

200711001A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

医学研究に資するカニクイザル体細胞クローン  
ES細胞の樹立に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 下澤 律 浩

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

平成20（2008）年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 医学研究に資するカニクイザル体細胞由来ES細胞の樹立に関する研究 ----- 1  
基盤研・霊長類センター 下澤律浩

## II. 分担研究報告

1. カニクイザルにおける成熟卵の採取技術の確立に関する研究 ----- 8  
基盤研・霊長類センター 山海 直
2. 体細胞候補の検索と細胞周期の制御に関する研究 ----- 11  
基盤研・霊長類センター 柴田 宏昭
3. カニクイザル体細胞由来クローンES細胞の樹立に関する研究 ----- 16  
理研・バイオリソースセンター 小倉 淳郎
4. サル類クローンES細胞の樹立に関する基盤的研究 ----- 20  
基盤研・霊長類センター 下澤 律浩

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 26

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業:生物資源・創薬モデル動物研究)

総括研究報告書

## 医学研究に資するカニクイザル体細胞由来クローン ES 細胞の樹立に関する研究

主任研究者

下澤律浩

独)医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、研究員

### 研究要旨

本研究は、ヒトと同じ霊長類に属するカニクイザル体細胞に由来するクローン ES 細胞の樹立を目指すものである。医科学研究に実績のあるカニクイザルでのクローン ES 細胞は、将来的にヒトクローン ES 細胞研究やそれを利用した医療応用を計る上で、安全性および移植の効果などの評価・検証のための霊長類を用いた医科学研究に重要な生物資源となる。本研究では、このようなサル類における体細胞由来クローン ES 細胞を樹立するために必須な、1)サル卵の採取、2)体細胞核移植、3)ES 細胞の樹立などの各課題を精査した。そして今後は関連づけて効率的な作製方法を検討する。1)において、FSH および hCG の由来の違いあるいは投与量によって、卵採取数に顕著な差は認められず、さらなる卵採取法の検討の余地を残した。2)において、体細胞の細胞周期制御に関する基礎技術を確認でき、さらに、多様な細胞種への応用および適切な薬剤同調法の検討を行う。一方、カニクイザル体細胞核移植において作出された核移植卵では、胚盤胞への発生に成功した。本作出技術に修正を重ねることでより効率的な作出方法を検討する。3)において、ウサギ、カニクイザルおよびアフリカミドリザルの受精卵から ES 細胞を樹立した。特にアフリカミドリザルは世界的にも初めての樹立である。この ES 細胞樹立技術および性状解析はクローン ES 細胞の樹立等に大きく貢献するものである。

各検討項目は、それぞれが順調に進行しており、体細胞クローン ES 細胞を樹立する基盤技術が確立されつつある。

### 分担研究者

山海 直: 独)医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、主任研究員  
柴田宏昭: 独)医薬基盤研究所霊長類医科

学研究センター、特任研究員

小倉淳郎: 理化学研究所バイオリソースセンター、室長

## A. 研究目的

本研究は、ヒトと同じ霊長類に属するカニクイザル体細胞に由来するクローン ES 細胞の樹立を目指すものである。霊長類医科学研究センターで繁殖・維持しているカニクイザルは医科学研究に多用される実験動物の一つであり、今までに様々な医科学研究に利用されている。この実績のあるカニクイザルでのクローン ES 細胞は、将来的にヒトクローン ES 細胞研究やそれを利用した医療応用を計る上で、安全性および移植の効果などの評価・検証のための霊長類を用いた医科学研究に重要な生物資源となる。またヒトクローン ES 細胞研究において、国の専門委員会はサル類での成功を課す方向にあり、本研究は厚生労働行政の医科学分野においても重要である。本研究は、このようなサル類における体細胞由来クローン ES 細胞を樹立するために必須な、成熟卵の採取、体細胞核移植、ES 細胞の樹立などの各課題を精査し、そして関連づけて効率的な作製方法を検討する。

## B. 研究方法

カニクイザルからの効率的で多数の成熟卵を採取する方法、カニクイザル体細胞の細胞周期同期法ならびに体細胞核移植法の検討および ES 細胞の樹立方法・解析などの課題を検討した。各検討課題の詳細な検討および解析方法は分担報告書にて記述する。

(倫理面への配慮)

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼養及び保管

並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守し、かつ日本学術会議の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従い、世界的な共通概念である 3R (Replacement、Reduction、Refinement)の原則のもと実験動物の飼育および実験を行う。実際の実施に当たっては、独立行政法人医薬基盤研究所・動物実験委員会および理化学研究所・動物実験委員会の承認を受けて実施した。実験実施時の動物への苦痛の軽減を原則とし飼育環境の整備にも十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1) 卵採取法の検討

