

## E. 結論

本研究において dynein 機能減弱によるアルツハイマー病関連蛋白群の細胞内蓄積が再現されたことから、過去の検索において確認されたアルツハイマー病関連蛋白群の加齢性細胞内蓄積に、dynein 機能の加齢性減弱が大きく関与していることが明らかとなった。

近年の研究報告では、アルツハイマー病のみならず他の様々な加齢性神経変性疾患においても「各種疾患関連蛋白群の細胞内蓄積」が非常に大きな注目を浴びており、この細胞内蛋白異常蓄積こそが細胞ストレスを誘発する原因となり、脳神経系の機能低下＝認知機能低下につながるのではないかと考えられている。

また、大部分の神経変性疾患患者は、疾患関連因子群の過剰発現や蛋白の過剰産生を伴わない孤発性患者（＝加齢性に発症する）であることから、加齢と細胞内蛋白異常蓄積との関係を明らかにすることは上記疾患群の治療法確立に向けた急務でもある。

このことから、本研究によって明らかとなった dynein 機能減弱と細胞内蛋白蓄積との深い関係性は、非常に重要な意義を持つと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

○Kimura N, Ishii Y, Suzuki S, Negishi T, Kyuwa S, Yoshikawa Y. A $\beta$  upregulates and colocalizes with LGI3 in cultured rat astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 2006; In Press

○Kimura N, Takahashi M, Tashiro T,

Terao K. Amyloid  $\beta$  up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid  $\beta$ -related neuritic degeneration. *J Neurosci Res* 2006;84:782-789.

○Kimura N, Yanagisawa K, Terao K, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Age-related changes of intracellular A $\beta$  in cynomolgus monkey brains. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;1(2):170-80.

○Kimura N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Astroglial responses against A $\beta$  initially occur in cerebral primary cortical cultures: species differences between rat and cynomolgus monkey. *Neurosci Res* 2004;9(3):339-46.

Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci* 2004;4(20):4894-902.

○Kimura N, Nakamura Si, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Presenilin-2 in Cynomolgus Monkey Brain: Investigation of Age-Related Changes. *Primates* 2004;5(3):167-75

### 2. 学会発表

・The 10<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease and Related

Disorders

(第10回国際アルツハイマー病及び関連疾患学会)

2006年7月 スペイン国マドリッド

・日本認知症学会 2006年10月 広島

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 実験用カニクイザルを用いた 閉経後骨粗鬆症モデルの開発

分担研究者 吉田 高志

（独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター）

### 研究要旨

実験用カニクイザルを対象とし、閉経後骨粗鬆症のモデル化を試みた。一つ、は自然発症モデルとして老齢カニクイザルの全身骨量を六ヶ月間隔で測定し、骨量の変化の調査を行ったものである。他方は、成熟カニクイザルで卵巣摘出を行って骨量・骨密度の変化を観察したものである。寿命が30年以上にのぼるカニクイザルで閉経後骨粗鬆症を実証することができた。さらに、卵巣摘出による明らかな骨量減少を実証する事ができた。カニクイザルはヒトの閉経後骨粗鬆症の有力な動物モデルとなる。

### A. 研究目的

閉経後骨粗鬆症すなわち卵巣機能停止に伴う骨量減少には、適切な動物モデルが無い。そこで、霊長類センターのAging farmに保持されているカニクイザルを対象として二波長X線骨測定装置によって六ヶ月間隔で同一個体で測定を繰り返すという縦断的調査を実施している。本年度もこれを継続し閉経後骨粗鬆症のモデルを開発することを目的とした。また、閉経後骨粗鬆症とは卵巣機能停止に伴う骨量減少であることから、成熟個体で卵巣摘出を行って骨量低下を誘発することがよく行われている。しかし、骨量・骨密度には個体差が大きく、卵巣摘出群と対照群とで測定値をそのまま比較することはできない。一般的には実験初期値を100%として二群の比較が行なわれている。しかし、この様なデータ操作を

行ってさえも個体差が大きく医薬品効果を検証することが困難である。そこで、その困難を克服する方途についても検討を加えることとした。

### B. 研究方法

#### 閉経後骨粗鬆症の自然発症モデルの検出

霊長類センターのAging farmに保持されているカニクイザルを対象として二波長X線骨測定装置によって六ヶ月間隔で測定を実施した。測定は塩酸ケタミンによる麻酔下で行った。

#### 卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症の実験モデルの作出

卵巣摘出(OVX)群（7頭、 $14.3 \pm 1.8$ 歳齢）及び対照群（7頭、 $15.1 \pm 2.5$ 歳齢）を使用した。動物の全身並びに腰椎骨の測定には二波長X線骨測定装置を用いた。得られたそれぞれの測定値

には、一時回帰式( $Y=aX+b$ )を適合させ、相関係数( $r$ )、勾配( $a$ )及び初期値( $b$ )を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、霊長類センターが(独)医薬基盤研究所に移管される前に始められ、前機関での実験遂行指針に従って行われた。また本研究の実施者は、バイオハザード委員会及び動物委員会が主催する講習会を受講した。

### C. 研究結果

#### 閉経後骨粗鬆症の自然発症モデルの検出

6歳齢から36歳齢にいたる34頭のメスカイクイザルで得られた全身骨量(BMC)のおおよそ4年間の測定値を図1に示す。全身BMCは、おおよそ130gから250gを超えるものまで個体差の大きなものであった。しかし、25歳齢以下では測定値に若干の変動はあるものの個体ごとではほぼ一定の値を呈していた。そして25歳齢を超える個体では、なかにはBMCの減少を呈するものも見られるが、減少を呈し始める年齢も個体差の大きなものであった。

