マウスの実験では再構築卵子をこの試薬で処理をすると有意に胚盤胞への発育と産子への発生が改善することが知られている。本研究においても、これまでのウサギの核移植胚盤胞の発生率(20-30%)よりも明らかに改善し、40-50%となった。また、発生速度も向上している。このため、良好な胚盤胞が得られており、受精卵由来ES細胞と同様に、継代可能な未分化細胞として樹立できる可能性が高い。今後は、ドナー細胞の採取個体への分化細胞の移植実験まで進め

る予定である。

#### 7) ラットES細胞樹立の試み

平成17年度は、昨年度同様に、ラットICM細胞の培養条件を培地組成(血清や添加物)と培養条件(培養温度と支持細胞の有無)に着目して検討した。所見等の結果、ラットICM細胞の明瞭な増殖を示す培養条件を示すことができたが、未だ、安定したES様細胞の増殖のための条件を得ることができなかった。しかしながら、支持細胞の有無の検討によるES細胞様コロニーの出現は今後の研究に方向性を示す結果となったと言える。引き続き、培養条件を検討し継代培養に耐える培地組成と培養条件の確立を目指す。

### E. 結論

効率良い遺伝子改変マウス作成法としてレンチウイルスベクターのマウス胚卵腔内への顕微注入法を検討したところ、比較的容易な顕微操作で、低タイターかつ少量のウイルスベクターで遺伝子導入が可能であることが判り、簡便で効率の良い手法として期待される。

マウスの莢膜細胞幹細胞の樹立を行い、その分離と培養に成功した。卵子を体外で支持細胞無しで40-50  $\mu\text{m}$ 程度にまで培養する技術を確立した。核移植胚特異的に異常発現する遺伝子を同定した。

ウサギの受精卵由来ES細胞および核移植胚由来ES細胞の樹立を試みた。その結果、極めて増殖力の高いウサギES様細胞を樹立した。また、核移植由来ES細胞樹立のための核移植胚盤胞の効率的作出法を確立した。

樹立困難とされているラットの胚性幹(ES)細胞を中心に多能性幹細胞を樹立することを目的に、マウスES細胞用培地を基本に、添加物質、温度、継代方法等の培養条件を検討したが、ES細胞様コロニーが継代初期に認められるにとどまった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim J-M, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J Cell Sci* (in press) 2006.
- Miki H, Ogonuki N, Inoue K, Baba T, Ogura A. Improvement of cumulus-free oocyte maturation in vitro and its application to microinsemination with primary spermatocytes in mice. *J Reprod Dev* (in press) 2006.
- Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Ogonuki N, Miki H, Kohda T, Ogura A, Yokoyama M,

- Kaneko-Ishino T, Ishino F. *Nat Genet* 38:101-106, 2006.
4. Inoue K, Wakao H, Ogonuki N, Miki H, Seino K, Nambu-Wakao R, Noda S, Miyoshi H, Koseki H, Taniguchi M, and Ogura A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. *Curr Biol*, 15: 1114-1118, 2005.
  5. Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Naruse M, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F: Variation in gene expression and aberrantly regulated 1 chromosome regions in cloned mice. *Biol Reprod* 73:1302-1311, 2005.
  6. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Miki H, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Anchorage-independent growth of mouse male germline stem cells in vitro. *Biol Reprod*. (in press).
  7. Ogura A, Ogonuki N, Miki H, and Inoue K. Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. *Int Rev Cytol*, 246: 189-229, 2005
  8. Kanatsu Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., and Shinohara, T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol Reprod.*, 72: 985-991, 2005
  9. Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, and Shinohara T. Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod*, 20: 2376-2382, 2005
  10. Tanemura K, Ogura A, Cheong C, Gotoh H, Matsumoto K, Sato E, Hayashi Y, Lee HW, and Kondo T. Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 281: 196-207, 2005
  11. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takehashi M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*, 132: 4155-63, 2005.
  12. Kwon J, Mochida K, Wang YL, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, and Wada K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, 73: 29-35, 2005
  13. Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Mochida K, Hatori M, Okada H, Takeiri S, Shimosawa N, Nagashima H, Sanakai T, and Ogura A. Differential development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids. *Mol Reprod Dev*, 72: 411-417, 2005
  14. Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, and Miki H. The present status of somatic cell cloning. In: *Genetically Engineered Mice*, Sundberg JP and Ichiki T (eds), CRC Press, Boca Raton, U.S.A., pp125-130, 2005
  15. Yamagata K, Yamazaki T, Yamashita M, Hara Y, Ogonuki N, and Ogura A. Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis*, 43: 71-79, 2005
2. 学会発表  
 Narumi Ogonuki, Keiji Mochida, Akie Shinmen, Mika Ohkawa, Hiromi Miki, Kimiko Inoue, Martin Fray, Kazuo Moriwaki, Yuichi Obata, Atsuo Ogura: Microinsemination using male germ cells from epididymides and testes stored in freezers. *International Embryo Transfer Society*, Jan. 2006, Orlando, U.S.A.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