カニクイザルに投与したヒト FSH の尿由来および遺伝子組換え由来製剤において、採取された総卵数はそれぞれ 294 個(29.4 個/頭)および 316 個(28.7 個/頭)であり、その内成熟卵は 123 個(12.3 個/頭)および 114 個(10.4 個/頭)、卵核胞崩壊期卵は 77 個(7.7 個/頭)および 92 個(8.4 個/頭)であった。得られた平均の卵数において、両者間に差は見られず、結果的に発育した卵胞数について両製剤による差は認められなかった。一方、卵成熟に使用する hCG の投与量を比較した場合 1200IU の hCG で処理した場合、GV 期、GVBD (MI 期)、MII 期の卵の数はそれぞれ  $19.52 \pm 20.8$  個、 $11.50 \pm 14.3$  個、 $15.87 \pm 16.5$  個であり、4000IU の hCG で処理した場合、それぞれ  $9.50 \pm 4.9$  個、 $6.31 \pm 6.0$  個、 $8.95 \pm 6.9$  個であった。いずれの投与量であっても大きな個体差が認められ、また回収卵の 1/3 程度の成熟卵しか得られていないことが示された。

## 2) 体細胞核移植法の検討

体細胞の細胞周期の制御を検討するために、ノクタゾールを接着培養下にある骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)に添加した際の細胞周囲をフローサイトメーターで解析した。ノクタゾール添加群では、G0/G1期:66.8%、S期:14.9%、G2/M期:18.4%。無処置群(コントロール)では、G0/G1期:74.2%、S期:14.0%、G2/M期:11.8%であった。ノクタゾール添加により、G0/G1期の細胞の割合は減少、S期の細胞はほぼ変化無く、G2/M期の細胞の割合は増えた。

体細胞核移植においては、顕微操作下の卵子の核は観察でき、それらの核の除去は可能であった。除核未受精卵とG0期にある卵丘細胞を用いて構築した核移植卵は、複合活性化後、体外培養により胚盤胞への発生が1個確認できた。この胚盤胞から常法に従ってES細胞の樹立に供したが、摘出した内部細胞塊はマウス胎児線維芽細胞上に付着・増殖することが観察できなかった。

## 3) ES細胞の樹立と解析

異種核移植法の検討に使用するウサギにおいて、基礎検討として受精卵からのES細胞の樹立を検討した。樹立条件の検討から、ES様細胞を未分化のまま増殖させるには、フィーダー細胞の濃度が重要であった。樹立したES様細胞はヒトES細胞のように単層で増殖し、アルカリフォスファターゼ、SSEA1、SSEA4、Oct4およびNanogが陽性であった。ハンギングドロップ法で高密度培養を行うことで胚様体が形成された。また未分化様の細胞をSCIDマウスに移植することで三胚葉性のテラトーマ形成も確

認できた。

一方、カニクイザルおよびアフリカミドリザルにおけるES細胞の樹立では、胚盤胞から摘出された内部細胞塊部をMEF上で培養したところ、継代培養後、安定して未分化形態のコロニーがそれぞれ得られた。これらの株において、Oct3やSSEA4などの未分化マーカーの発現および胚様体の形成を確認した。さらにアフリカミドリザルについては、体外培養により胚様体から三胚葉性の細胞への分化およびin vivoで三胚葉性の細胞から成るテラトーマの形成が確認された。以上で得られた両サル種のES細胞は80%以上で正常な染色体数を維持していた。

## D. 考察

### 1) 卵採取法の検討

卵胞発育誘起法の検討では、FSHの製法間で得られる成熟卵およびその前段階にある卵核胞崩壊期卵の数に大きな差は認められなかった。一方では卵成熟を誘導するhCGの投与量の比較を行ったが、いずれの投与量であっても大きな個体差が認められ、また回収卵の1/3程度の成熟卵しか得られていないことが示された。また、核移植検討に供与した卵には細胞質の劣化が生じていると思われるものが含まれることが見られた。発生工学の分野では卵胞発育誘起は古くから研究されているが、未だにきわめて重要かつ難しい課題である。さらなる卵採取法の検討が必要である。

### 2) 体細胞核移植法の検討

体細胞の細胞周期の検討において、MSCの細胞周期をM期に制御することを目的に検討

した。微小管の脱重合を促進するノコタゾールを用いたところ、G0/G1期の細胞が減少した分、G2/M期の細胞が増加した。しかしながら、無処置に比べ、G2/M期が1.5倍に増えたとはいえ、細胞の割合としては、20%弱しかなかった。実際にM期体細胞を利用したクローンES細胞を作成するためには、出来るだけM期に同調した細胞の割合を高くする必要があるので、今回のノコタゾールの濃度、反応時間、体細胞の状態が至適条件であったかどうか、さらなる検討が必要である。

一方、カニクイザル体細胞核移植において、卵の核は、紫外線や遠心による細胞質の勾配を利用した方法などを利用しなくても除核が可能であり、細胞質へのダメージを与えることなく除核未受精卵を準備することが可能であった。しかし、一部の卵では核が判別できないものがあり、これらは過齢による細胞質の変性が生じたものであると考えられ、卵採取検討グループとの連携を執り、良質な卵の実験使用を計る。そのような検討の中でも、胚盤胞への発生が確認できたことは、本作出技術に修正を重ねることでより効率的な作出が可能であることを示唆するものである。

### 3) ES細胞の樹立と解析

ウサギ、カニクイザルおよびアフリカミドリザルの受精卵からES細胞を樹立した。ウサギにおいては今後、このES細胞が生殖細胞への分化能を有しているか否かをキメラウサギを作出することで確認し、生殖細胞へも分化可能なES細胞であるか否かを明らかにする。サル類ES細胞の樹立においては、特にアフリカミドリザルにおいて世界で最初の樹立に成功した。