#### 卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症の実験モデルの作出

対照(INT)群と卵巣摘出(OVX)群の個体での腰椎骨密度(BMD)の変化の典型例を図2に示した。上段に示した対照群の個体では、勾配が小さいため( $a=0.003$ )回帰式の適合は有意ではなかった( $r=0.0500$ )が、初期値の推定値(0.781)は実測値とよく一致していた。他方、下段に示したOVXの個体では回帰式は有意に適合した( $r=0.8568$ ,  $p<0.01$ )。また、卵巣摘出による骨密度の減少も検出された( $a=-0.059$ )。さらに、初期値の推定値(0.993)も、実測値とよく一致した。

INT群とOVX群の各7頭での測定値のまとめを表1に示す。それぞれ全身(TB)及び腰椎骨(L)の骨量と骨密度を示す。すべての測定項目で、OVX群で顕著な減少が検出された。

### D. 考察

我々の観察によってカニクイザルの閉経は、25歳齢頃にある事がわかっている。そこで今回の25歳齢以上のメスカイクイザルに見られる骨量の減少は、自然発症による閉経後骨粗鬆症であるものと判断される。実験動物で自然発症による閉経後骨粗鬆症が報告された唯一の例であろう。しかし、骨量減少が認められる年齢の個体差が非常に大きい。そのためにこれらの個体を対象としてモデル実験を行うことはきわめて困難である。骨量維持のための薬効試験をしようとして、ある年齢以上のカニクイザルを使用しても、試験期間中に骨量が保持されていることが薬効によるものなのか、単なるその個体の特性によるものなのかの判断はできない。また25歳齢以上の個体を一定数まとめて試験に供与することは現実的ではない。

そこで卵巣摘出による実験モデルの作出を試みたわけである。同様な試みは多くある。ラット・マウス等の小型実験動物(モデリング動物)以外でも、ビーグル犬・ヒツジ・豚等で報告がされており、また霊長類(リモデリング動物)でもバブーン・アカゲザル・カニクイザル等で報告されている。しかし、卵巣摘出後に明らかに骨量減少が観察されているのは、カニクイザルを対象としたJerome et al., と我々の報告のみである。これは、他の研究では、一年の一定時期に卵巣機能が停止する季節繁殖性の動物を対象としたために

骨量減少を誘発できなかつたのかもしれない。これらの動物では、卵巣機能停止に伴う骨量低下を防御する機構を有している可能性が考えられる。他方、通年繁殖の動物を対象としていても、ピーク・ボーンマスに達する以前の、まだ成長過程にある個体に卵巣摘出を施したため、卵巣摘出群で骨成長の遅延を誘発し、骨成長が継続した対照群との間に違いが生じたという可能性が考えられる。

我々の研究によるとカニクイザルがピーク・ボーンマスに達する年齢は9歳齢である。Jerome et al., も我々も10歳齢以上のカニクイザルで卵巣摘出を行い OVX 群で骨量の低下を誘発することができた。この様な我々のモデルこそ、真の意味での閉経後骨粗鬆症の実験モデルであるといえよう。

## E. 結論

カニクイザルでの自然発症の閉経後骨粗鬆症を見いだすと共に、10歳齢以上のカニクイザルに卵巣摘出を施して骨量低下を誘発し閉経後骨粗鬆症の実験モデルを作出した。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

## サルを用いた発生工学領域での基盤技術開発 —カニクイザルES細胞：TRSK-1株の樹立—

山海 直 医薬基盤研究所 主任研究員

研究協力者：下澤律浩（医薬基盤研究所 研究員）

岡田浩典（医薬基盤研究所 協力研究員）

羽鳥真功（医薬基盤研究所 協力研究員）

### 研究概要

これまでの厚生労働科学研究費プロジェクトにおいて、サル類の遺伝的多様性を示しサル種ごとに各種技術開発を実施する必要性を示してきた。とくに良質な卵を得るための技術が発生工学的研究を発展させる上できわめて重要であるという結論を得て、基盤技術の開発に従事してきた。今回、これらの技術を結集し、新規なカニクイザルのES細胞の樹立に成功した。この細胞株は種々既知の未分化マーカーの発現を認め、3胚葉に分化する多分化能を有していることが確認された。また、リポフェクションによりマーカー遺伝子であるYFP-mitoをこのES細胞に導入することに成功した。今回樹立したES細胞は、厚生労働科学研究への応用にきわめて有用であると考えている。

### A. 研究目的

ES細胞はさまざまな細胞、組織に分化することが可能な細胞として、再生医療、細胞治療といった分野への応用が期待されている。ES細胞の研究はマウスを用いて多くなされてきたが、マウスのES細胞は霊長類のそれと形態、特性等が異なることが知られている。そのため、ヒトへの応用を考えたときに、ヒトと同じ霊長類であるサル類で研究を実施することはきわめて重要である。しかし、これまでに樹立されたサル類のES細胞はごくわずかであり、樹立するために高度な技術が必要と考えられている。近年、サル類ES細胞を

用いた研究が実施されるようになりその有用性ととも多くの課題がみえてきた。

カニクイザルはサル類ではじめてES細胞が樹立されたサル種であり、医学研究に広く用いられている。カニクイザルのES細胞はその特性がマウスと異なっていることが知られている。また、遺伝的多様性を有しているサルはその株ごとに異なった特性をもっている可能性がある。そのためにも複数の株でES細胞の特性を解析することの意義は大きい。また、各細胞株の個性を見出すことは研究の幅を拡大することにつながる。

今回、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで繁殖育成されたカニクイザルを用いて受精卵を作出し、その受精卵よりES細胞の樹立に成功した。その株のES細胞としての基本的特性について解析し、さらに、外来遺伝子の導入法について検討したを試みた。