Table1 種々の発生段階の胚細胞へLenti-virusを注入した場合の発生率とTransgene発現率

受精卵の発生段階	実験回数	供試卵数	胚盤胞形成率(%)	Transgene発現率(%)
1cell	2	77	7.8	0.0
2cell	4	223	90.1	22.3
4-8cell	4	219	95.9	16.1

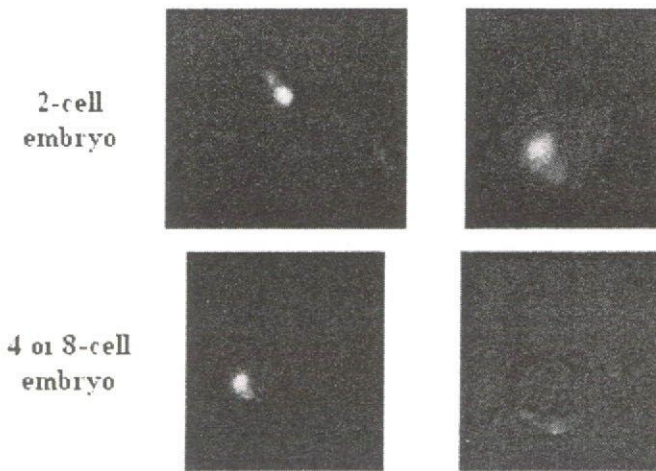


Figure 1. Lenti virusを2-cell あるいは 4-8cell胚周囲卵腔へ注入し、72時間培養した後の胚の様子(緑色蛍光)

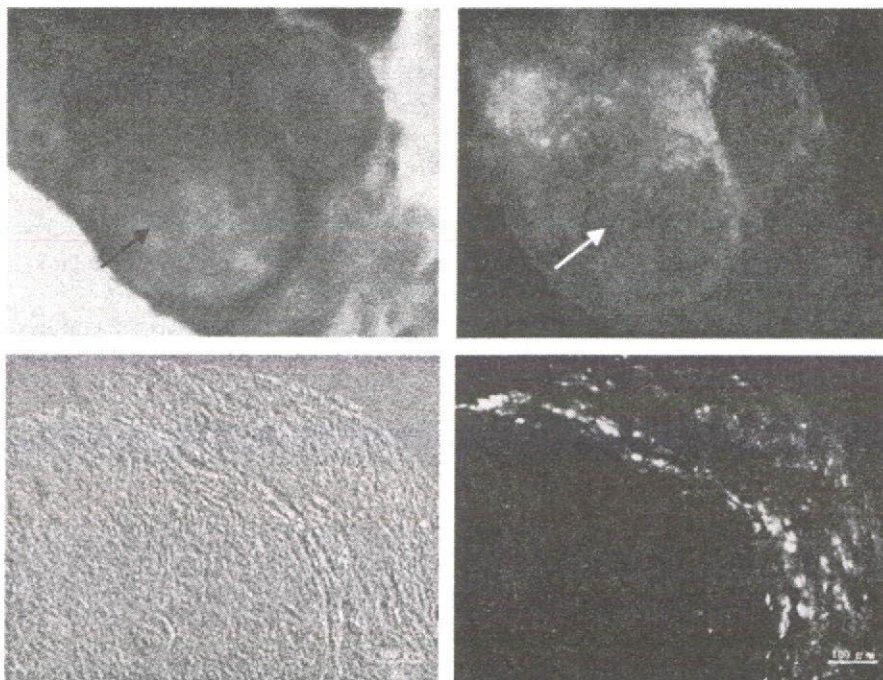


Figure 2. EGFP 蛍光を発する莖膜幹細胞を卵巣へ移植した後の明視野顕微鏡像 (左) と蛍光像 (右)。上は卵胞 (矢印) を取り出した卵巣組織。卵胞の周囲に正常に分布していることを示す。下はその凍結切片像。