この株の形態、未分化マーカーの発現、多分化能などは他の霊長類ES細胞と同様な性状を示した。以上のES細胞樹立技術および性状解析はクローンES細胞の樹立等に大きく貢献するものである。

## E. 結論

### 1) 卵採取法の検討

カニクイザルに最も適した方法を見出すには至っていない。今後、卵の質へのこだわりをもち、良質で多数の卵を採取できる製剤の投与方法等の検討を継続しなければならない。

### 2) 体細胞核移植法の検討

実際にM期の細胞の割合がどの程度まで高まった時、核移植方法の効率がよくなるのか、まだ客観的に検討していないので、今後はこの点について他の体細胞を含めて検討する。カニクイザル体細胞由来の胚盤胞が作出できたことは、カニクイザル体細胞由来のクローンES細胞の樹立にとって大きな成果である。

### 3) ES細胞の樹立と解析

サル類およびウサギ受精卵に由来するES細胞が樹立できたことは、クローンES細胞を樹立するという本研究の最終的な目標を達成する上での技術的な高さを示すものである。

上記の3つの検討項目は、それぞれが順調に進行しており、体細胞クローン胚の作出およびそのES細胞を樹立する基盤技術が確立されつつある。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okada H, Hatori M, Shimozawa N, Tsuchiya H, Kuwana T, Sankai T. Collection and culture of primordial germ cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Reprod Med Biol*, 6, 203-210, 2007.
- 2) Yamamoto M, Tase N, Okuno T, Kondo Y, Akiba S, Shimozawa N, Terao K. Monitoring of gene expression in differentiation of embryoid bodies from cynomolgus monkey embryonic stem cells in the presence of bisphenol A. *J Toxic Sci*, 32, 301-310, 2007.
- 3) Shinmen A, Honda A, Ohkawa M, Hirose M, Ogonuki N, Yuzuriha M, Miki H, Mochida K, Inoue K, Abe K, Ito M, Ogura A. Efficient production of intersubspecific hybrid mice and embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev*, 74: 1081-1088, 2007.
- 4) Inoue K, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H, Ogura A. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. *Stem Cells*, 25: 1279-1285, 2007.
- 5) Honda A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T, Shinohara T, Ogura A. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 12389-12394, 2007.
- 6) Shimozawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T. Comparison of follicular growth stimulation methods for collecting mature oocytes from cynomolgus and African green monkeys. *Theriogenology*, 67, 1143-1149, 2007.
- 7) Endoh K, Mochida K, Ogonuki N, Ohkawa M, Shinmen A, Ito M, Kashiwazaki N, Ogura A. The developmental ability of vitrified oocytes from different mouse strains assessed by parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Dev*, 53: 1199-1206, 2007.
- 8) Kawahara M, Obata Y, Sotomaru Y, Shimozawa N, Bao S, Tsukadaira T, Fukuda A, Kono T. Viable bi-maternal mice: An oocyte reconstruction system for functional analysis of imprinted genes regulated by parent-of-origin-specific methylation. *Nat Protocols*, 3 197-209, 2008.
- 9) Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y, Ikeda T, Masuda S, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Kitano Y, Nagao Y, Hanazono Y. Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after *in utero* transplantation. *Stem Cells Dev*, *in press*.
- 10) Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration in nonhuman primates. *Mol Ther*, *in press*.

## 2. 学会発表

- 1) 下澤律造、岡田浩典、羽鳥真功、山海直、カニクイザルにおける簡略化した卵胞発育誘起法の検討、第 54 回日本実験動物学会、2007 年 5 月、東京。
- 2) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律造、八神健一、山海直、カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖様式の比較、第 54 回日本実験動物学会、2007 年 5 月、東京。
- 3) 岡田浩典、下澤律造、羽鳥真功、山海直、二種類のカニクイザル ES 細胞株へのリポフェクションによる遺伝子導入条件の検討、第 54 回日本実験動物学会、2007 年 5 月、東京。
- 4) 下澤律造、岡田浩典、羽鳥真功、山海直。アフリカミドリザル顕微授精由来胚からの ES 様細胞の樹立。第 48 回日本哺乳動物卵子学会、2007 年 5 月、山梨。
- 5) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律造、八神健一、山海直。カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖動態の動画解析。第 48 回日本哺乳動物卵子学会、2007 年 5 月、山梨。
- 6) 田中裕次郎、中村紳一朗、岸友紀子、池田たま子、柴田宏昭、佐々木京子、阿部朋行、林聡、北野良博、長尾慶和、花園豊。異種大型動物におけるサル ES 細胞移植後の長期肉眼的生着。第 5 回幹細胞シンポジウム、2007 年 5 月、兵庫。
- 7) Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y, Ikeda T, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Nagao Y, Kitano Y, Hanazono Y. Long-term Macroscopic Engraftment of Cynomolgus Tissues in Sheep After In Utero Transplantation of Cynomolgus ES Cells. 10th International Society of Stem Cell Research, 2007 年 6 月、オーストラリア、ケアンズ。
- 8) Kishi Y, Inoue M, Shibata H, Tanaka Y, Sasaki K, Ikeda T, Hasegawa M, Hanazono Y. Pharmacological Control of Sendai Viral Transgene Expression in Cynomolgus Embryonic Stem Cells. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007 年 6 月、名古屋。
- 9) Shibata H, Hanazono Y. A nonhuman primate model for hematopoietic transplantation with ES cells. 11th Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division and 12th Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation、2007年9月、中国、北京。
- 10) Honda A, Hirose M, Ogura A. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. 17th Lake Shirakaba Conference, 2007 年 10 月。Vedbæk, Denmark.
- 11) Ogura A, Honda A, Hirose M, Characterization of thecal stem cells and primordial oocytes concomitantly isolated from mouse neonatal ovaries. 4th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007, 2007 年 11 月 Singapore, Singapore.
- 12) Hirose M, Honda A, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Wakisaka N, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Katayama K, Miyoshi H, Sankai T, Ogura A. Improvements in the derivation and culture of rabbit embryonic stem-like cells and their characterization in vitro and in vivo. 4th



Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007. 2007年11月. Singapore, Singapore.

13) Ohyabu Y, Sakai S, Shibata H, Yoshioka T, Mishima H, Uemura T. Cartilage Tissue Regeneration Using RWV Bioreactor from Monkey (*Macaca fascicularis*) Bone Marrow Cells. 1st Asian Biomaterials Congress. 2007年12月、茨城.

14) Shibata H, Terao K. Subset and Function of Natural Killer Cells in Cynomolgus Macaques. 第16回サル類疾病国際ワークショップ、2007年12月、茨城.

15) 下澤律浩、羽鳥真功、山海直. アフリカミドリザル ES 様細胞の特徴と体外分化能. 第16回サル類疾病国際ワークショップ、2007年12月、茨城.

16) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、Fowzia Sultana、八神健一、山海直. カニクイザル胚性幹 (ES) 細胞、線維芽細胞、およびマウス ES

細胞の増殖動態の比較. 第16回サル類疾病国際ワークショップ、2007年12月、茨城.

17) 小倉淳郎. 新生仔マウス卵巣から分離された莖膜幹細胞と卵子の特徴について. 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究シンポジウム「幹細胞研究を支える新しいテクノロジー」. 2008年2月. 東京.

18) 大藪淑美、三島初、酒井晋介、柴田宏昭、吉岡友和、崔杰峰、植村寿公. RWVバイオリクターを用いたカニクイザル骨髄細胞による軟骨組織構築. 第7回日本再生医療学会、2008年3月、愛知.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業:生物資源・創薬モデル動物研究)  
分担研究報告書

カニクイザルにおける成熟卵の採取技術の確立に関する研究

分担研究者 山海 直

独)医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター、主任研究員

研究要旨

メスのカニクイザルにホルモン処理を施した結果を卵胞発育および回収卵に焦点を当てて解析した。FSH 製剤とリコンビナント FSH (rFSH)を比較したところ、FSH 製剤を用いた方が多くの卵胞が発育し回収できる卵の数も多いという傾向が示された。しかし、最終的に採取できる MII の卵はいずれも回収卵の 3 分の 1 の数であり差はなかった。hCG 濃度を 1200IU と 4000IU で比較したところ、1200IU の方が多くの MII 卵が得られる傾向があった。これまで行ってきた方法では個体差が大きく、カニクイザルの卵胞発育誘起法を確立するには至っていない。むしろ今回の解析により卵胞発育誘起という課題の重要性と難しさが浮き彫りとなった。

A. 研究目的

本研究を遂行するにあたり、良質な卵を確保することは最重要課題である。使用する卵の質は、得られる研究成果に影響してしまう。しかし、カニクイザルにおいては常に同じ質の卵を確保することは困難であり、安定した卵採取技術の開発が待たれている。ここではカニクイザルへの卵胞発育誘起の成績を解析した。卵胞発育誘起は、GnRH $\alpha$ 、FSH あるいは rFSH、hCG の組み合わせで行った。GnRH $\alpha$  を投与することで内因性の FSH および LH の分泌を抑制することを確認している。FSH 製剤はロットごとに効果がことなっている可能性があるが、rFSH の効果は安定していると期待される。しかし、カニクイザルの卵巣のレセプターに対し

てどの程度の結合力があるかは不明である。また、hCG の投与量は発育した卵胞内の卵を成熟させるために重要な検討課題である。そこで FSH および rFSH を用いたときの発育卵胞数を比較検討し、さらに hCG の投与量に検討を加え、カニクイザルの卵胞発育誘起法を確立するための基礎データを得ることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

実験には月経周期が認められるカニクイザルを用いた。これらの個体の月経を確認し、ただちに GnRH $\alpha$  を静脈内投与した。その後約 2-3 週間経過したのち FSH 製剤あるいは rFSH の投与を開始した。FSH 製剤、rFSH ともに 9 日

間にわたり9回あるいは3回投与したが総投与量は一実験 25IU/kgとした。これらは皮下投与とし、50%グリセリンを溶媒とした。FSH 製剤あるいは rFSH 投与後hCG を静脈内投与した。hCG の投与量は 1200IUあるいは 4000IUとした。hCG 投与後約 38 時間目に全身麻酔下で開腹手術を実施し卵巣を露呈して卵胞の状態を観察した。25G の針を接続したシリンジで卵胞から卵胞液とともに卵を吸引採取した。得られた卵を実体顕微鏡下で観察し、成熟の度合いを分類して記録した。