## B. 研究方法

当センターで育成されたカニクイザルに卵胞発育刺激を施し卵胞から卵を採取した。採取した卵のうち第1極体を放出している成熟卵を用いて顕微授精を行った。顕微授精後、極体を放出し、かつ2つの前核を有する受精卵を正常受精卵として体外培養した。体外培養によって発生した2個の胚盤胞の透明帯をプロナーゼ処理により除去した。胚盤胞の栄養外胚葉は抗サル血清処理後、補体処理を行うことで取り除き、内部細胞塊を単離した。内部細胞塊は予め準備した不活化マウス胎児繊維芽（フィーダー）細胞の単層上に移して、静置、培養した。このうち200500 $\mu$ m程の細胞集団に成長した1個の内部細胞塊を用いてES細胞の樹立を試みた。注射針で小塊に刻み、コラゲナーゼ処理を行った後にそれら小塊を新たなフィーダー細胞上に移した。この操作を再度行い、多数のコロニーが形成されたところで、トリプシン・コラゲナーゼ混合液処理後、ピペッティング処理してコロニーを小塊にし、新たなフィーダー細胞上に移した。継代培養はこの操作を繰り返した。このようにして樹立されたES細胞は、多分化能の検定のために、浮遊培養による胚様体形成および免疫不全マウスへの移植を行った。また、培養下のES細胞の未分化マーカーの発現を確認するた

めに、アルカリフォスファターゼ活性の検索およびFACS解析によりSSEA-1・SSEA-3・SSEA-4・TRA-1-60・TRA-1-81・Oct-3の発現を調べた。

さらに、このES細胞への外来遺伝子の導入を次のようにして検討した。ES細胞はリポフェクションの実施当日までに、24-wellプレート中のフィーダー不活化したマウス胎児繊維芽細胞上にES細胞を播種し、ES細胞コロニーが各ウェルの底面の60-80%を占めるまで培養した。これらのwellでDNAとLipofectamineTM2000を混合することとしてカチオニックリポソーム-DNA複合体を調整し各wellに加えることでリポフェクションによる導入を誘導した。

（倫理面への配慮）

本研究は医薬基盤研内の動物委員会の規則にのっとり実施した。

## C. 研究結果

カニクイザルより採取した卵を用いた顕微授精により2個の胚盤胞を得ることができた。この2個のうち1個の胚盤胞よりES様細胞のコロニーを形成させることに成功した。さらに、この細胞にYFP-mito遺伝子を導入し、安定的にYFPを発現するES細胞を得ることができた（図1左）。この細胞株をTRSK-1と命名した。

この細胞の特性を解析したところ、アルカリフォスファターゼ活性を有していることが確認された（図2）。また、胚様体をの形成能を認めた（図1右、図3）。さらに、免疫不全マウスへ細胞を移植したところテラトーマを形成し、組織学的検索により内胚葉、中胚葉、および外胚葉由来の組織が確定された認められた（図4）。

細胞マーカーを検索した結果を表1に示した。SSEA-1、-3および-4はそれぞれ陰性、陰性、陽性を示した。また、TRA-1-60および-81についてはいずれも陽性であった。Oct-4についても陽性であった。

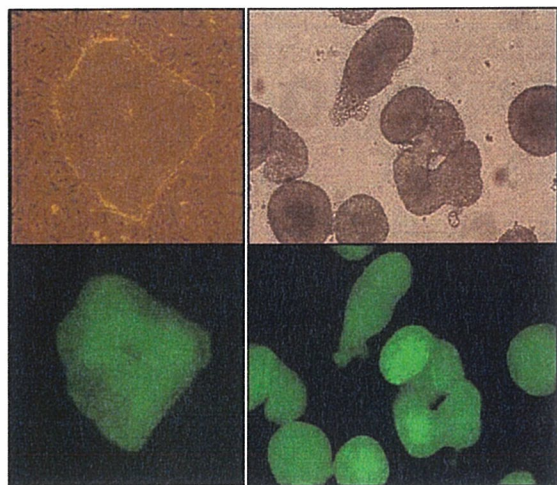


図1 TRSK-1株のコロニー（左）と胚様体（右）。下段はYFP-mitoの蛍光を発しているもの。



図2 アルカリフォスファターゼ活性を示しているTRSK-1のコロニー。

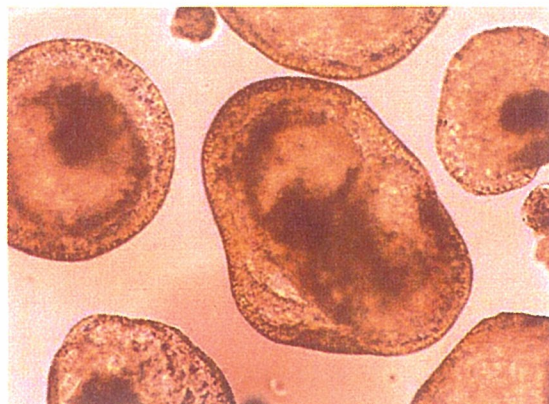


図3 TRSK-1株から形成した胚様体。

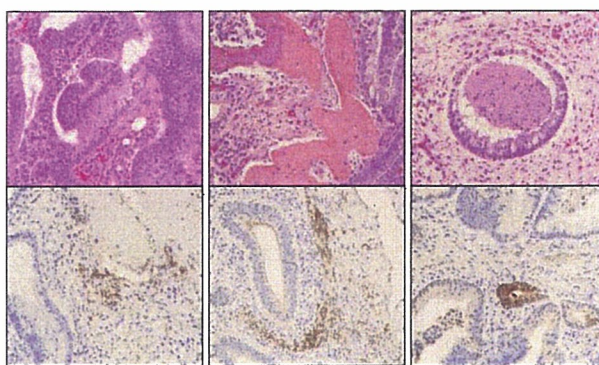


図4 TRSK-1の3胚葉への形成能の検索。左は外胚葉（神経管）、中央は中胚葉（骨）、右は内胚葉（腺）。上段はHE染色、下段は免疫染色で左からそれぞれNeuron specific enolase、Smooth muscle actinおよびa-1 Fetoproteinを検出している。