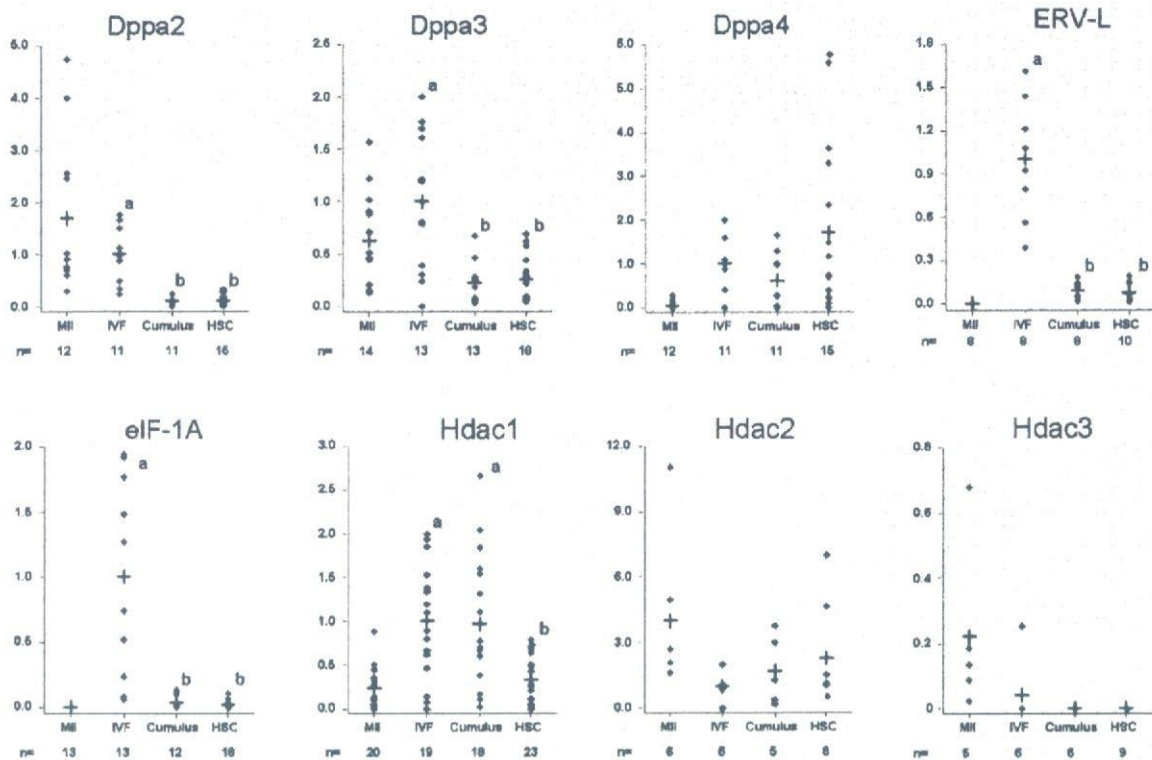


Figure 3. 体細胞核移植クローン胚 (Cumulus, 卵丘細胞クローン ; HSC, 造血幹細胞クローン) の遺伝子発現。Dppa2, Dppa3, ERV-L, eIF-1A が2つのクローンに共通して発現が低下している。また、Hdac1 は造血幹細胞特異的に低下している。

Table 2. ラットES細胞用培養液の組成

	標準培養液	修正培養液	血清軽減培地
基本培地 (DMEM)	80.0 mL	80.0 mL	80.0 mL
ES細胞様血清 (FCS)	20.0 mL	20.0 mL	20.0 mL
血清代替培地	—	—	15.0 mL
非必須アミノ酸溶液 (NEAA)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
2-メルカプトエタノール [7μL/10mL 希釈液]	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
ヒトLIF [最終濃度:1000U/mL]	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
添加物(bFGF または ITS)	—	20ng/mL または 1.0 mL	—

Table 3. ラット胚盤胞期胚由来細胞樹立の培養条件 (血清軽減有無の検討)

培養環境	初代培養に供した胚の数	継代数		
		1	2	3
標準培養液				
F344/Jcl	17	9 (53%)	4 (25%)	2 (12%)
F1 (F344/Jcl x ACI/N Jcl)	18	10 (56%)	4 (25%)	3 (17%)
血清軽減培養液				
F344/Jcl	17	6 (35%)	2 (12%)	0 (0%)
F1 (F344/Jcl x ACI/N Jcl)	10	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)

\*1 培養温度 : 37°C

\*2 括弧内は継代培養できた胚の割合

Table 4. ラット胚盤胞期由来細胞樹立における培養条件（添加物の影響）

培養液の環境	培養した 胚数	継代数			
		1	2	3	4 or 5
標準培養液					
F344/Jcl	33	20 (61%)	10 (30%)	5 (15%)	2 (6%)
F1 (F344/Jcl x ACI/N Jcl)	—	—	—	—	—
修正培養液 (bFGF添加)					
F344/Jcl	14	8 (57%)	5 (36%)	1 (7%)	0 (0%)
F1 (F344/Jcl x ACI/N Jcl)	10	5 (50%)	5 (50%)	2 (20%)	1 (10%)
修正培養液 (bFGF添加)					
F344/Jcl	16	8 (50%)	2 (13%)	1 (6%)	0 (0%)
F1 (F344/Jcl x ACI/N Jcl)	7	4 (57%)	3 (43%)	0 (0%)	0 (0%)

\*1 培養温度：37℃

\*2 括弧内は継代培養できた胚の割合

Table 5. ラット胚盤胞期胚由来細胞樹立の培養条件（培養温度の検討）

培養環境	初代培養 に供した 胚の数	継代数		
		1	2	3
37℃	18	10 (56%)	4 (22%)	2 (11%)
38℃	9	3 (33%)	1 (11%)	0 (0%)

\*1 F344/Jcl を使用

\*2 括弧内は継代培養できた胚の割合



---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社