(倫理面への配慮)

カニクイザルを使用するにあたり独立行政法人医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を受けている。実験実施時の動物への苦痛の軽減を原則とし飼育環境の整備にも十分に配慮した。

### C. 研究結果

FSH 製剤で処理した後の卵巣サイズ(卵巣のもっとも長い部分)は左右それぞれ  $23.41 \pm 4.8\text{mm}$ 、 $23.59 \pm 4.8\text{mm}$ 、rFSH で処理したときはそれぞれ  $23.14 \pm 3.9\text{mm}$ 、 $23.14 \pm 3.7\text{mm}$ であり、製剤間、左右間に違いは認められず、通常の卵巣サイズ(8mm 前後)よりはるかに大きくなっていることが示された。FSH 製剤および rFSH で処理したときの吸引した卵胞数(発育卵胞数)は、それぞれ  $74.78 \pm 40.7$  個と  $46.55 \pm 19.2$  個であった。採卵数は、それぞれ  $43.42 \pm 30.8$  個と  $24.35 \pm 10.9$  個であった。吸引卵胞数、採卵数ともに FSH 製剤で処理した方の標準偏差はかなり大きな値であり、このことは個体差がより顕著であることを意味している。

採取した卵のステージについて検索した結果、1200IU の hCG で処理した場合、GV 期、GVBD (MI 期)、MII 期の卵の数はそれぞれ  $19.52 \pm 20.8$  個、 $11.50 \pm 14.3$  個、 $15.87 \pm 16.5$  個であり、4000IU の hCG で処理した場合、それぞれ  $9.50 \pm 4.9$  個、 $6.31 \pm 6.0$  個、 $8.95 \pm 6.9$  個であった。いずれの投与量であっても大きな個体差が認められ、また回収卵の 1/3 程度の成熟卵しか得られていないことが示された。

### D. 考察

今回の検索結果では、卵胞発育誘起には FSH 製剤を用い、hCG の投与量は 1200IU が良いという傾向を認めたものの、どの方法であっても個体差があまりにも大きくこの解析結果から結論を出すのは危険である。最も重要なことは良質な MII 期の卵を少しでも多く得ることである。今回、FSH 製剤を用いても rFSH を用いても MII 期の卵は 3分の1 個程度あり、改善しなければならないところは多い。また、今回の解析では第2極体の放出を認めた卵を MII 期、すなわち成熟卵と判定しており、厳密に卵の質にまで調査していない。

今後でも得られる卵の数にはこだわる必要があるが、安定した卵胞発育誘起法を確立するためには卵の質に焦点をあてた解析が必要であると考えられる。FSH の投与方法等についてもより詳細に検討しなければならない。現状ではカニクイザルを用いるとき、かなりの個体差が生じることを覚悟しておかなければならない。この問題を打開するためには、個体ごとの何らかの差を検出し個体ごとにホルモン処理方法を変えていかなければならないのかも知れない。

発生工学の分野では卵胞発育誘起は古くから研究されているが、未だにきわめて重要かつ難しい課題であることが今回の解析結果が示している。

## E. 結論

FSH 製剤と rFSH の比較、hCG 濃度 1200IU と 4000IU の比較を行ったが大きな個体差を認め、カニクイザルに最も適した方法を見出すには至っていない。今後、卵の質へのこだわりをもち、製剤の投与方法等の検討を継続しなければならぬ。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Okada H, Hatori M, Shimozawa N, Tsuchiya H, Kuwana T, Sankai T. Collection and culture of primordial germ cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Reprod Med Biol*, 6, 203-210, 2007.

2) Shimozawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T. Comparison of follicular growth stimulation methods for collecting mature oocytes from cynomolgus and African green monkeys. *Theriogenology*, 67, 1143-1149, 2007.

### 2. 学会発表

1) 下澤律浩、岡田浩典、羽鳥真功、山海直、カニクイザルにおける簡略化した卵胞発育誘

起法の検討、第 54 回日本実験動物学会、2007 年 5 月、東京。

2) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、八神健一、山海直、カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖様式の比較、第 54 回日本実験動物学会、2007 年 5 月、東京。

3) 岡田浩典、下澤律浩、羽鳥真功、山海直、二種類のカニクイザル ES 細胞株へのリポフェクションによる遺伝子導入条件の検討、第 54 回日本実験動物学会、2007 年 5 月、東京。

4) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、八神健一、山海直。カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖動態の動画解析。第 48 回日本哺乳動物卵子学会、2007 年 5 月、山梨。

5) Hatori M, Hironori Okada, Shimozawa N, Fowzia S, Yagami K, Sankai T. Comparison of the proliferation of embryonic stem (ES) cells, embryonic fibroblast of cynomolgus monkeys and the ES cells of mouse. 16<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases, December, 2007, Tsukuba, Japan.