表1 TRSK-1の細胞マーカーの検出

項目	陽性(+)/陰性(-)
SSEA-1	-
SSEA-3	-
SSEA-4	+
TRA-1-60	+
TRA-1-81	+
Oct-4	+



## D. 考察

これまでにカニクイザル、コモンマーモセットにおいてES細胞が樹立されている。これらの細胞を用いた研究により、ES細胞の認識がかわってきたと言える。数種類の動物でES細胞が樹立されているが生殖細胞への分化能が確認されているのはマウスのみである。すなわち、マウス以外のES細胞では、生殖細胞以外の細胞へ分化するは多分化能はが確認されているが全能性については未知である。

今回樹立した細胞においても同様である。しかし、胚様体の形成と樹立した細胞由来のテラトーマの検索により3胚葉へ分化する能力を有していることが証明され、さらに、サル類のカニクイザルES細胞の特性である細胞マーカーが検出されている。サル類のES細胞はマウスのそれとは細胞マーカー特性が異なっており、むしろヒトのES細胞に近いことが知られている。そのため、マウスで開発された技術をヒトに応用する前の橋渡しの研究においてきわめて重要な材料となる。また、サル類はマウスの近郊近交系のような遺伝的統御がなされていないため、個体ごとに個性を持っている。卵においても同じことが言え、樹立されたES細胞においても当然、遺伝的な個性を有していると考えられる。

今回、樹立したカニクイザルのES細胞は、これまでに報告されているカニクイザルと同様の特性を有していることを認めている。今後、分化誘導実験等を試みることでこの株の個性が明らかになるだろう。マウスやヒトES細胞との比較、他のカニクイザルES細胞との比較実験が重要である。今回樹立したカニクイザルのES細胞がヒトのES細胞

を用いた臨床を目的とした安全性試験、効力の検証等に有用であることは明らかである。

## E. 結論

新規なカニクイザルのES細胞 (TRSK-1) を樹立した。この株のES細胞としての基本特性を解明し、多分化能を有することが確認された。このES細胞はヒトのES細胞の研究、臨床応用を目指した研究等に有用である。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shimozawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T. Comparison of methods to stimulate ovarian follicular growth in cynomolgus and African green monkeys for collection of mature oocytes. *Theriogenology*, in press.

山海 直、下澤律浩、生殖医療のためのサル類を用いた基盤研究, *J. Mamm. Ova Res.*, 2006, 23: 163-175.

### 2. 学会発表

羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、京野志保、蛭澤 隆、山海 直、顕微鏡下培養システムを用いたウサギ受精卵の発生動態の解析、第47回日本哺乳動物卵子学会、東京、2006年5月。

羽鳥真功、岡林佐知、小野孝浩、羽成光二、大藤浩美、岡田浩典、下澤律浩、藤本浩二、山海 直、吉田高志、育成中に2頭で同居飼育しているカニクイ

ザルの体重増加推移の解析、第53回日本実験動物学会総会、神戸、2006年5月。

揚山直英、鯉江 洋、中村紳一郎、金山喜一、酒井健夫、小野文子、寺尾恵治、山海 直、カニクイザルにおける心不全病態を呈する拡張型心筋症、第53回日本実験動物学会総会、神戸、2006年5月。

岡田浩典、下澤律浩、羽鳥真功、三木洋美、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎、山海 直、カニクイザルの卵胞発育誘起に対する年齢の影響、第53回日本実験動物学会総会、神戸、2006年5月。

大藤圭子、今井統隆、福西克弘、有馬昭宏、藤本浩二、下澤律浩、山海 直、吉田高志、カニクイザル血清中胎盤性生殖腺刺激ホルモン $\beta$ サブユニット( $\beta$ -mCG)測定による妊娠診断の試み、第22回日本霊長類学会、大阪、2006年7月。

京野志保、京野廣一、中村紳一郎、大和田哲男、藤井和博、羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、山海 直、カニクイザル各種臓器の凍結保存、第22回日本霊長類学会、大阪、2006年7月。

下澤律浩、岡田浩典、羽鳥真功、吉田高志、山海 直、高齢カニクイザルの妊孕性-若齢個体との比較-、第22回日本霊長類学会、大阪、2006年7月。

中村紳一郎、岡林佐知、揚山直英、鯉江 洋、山海 直、小野文子、藤本浩二、寺尾恵治、老齡アフリカミドリザルに認められた3種の異なったアミロ

イド症、第22回日本霊長類学会大会、大阪、2006年7月。

小林紗貴子、野田彩香、越智 梢、本橋秀之、佐藤嘉兵、山海 直、加田日出美、前胞状卵胞および卵母細胞-顆粒膜細胞複合体培養における組織の扁平化に関する解析、第24回日本ヒト細胞学会、東京、2006年7月。

京野志保、京野廣一、中村紳一郎、大和田哲男、藤井和博、羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、山海 直、カニクイザル卵巣・精巣の磁場を用いた新規な凍結法の試み、第24回日本受精着床学会、群馬、2006年9月。

山海 直、サル類を用いた再生医療研究、シンポジウム：再生医療に向けた研究の最前線、第24回日本ヒト細胞学会、東京、2006年7月。

中村紳一郎、岡林佐知、片貝祐子、斉藤直之、小野文子、山海 直、寺尾恵治、鼠径リンパ節への転移を認めたカニクイザルの子宮内膜症、第142回日本獣医学会学術集会、山口、2006年9月。

千葉敏雄、草野満夫、原田香奈子、渡邊慎介、絵野沢信、山海 直、福与恒夫、前田英樹、三輪光春、鹿山貴弘、新しい硬性蛍光内視鏡とその胎児手術への応用、第19回日本内視鏡外科学会総会、京都、2006年12月。

Hatori M, Okada H, Shimosawa N, Sankai T, Behavior of embryonic stem cells of the cynomolgus monkey during culture. 第12回サル類疾病国際ワークショップ、つくば市、2006年

12月.