6) Shimozawa N, Hatori M, Sankai T. Characterization and in vitro differentiation ability of an embryonic stem like cell line in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). 16<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases, December, 2007, Tsukuba, Japan.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業:生物資源・創薬モデル動物研究)  
分担研究報告書

体細胞候補の検索と細胞周期の制御に関する研究

分担研究者 柴田宏昭

独)医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、特任研究員

研究要旨

ヒトと同じ霊長類であるカニクイザルを用いた体細胞由来クローン ES 細胞の樹立を目的とし、体細胞核移植方法の基礎的検討として、体細胞候補の検索とその細胞周期の制御方法を確立する。

A. 研究目的

ES細胞やiPS細胞を用いた再生医療の研究が最近特に注目されている。しかしながら、実用化には、まだいくつもの問題が立ちまわっている。ES細胞を用いた再生医療の問題としては、受精卵を用いると云う倫理的な側面及び自分の受精卵を用いることは事実上不可能なため、他家移植となり、移植後の免疫拒絶などがあげられる。そこで、我々は体細胞由来の核をES細胞に移植したクローンES細胞の効率的な作製方法の樹立を目的とした。樹立したクローンES細胞を用いた臨床応用を見据えた時、その有効性と安全性を確かめる際には、ヒトと同じ霊長類に属するサル類を用いるのが最善と考えられる。そこで、本研究はカニクイザルを用いた体細胞由来のクローンES細胞樹立を目指し、体細胞核移植方法の基礎的検討をおこなう。既に報告されているクローン研究から、体細胞核移植の際には、提供

元の体細胞と、受入側の卵細胞質間での細胞周期制御が重要であることが分かっている。そこで、提供元と受入側の細胞周期をG0/G1期またはM期に同調させることによって、核移植卵の構築を試みる。本報告では、クローンES細胞の体細胞候補として、体性幹細胞(成体幹細胞、組織幹細胞)に着目し、細胞周期制御方法の検討をおこなった。

B. 研究方法

体細胞細胞周期の制御方法の検討

カニクイザルクローンES細胞の体細胞候補として、体性幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を用いた。MSCの細胞周期をM期に制御する条件検討をおこなった。MSCの調製方法は、カニクイザル胎仔の四肢骨から骨髄を採取し、骨髄細胞を調製した。細胞を20%FBS-a(+)MEM に懸濁して、37°C、5%CO<sub>2</sub>のインキュベータで培養した。細胞播種1日後、

浮遊細胞を取り除き、付着した細胞を培養し、この細胞をMSCとした。このプロトコールで調整された細胞が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞に分化する事は確認している。また、実験に用いた細胞は、予めフローサイトメトリ解析により、CD29+CD105+CD116+CD14-CD34-CD45-であることから、MSCであることを確認し、実験をおこなった。MSCをM期に合わせるために、初代培養細胞に有糸分裂阻害剤であるノクタゾールを0.4 mg/mL添加し、2時間培養をおこなった。PBS(-)で2回洗浄後、trypsin-EDTAで細胞を剥がし、更にPBS(-)で2回洗浄後、70%EtOHに懸濁し、氷上で10分間保持し、細胞を固定した。固定後、PBS(-)で2回洗浄し、250 mg/mLのRNaseを添加し、37°Cで60分間反応させた。その後、50 mg/mLのヨウ化プロピジウム(PI)を添加し、細胞を氷上で30分間保持した。ノクタゾール添加または無添加したMSCをそれぞれフローサイトメーターで解析し、細胞周期を比較した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験を実施するにあたり、動物福祉および動物実験倫理をとって、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、日本霊長類学会「サル類を用いた実験遂行のための基本原則」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守した。

また、本実験をおこなう上で、医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

ノクタゾールをMSCに添加した際の細胞周囲をフローサイトメーターで解析した。ノクタゾール添加群では、G0/G1期:66.8%、S期:14.9%、G2/M期:18.4%。無処置群(コントロール)では、G0/G1期:74.2%、S期:14.0%、G2/M期:11.8%であった。ノクタゾール添加により、G0/G1期の細胞の割合は減少、S期の細胞はほぼ変化無く、G2/M期の細胞の割合は増えた(図1)。

## D. 考察

MSCの細胞周期をM期に制御する為、哺乳類細胞培養に対して非常に特異的な微小管阻害活性を示し、微小管の脱重合を促進するノクタゾールを用いたところ、G0/G1期の細胞が減少した分、G2/M期の細胞が増加した。しかしながら、無処置に比べ、G2/M期が1.5倍に増えたとはいえ、細胞の割合としては、20%弱しかなかった。実際にクローンES細胞を作成する際のことを考えると、出来だけM期に同調した細胞の割合を高くする必要がある。従って、今回のノクタゾールの濃度、反応時間、体細胞の状態が至適条件であったかどうか、検討の余地が残った。

## E. 結論

今回の実験条件では、ノクタゾールを用いて、MSCをM期にあわせる試みをおこなったが、必ずしも満足する結果ではなかった。ただ、実際にM期の細胞の割合が、どの程度まで高まった時、核移植方法の効率がよくなるのか、ま

だ、客観的に検討していないので、今後は、この点も含めて検討していく必要がある。また、今回は体性幹細胞として、MSCを用いたが、造血幹細胞や普通の組織細胞も体細胞候補として、検討していきたいと考えている。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y, Ikeda T, Masuda S, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Kitano Y, Nagao Y, Hanazono Y. Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after *in utero* transplantation. *Stem Cells Dev, in press.*

2) Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration in nonhuman primates. *Mol Ther, in press.*

### 2. 学会発表

1) 田中裕次郎、中村紳一朗、岸友紀子、池田たま子、柴田宏昭、佐々木京子、阿部朋行、林 聡、北野良博、長尾慶和、花園 豊 異種大型動物におけるサル ES 細胞移植後の長期肉眼的生着. 第 5 回幹細胞シンポジウム、2007 年 5 月、兵庫.

2) Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y,

Ikeda T, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Nagao Y, Kitano Y, Hanazono Y. Long-term Macroscopic Engraftment of Cynomolgus Tissues in Sheep After In Utero Transplantation of Cynomolgus ES Cells. 10th International Society of Stem Cell Research, 2007 年 6 月、オーストラリア、ケアンズ.

3) Kishi Y, Inoue M, Shibata H, Tanaka Y, Sasaki K, Ikeda T, Hasegawa M, Hanazono Y. Pharmacological Control of Sendai Viral Transgene Expression in Cynomolgus Embryonic Stem Cells. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007 年 6 月、名古屋.

4) Shibata H, Hanazono Y. A nonhuman primate model for hematopoietic transplantation with ES cells. 11th Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division and 12th Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation、2007年9月、中国、北京.

5) Ohyabu Y, Sakai S, Shibata H, Yoshioka T, Mishima H, Uemura T. Cartilage Tissue Regeneration Using RWV Bioreactor from Monkey (*Macaca fascicularis*) Bone Marrow Cells. 1st Asian Biomaterials Congress. 2007 年 12 月、茨城.

6) Shibata H, Terao K. Subset and Function of Natural Killer Cells in Cynomolgus Macaques. 第 16 回サル類疾病国際ワークショップ、2007 年 12 月、茨城.

7) 大藪淑美、三島初、酒井晋介、柴田宏昭、吉岡友和、崔杰峰、植村寿公 RWV バイオリクターを用いたカニクイザル骨髓細胞による

軟骨組織構築. 第7回日本再生医療学会、  
2008年3月、愛知.

なし

2. 実用新案登録

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

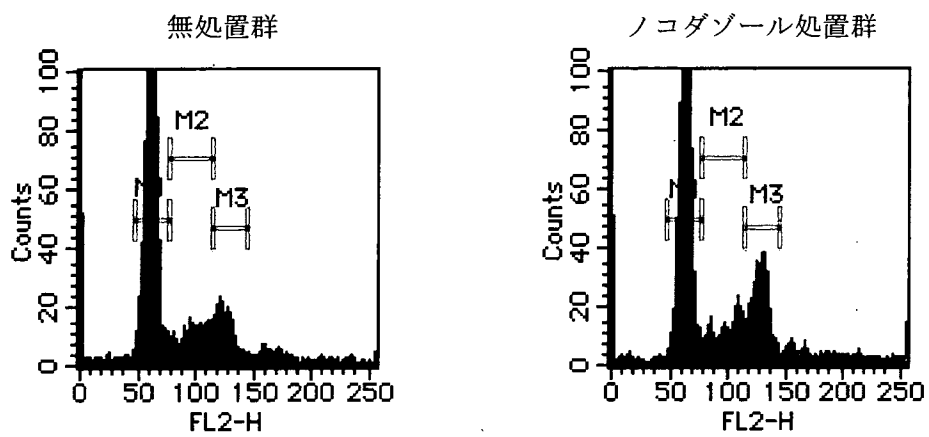
3. その他

1. 特許取得

なし



図1. カニクイザル骨髄由来間葉系幹細胞のフローサイトメトリー解析による細胞周期



M1: G0/G1 期

M2: S 期

M3: G2/M 期

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業:生物資源・創薬モデル動物研究)  
分担研究報告書

**カニクイザル体細胞由来クローン ES 細胞の樹立に関する研究**

**分担研究者 小倉淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター・室長**  
研究協力者 井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、本多新、広瀬美智子、脇阪紀子  
理化学研究所バイオリソースセンター

**研究要旨**

カニクイザル体細胞に由来したクローン ES 細胞は樹立されていない。しかし、マウスでは多くのクローン ES 細胞が樹立されている。そこで、マウス体細胞核移植技術などを応用したカニクイザルにおける体細胞クローン作出の基盤技術を検討した。さらに、カニクイザルから採取される卵の数を補うために、ウサギ卵とサル体細胞を利用した異種間核移植由来のクローン ES 細胞を樹立する基礎検討としてウサギ受精卵から ES 細胞の樹立を検討した。カニクイザル体細胞を用いた核移植において、1 個の胚盤胞への発生が確認できた。これは本作出技術に修正を重ねることでより効率的な作出の可能性を示唆するものである。また、ウサギ受精卵 ES 細胞の樹立については、他の ES 細胞と同様な未分化マーカーを発現し、胚様体およびテラトーマ形成能を有する ES 様細胞の樹立に成功した。今後は、この ES 様細胞が生殖細胞への分化能を有しているか否かをキメラウサギを作出することで確認し、真の ES 細胞であることを明らかにする。これら二つの結果は、カニクイザル体細胞由来のクローン ES 細胞の樹立に大きく貢献する成果である。