Okada H, Shimoszawa N, Hatori M, Sankai T, Cynomolgus monkey embryonic stem cells. 第12回サル類疾病国際ワークショップ、つくば市、2006年12月.

Hara M, Ono F, Takano J, Okabayashi S, Fujimoto K, Sankai T, Yashida T, Terao K, Mukai R, Pathogenicity of simian retrovirus Type D (Tsukuba), 第12回サル類疾病国際ワークショップ、つくば市、2006年12月.

Ageyama N, Koie H, Nakamura S, Kanayama K, Sakai T, Ono F, Terao K, Sankai T, Severe heart failure associated with dilated cardiomyopathy models in cynomolgus monkey. 第12回サル類疾病国際ワークショップ、つくば市、2006年12月.

Shimoszawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T, Reproductive results of aged cynomolgus monkeys (16-23 years old). 第12回サル類疾病国際ワークショップ、つくば市、2006年12月.

Shimoszawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T, Intracytoplasmic sperm injection and establishment of embryonic stem cells in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*), THE 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, January 7-9, 2007, Kyoto, Japan.

羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、京野志保、蛭澤 隆、山海 直、顕微鏡下培養システムを用いたウサギ受精卵の発生動態の解析、平成18年度日本実験動物技術者協会関東支部総会および第32回懇話会、東京、2007年2月.

岡田浩典、下澤律浩、羽鳥真功、山海直、カニクイザルES細胞へのリポフェクションによる遺伝子導入と安定発現株の樹立、平成18年度日本実験動物技術者協会関東支部総会および第32回懇話会、東京、2007年2月.

### 3. その他

山海 直、第6章 獣医学的管理（総論 周産期管理）、吉田高志・藤本浩二編「医科学研究資源としてのカニクイザル」シュプリンガー・ジャパン、東京、79, 2006.

山海 直、第6章 獣医学的管理（各論 繁殖および周産期障害）、吉田高志・藤本浩二編「医科学研究資源としてのカニクイザル」シュプリンガー・ジャパン、東京、107-109, 2006.

下澤律浩、岡田浩典、山海 直、第11章 発生工学、吉田高志・藤本浩二編「医科学研究資源としてのカニクイザル」シュプリンガー・ジャパン、東京、217-235, 2006.

山海 直、揚山直英、小野文子、第13章 動物倫理、吉田高志・藤本浩二編「医科学研究資源としてのカニクイザル」シュプリンガー・ジャパン、東京、247-258, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

(特許出願)

該当なし

(その他)

特になし

## カニクイザルの染色体地図の作製

分担研究者 数藤由美子（日本赤十字社中央血液研究所主査）

### 研究要旨

カニクイザルの遺伝子レベルでのリソース整備として、これまで、繁殖コロニーを構成する血縁の明らかな個体から核 DNA のコレクション作りを進め、併せて Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ライブラリーを整備してきた。本研究ではそれら遺伝子レベルのリソースの付加価値を高めることを目的とし、BAC クローン 306 個の両末端塩基配列と 45 個の片側末端塩基配列を決定し、公開ゲノムデータベースを用いてヒト、チンパンジー、アカゲザルのゲノムとの対応づけ（マッピング）をおこない、存在する遺伝子やマイクロサテライト・マーカを予測した。さらに、カニクイザルのマイクロサテライト・マーカのいっそうの整備を進め、少なくとも 66 個のマーカを得た。これらの情報と、既に我々が構築したカニクイザル完全長 cDNA クローン約 7 万個から抽出した遺伝子データベースに基づいて BAC クローンを選び、46 個についてカニクイザル染色体への直接的マッピングを試みた。リソースの情報の高度化は、今後、疾患モデルのゲノム解析を支援する土台となる。

### A. 研究目的

本研究においてこれまで蓄積してきた、SNP 解析などのシミュレーションで必須となるカニクイザルの 500 家系以上の核 DNA ライブラリーおよびマイクロサテライトマーカの整備に加え、詳細な染色体地図を作製することにより、ゲノムリソースの高度化を図り付加価値を高めるとともに、疾患モデルのゲノム解析を支援する。

複製後期にブロモデオキシウリジン (BrdU) を添加し、適当な時期に紡錘糸の形成を疎外するコルセミドを添加し、培養開始から 72 時間後に細胞を回収し、カルノア固定の後、スライドグラスに展開した。室温放置によるエイジングの後、UV 照射によって BrdU を光崩壊させ、ダイレクト R-バンド標本作製した。以上の反応条件はヒトの場合と異なるので、好条件の確立をおこなった。

### B. 研究方法

#### 1. 末梢血リンパ球培養・標本作製

健康なカニクイザル、雄 5 個体、雌 5 個体からヘパリン採血をおこない、各 10 ml の末梢血を得た。フィトヘマグルチニン刺激により、リンパ球培養をおこなった。細胞分裂の

#### 2. カニクイザル BAC クローン DNA のデータ整備

本研究事業においては、昨年度までで、カニクイザル由来 BAC ライブラリーを作製し、384 クローンについて、各 BAC クローンから DNA を抽出し、ベクター内に設定したプライマーを用いてクローンの 5' - および 3' -

の末端塩基配列を決定した。これらの配列を、公開データベースのヒト・シーケンス・データとチンパンジー、アカゲザルのドラフト・シーケンス・データを用いてアラインメントし、その塩基配列の保存性から、カニクイザル・ゲノム上の位置を予測した。

今年度は、ヒトの遺伝子やマイクロサテライト、ヒト BAC コンティグ・クローンとの関連を調べた。

また、カニクイザル完全長 cDNA クローン約 7 万個から抽出した遺伝子情報とも比較し、BAC クローン (ジェノミック DNA) に遺伝子情報を付した。

### 3. カニクイザル BAC クローンの染色体マッピング

カニクイザル BAC クローンから DNA 抽出をおこない、ビオチン標識をし、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) をおこなった。

(倫理面への配慮)

カニクイザルからの末梢血サンプルは、医薬基盤研究所霊長類医科学センターにおいて当センター規定の方法にしたがって、健全な個体から採取した。

## C. 研究結果および考察

### 1. 染色体標本作製法の確立

昨年度においては、細胞培養と標本作製の条件が定まっておらず、雄 2 個体から得た染色体標本は 300 バンド・レベルであった。

今年度は、条件を改良し、400~800 バンド・レベルの標本作製することに成功し、より高精度な染色体マッピングが可能となった。また、今後増大するクローン数に備え、大量に標本を準備した。さらに、チェック用に EB-transformed B cells を樹立し、いつでも細胞が使えるように備えた。

### 2. マイクロサテライト探索

昨年度においては、ヒトのマイクロサテライトマーカーから選択した 148 箇所について、20 頭の非血縁個体で多型解析をおこなった。その結果、少なくとも 66 個のマイクロサテライト・マーカーは多型性 (反復数 2~10) があり、さらに 4 家系 20 頭を用いてそれらのマーカーはメンデルの遺伝法則に準拠していることを確認している。

今年度は、新規マイクロサテライトの探索を目指し、5'-および 3'-末端塩基配列 (各 800 bp 程度) を決定した BAC クローンの、ヒト染色体への *in silico* マッピングにより、カニクイザルゲノム配列中に存在するヒトのマイクロサテライトを抽出した。カニクイザル由来 176 個のクローンが対応するヒトゲノム配列から、227 箇所マイクロサテライトの配列が見出され、遺伝子は 195 個存在した (表)。今後は、それらがカニクイザルにおいても存在し、かつマイクロサテライト・マーカーとしての性質を備えているか、検討する必要がある。

(表) カニクイザル BAC ライブラリーから見出されたマイクロサテライトおよび遺伝子の数

対応するヒト染色体	クローン数	カパー長 (kb)	カパー率 (%)	マイクロサテライト数	遺伝子数
1	14	1140	0.46	11	14
2	13	1059	0.44	21	10
3	11	902	0.45	12	8
4	12	1013	0.53	9	11
5	14	1171	0.65	17	4
6	7	590	0.35	9	4
7	17	1476	0.93	19	20
8	8	1033	0.71	8	12
9	8	7747	5.53	6	7
10	8	919	0.68	7	12
11	6	471	0.35	9	4
12	8	677	0.51	16	5
13	10	1034	0.91	21	15
14	4	316	0.30	8	2
15	8	646	0.65	12	6
16	5	454	0.51	5	4
17	4	299	0.38	3	5
18	5	393	0.52	9	1
19	3	273	0.43	3	10
20	2	181	0.29	2	1
21	1	71	0.15	0	1
22	1	1667	3.33	23	34
X	7	664	0.43	16	5
Y	0	0	0	0	0
合計	176	24196	19.47	227	195

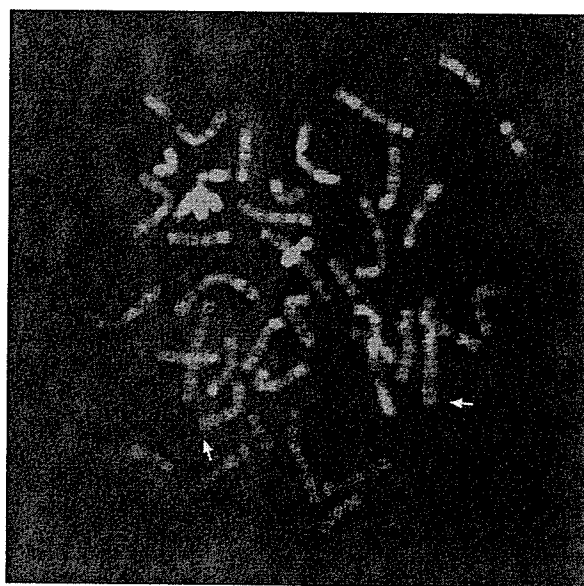
### 3. in situ の染色体マッピング

M-FISH 法により、ヒト 1、3-6、8-13、16-19 番染色体・性染色体はカニクイザル染色体と 1対1 対応、ヒト 2 番染色体は 2対に対応し、カニクイザル染色体では、ヒト 7 & 21、14 & 15、20 & 22 番が

融合しそれぞれ 1本の染色体となることを確認した。

そこでさらにダイレクト R-バンディング FISH による BAC クローンの染色体マッピングを試みた。ヒトとカニクイザルとで細胞周期が異なるため最適条件が得られず、昨年度の段階では、300 バンド・レベルの標本しか得られなかったが、今年度は方法の改良を図り、400~800 バンド・レベルの標本作製に成功し、高精度で安定したマッピングがおこなえるようになった。

そこで、改良法による標本を用いて、FISH 法による直接的染色体マッピングを開始した。351 個のカニクイザル BAC クローン・コレクションのヒト、チンパンジー、アカゲザルへの in silico マッピングの結果から、保存性の高い X 染色体由来と思われるクローンや、遺伝子を含むクローンを選別し、マッピング・プローブ用 DNA の大量調整を進めた。現時点で 56 クローンの DNA 抽出を終え、染色体マッピングを進め、10 個については終了した。



(図) カニクイザル BAC クローン : No. 10-3  
ヒト 10q26 に対応する染色体部位に位置した。

#### D. 結論

今年度は、400～800バンド・レベルのカニクイザル染色体標本を作製することに成功し、安定した高精度染色体マッピングが可能となった。

そこで、351個のBACクローンの大量DNA抽出を開始し、56クローンについて終了、10クローンについてカニクイザル染色体への直接的位置づけ（マッピング）を終了した。

また、351個のBACクローンのin silicoマッピングにより、カニクイザル由来176個のBACクローンが対応するヒトゲノム配列に227箇所マイクロサテライト配列が見出され、195個の遺伝子が存在することがわかった。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

なし



研究成果の刊行に関する一覧表

明里宏文

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee Y-J, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, <u>Akari H</u>	GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues <i>in vivo</i>	Microbes and Infection	印刷中		2007
Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, <u>Akari H</u> , Terao K, Mukai R	Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates	Virus Genes	印刷中		2007
Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasaki A, Abudu A, Miyachi Y, <u>Akari H</u> , Iwai K, Uchiyama T	Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex	Virology	344	263-266	2006

木村展之

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
○Kimura N, Ishii Y, Suzuki S, Negishi T, Kyuwa S, Yoshikawa Y.	A $\beta$ upregulates and colocalizes with LGI3 in cultured rat astrocytes.	Cell Mol Neurobiol	In Press	In Press	2007
○Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, Terao K.	Amyloid $\beta$ up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from	J Neurosci Res	84	782-789	2006
○Kimura N, ○Yanagisawa K, Terao K, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y.	Age-related changes of intracellular Abeta in cynomolgus monkey brains.	Neuropathol Appl Neurobiol	1(2)	170-180	2005
○Kimura N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y.	Astroglial responses against Abeta initially occur in cerebral primary cortex	Neurosci Res	9(3)	339-346	2004
Hayashi H, ○Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K.	A seed for Alzheimer amyloid in the brain.	J Neurosci	4(20)	4894-4902	2004
○Kimura N, Nakamura Si, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y.	Presenilin-2 in Cynomolgus Monkey Brain: Investigation of Age-Related Changes.	Primates	5(3)	167-175	2004

揚山直英

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K.	Prevention of Immune Responses to Human Erythropoietin in Cynomolgus Monkeys ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	Journal of Veterinary Medical Science	68	507-510	2006

## Prevention of Immune Responses to Human Erythropoietin in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*)

Naohide AGEYAMA<sup>1)</sup>, Yutaka HANAZONO<sup>2)\*</sup>, Hiroaki SHIBATA<sup>1,2)</sup>, Fumiko ONO<sup>3)</sup>, Takeyuki NAGASHIMA<sup>4)</sup>, Yasuji UEDA<sup>4)</sup>, Yasuhiro YOSHIKAWA<sup>5)</sup>, Mamoru HASEGAWA<sup>4)</sup>, Keiya OZAWA<sup>2)</sup> and Keiji TERAO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki 305-0843, <sup>2)</sup>Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi 329-0498, <sup>3)</sup>Corporation for Production and Research of Laboratory Primates, Ibaraki 305-0843, <sup>4)</sup>DNAVEC Corporation, Ibaraki 305-0856 and <sup>5)</sup>Department of Biomedical Science, Graduate School of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

(Received 13 September 2005/Accepted 17 January 2006)

**ABSTRACT.** Genes and proteins of human origin are often administered to monkeys for research purposes, however, it can be difficult to obtain sufficient levels of the products *in vivo* due to immunological clearance. In this study, we showed that human erythropoietin (hEPO) induces generation of anti-hEPO antibody in cynomolgus macaques (n=2), although 92% of amino acid residues are common between the human and macaque EPO. The administered hEPO was thus eliminated from the animals. On the other hand, when an immunosuppressant, cyclosporin A (CyA), was administered (6 mg/kg) intramuscularly every other day in combination with hEPO (n=2), no anti-hEPO antibody was generated and high serum levels of hEPO were obtained during administration of hEPO, resulting in an increase in serum hemoglobin levels. No adverse effects associated with CyA were observed. Thus, CyA treatment is useful for prevention of immune responses associated with the administration of human proteins in monkeys.

**KEY WORDS:** cyclosporin A, cynomolgus monkey, erythropoietin.

*J. Vet. Med. Sci.* 68(5): 507–510, 2006

Macaque monkeys are widely used for preclinical testing of genes and proteins of human origin, taking advantage of their close phylogenetic relationship to humans [5, 11, 21]. Despite the genetic similarity between the two species, human gene products or proteins are often immunogenic to monkeys. An example is erythropoietin (EPO). EPO is a hematopoietic growth factor that stimulates the proliferation and differentiation of erythroid progenitor cells [10]. Recombinant human EPO (hEPO) has a variety of clinical uses [4, 6, 17, 22]. Although 92% of amino acid residues (142/166) are common between human and macaque EPO [12, 20], we showed here that hEPO induces potent immune responses in macaque monkeys, precluding its administration to monkeys.

Therefore, it is necessary to develop a method to prevent such immune responses following administration of hEPO. Among many immunosuppressants available, cyclosporin A (CyA) is widely used to suppress detrimental immune reactions associated with allogeneic bone marrow and organ transplantation [1–3, 19]. CyA is a calcineurin inhibitor that inhibits nuclear factor of activated T cells (NFAT) activity and induces immunosuppression [9, 13]. In this study, we showed that hEPO can be successfully administered to cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) without immunological clearance by using CyA.

Four cynomolgus monkeys (4–6 years old, 2.5–5.5 kg) bred in the Tsukuba Primate Research Center (Ibaraki, Japan) were used in this study (Table 1). The animals were

free of intestinal parasites, herpes-B, simian type-D retrovirus, and simian varicella virus. This study was conducted according to the Rules for Animal Care and Management of the Tsukuba Primate Research Center [8] and the Guiding Principles for Animal Experiments Using Nonhuman Primates formulated by the Primate Society of Japan [14]. The protocols of the experimental procedures were approved by the Animal Welfare and Animal Care Committee of the National Institute of Infectious Diseases (Tokyo, Japan).

First, we administered hEPO (Chugai, Tokyo, Japan) subcutaneously to a cynomolgus monkey (099054) at a dose of 3,000 IU/kg three times a week and assessed the hEPO concentrations in the serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Low levels (< 1.0 ng/ml) of hEPO were detected for the first 3 weeks, but thereafter the levels decreased to the lowest limit of detection (0.01 ng/ml) despite continued administration of hEPO (Fig. 1A). Assessment by ELISA revealed that anti-hEPO antibody was being generated [7] (Fig. 1A), and the hEPO was cleared from the serum. A second cynomolgus monkey (001051) was intravenously (instead of subcutaneously) given a much lower dose of hEPO (200 IU/kg, three times a week). During administration, very low levels (< 0.1 ng/ml) of hEPO were detected with the exception of one time point (1.0 ng/ml at day 28), and the levels eventually decreased to zero (Fig. 1B). Despite the lower dose, anti-hEPO antibody was generated again (Fig. 1B), leading to clearance of hEPO from the serum. Although we did not try subcutaneous administration of 200 IU/kg hEPO in the present study (Table 1), we assumed that subcutaneous administration of 200 IU/kg hEPO would also result in anti-hEPO antibody generation

\*CORRESPONDENCE TO: HANAZONO Y, Division of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan.

Table 1. Characteristics of cynomolgus monkeys subjected to hEPO administration

	Animal (Sex)	Age (years)	Body Weight (kg)	hEPO		CyA		Hemoglobin Levels (g/dl)		Complication
				Dose (IU/kg)	Administration Route and Frequency	Dose (ng/kg)	Administration Route and Frequency	Day 0	Day 35	
hEPO Only	099054 (Male)	5	5.5	3000	Subcutaneous (3 times a week)	—	—	12.7	12.6	Antibody production
	001051 (Female)	4	2.5	200	Intravenous (3 times a week)	—	—	12.4	12.4	Antibody production
	Average	4.5	4.0	—	—	—	—	12.6	12.5	—
hEPO and CyA	396053 (Female)	6	3.2	200	Subcutaneous (3 times a week)	6	Intramuscular (every other day)	10.9	11.6	None
	396058 (Female)	6	4.0	200	Subcutaneous (3 times a week)	6	Intramuscular (every other day)	11.1	12.0	None
	Average	5.5	3.6	—	—	—	—	11.0	11.8	—

given that intravenous administration of the same dose of hEPO produced this result. The reason for this was subcutaneous administration is known to induce a stronger immune response than intravenous administration [16]. The hemoglobin levels did not increase in either animal (Table 1). Despite the genetic similarity of EPO between humans and macaques [12, 20], hEPO is a potent immunogen in macaque monkeys. This is the first report on the immune responses in monkeys following administration of hEPO.

On the other hand, two cynomolgus monkeys (396053, 396058) were given 6 mg/kg of CyA (Sandimmun; Novartis Pharma, Basel, Switzerland) intramuscularly every other day in combination with subcutaneous hEPO administration (200 IU/kg, three times a week) (Table 1). CyA concentrations in the plasma were assessed by radioimmunoassay according to a previously reported method [15], and it was found that the concentrations were maintained within an effective range of 200 to 400 ng/ml. As a result, no anti-hEPO antibody was generated in either monkey and high serum levels (around 10 ng/ml) of hEPO were obtained during administration of hEPO (Figs. 2A and 2B). A second trial of hEPO resulted in a similar elevation of the serum levels of hEPO (Figs. 2A and 2B). The hemoglobin levels apparently increased in response to administration of hEPO (Table 1), suggesting that the hEPO trial was effective when CyA was administered together. Blood biochemistry tests revealed no adverse effects associated with the CyA and hEPO treatment.

We have thus established a method to prevent immune responses to hEPO in cynomolgus monkeys using CyA. In fact, this method has successfully been applied to our pre-clinical monkey testing, and the long-term (around 1 year) efficacy and safety of CyA administration has been well

demonstrated [18]. CyA administration will be useful in preventing immune responses when human proteins are administered to monkeys for research purposes.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** We thank Hayato Narita, Hiromi Ogawa, and Katsuhiko Komatsuzaki for the handling and care of the monkeys. The hEPO was kindly supplied by Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). This study was supported by grants (KAKENHI, HAIT-EKU, JMS 21st Century COE Program, and Creation of Innovations) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and grants (KAKENHI) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

#### REFERENCES

- Burke, J. F. Jr., Pirsch, J. D., Ramos, E.L., Salomon, D. R., Stablein, D. M., Van Buren, D. H. and West J. C. 1994. *New Engl. J. Med.* **331**: 358–363.
- Chao, N. J., Schmidt, G. M., Niland, J. C., Amylon, M. D., Dagens, A. C., Long, G. D., Nademane, A. P., Negrin, R. S., O'Donnell, M. R., Parker, P. M., Smith, E. P., Snyder, D. S., Stein, A. S., Wong, R. M., Blume, K. G. and Forman, S. J. 1993. *New Engl. J. Med.* **329**: 1225–1230.
- Eisen, H. J., Hobbs, R. E., Davis, S. F., Laufer, G., Mancini, D. M., Renlund, D. G., Valantine, H., Ventura, H., Vachery, J. L., Bourge, R. C., Canver, C. C., Carrier, M., Costanzo, M. R., Copeland, J., Dureau, G., Frazier, O. H., Dorent, R., Hauptman, P. J., Kells, C., Master, R., Michaud, J. L., Paradis, I., Smith, A., Vanhaecke, J., Feutren, G., Turkin, D., Mellein, B. and Mueller, E. A. 1999. *Transplantation* **68**: 663–671.
- Eschbach, J. W., Egrie, J. C., Downing, M. R., Browne, J. K. and Adamson, J. W. 1987. *New Engl. J. Med.* **316**: 73–78.
- Hanazono, Y., Nagashima, T., Takatoku, M., Shibata, H.,