**A. 研究目的**

カニクイザル体細胞に由来したクローン ES 細胞は、未だに樹立されていない。しかし、マウスでは効率は決して高くないものの、多くのクローン ES 細胞が樹立されている。そこで、マウスにおける体細胞核移植技術などを応用することで、カニクイザルにおける体細胞クローン作出の基盤技術の確立を目的に検討した。さらに、カニクイザルから採取される卵の数を補うためにウサギから採取した卵へサル体細胞

を導入する異種核移植に由来したクローン ES 細胞の樹立検討も計画している。そのため、基礎検討としてウサギ受精卵から ES 細胞の樹立を検討した。

**B. 研究方法**

1) カニクイザル体細胞を用いた核移植の検討  
すでに十分な実績があるマウス核移植技術を応用して、卵子核の除去、体細胞核の注入、構築卵の活性化および体外培養を行った。体

細胞には、採卵直後の卵周囲に付着している G0 期の卵丘細胞を使用し、活性化には Ionomycin および Dimethylaminopurine による複合法を用いた。培養については、サル受精卵の培養に広く用いられている血清加 CMRL-1066 を使用した。

## 2)ウサギ受精卵由来 ES 細胞の樹立検討

日本白色種ウサギの受精卵を採取し、胚盤胞期胚まで体外発生させた後に、透明帯を物理的に切除し、内部細胞塊部分をマウス胎児線維芽細胞上で培養した。ES 様細胞はマウスおよびヒト ES 細胞と同様な方法を用いて性状解析を行った。

(倫理面への配慮)

理化学研究所の動物実験委員会の承認のもと、本実験を実施した。

## C. 研究結果

### 1)カニクイザル体細胞を用いた核移植の検討

ほとんどの卵子の核は倒立顕微鏡下で観察でき、それらの核の除去は可能であった。除核未受精卵と卵丘細胞を用いて構築した核移植卵は、複合活性化後、体外培養により胚盤胞への発生が 1 個確認できた(図1)。この胚盤胞から常法に従って ES 細胞の樹立に供したが、摘出した内部細胞塊はマウス胎児線維芽細胞上に付着・増殖することが観察できなかった。

### 2)ウサギ受精卵由来 ES 細胞の樹立検討

樹立条件の検討から、ES 様細胞を未分化のまま増殖させるには、フィーダー細胞の濃度が重要であった。樹立した ES 様細胞はヒト ES 細胞のように単層で増殖し、アルカリフォスファタ

ーゼ、SSEA1、SSEA4、Oct4 および Nanog が陽性であった(図2)。ハンギングドロップ法で高密度培養を行うことで胚葉体が形成された。また未分化様の細胞を SCID マウスに移植することで三胚葉性のテラトーマ形成も確認できた。

## D. 考察

卵の核は、紫外線や遠心による細胞質の勾配を利用した方法などを利用しなくても除核が可能であり、細胞質へのダメージを与えることなく除核未受精卵を準備することが可能であった。しかし、一部の卵では核が判別できないものがあり、これらは過齢による細胞質の変性が生じたものであると考えられた。胚盤胞への発生が確認できたことは、本作出技術に修正を重ねることでより効率的な作出が可能であることを示唆するものである。また、ウサギ受精卵由来の ES 様細胞はマウスやヒトの ES 細胞と同様な未分化マーカーを発現していること、さらに胚様体およびテラトーマを形成し、多分化能を有することを示した。今後は、この ES 様細胞が生殖細胞への分化能を有しているか否かをキメラウサギを作出することで確認し、生殖細胞へも分化可能な ES 細胞であるか否かを明らかにする。

## E. 結論

カニクイザル体細胞に由来した胚盤胞の作出に加えて、ウサギ受精卵由来の ES 様細胞が樹立できたことは、カニクイザル体細胞由来のクローン ES 細胞の樹立に大きく貢献する成果である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Endoh K, Mochida K, Ogonuki N, Ohkawa M, Shinmen A, Ito M, Kashiwazaki N, Ogura A. The developmental ability of vitrified oocytes from different mouse strains assessed by parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. J Reprod Dev, 53: 1199-1206, 2007.
- 2) Honda A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T, Shinohara T, Ogura A. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 12389-12394, 2007.
- 3) Inoue K, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H, Ogura A. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. Stem Cells, 25: 1279-1285, 2007.
- 4) Shinmen A, Honda A, Ohkawa M, Hirose M, Ogonuki N, Yuzuriha M, Miki H, Mochida K, Inoue K, Abe K, Ito M, Ogura A. Efficient production of intersubspecific hybrid mice and embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection. Mol Reprod Dev, 74: 1081-1088, 2007.

### 2. 学会発表

- 1) Honda A, Hirose M, Ogura A "Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells" 17th Lake Shirakaba Conference, 2007年10月, Vedbæk, Denmark.
- 2) Ogura A, Honda A, Hirose M, "Characterization of thecal stem cells and primordial oocytes concomitantly isolated from mouse neonatal ovaries" 4th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007, 2007年11月, Singapore, Singapore.
- 3) Hirose M, Honda A, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Wakisaka N, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Katayama K, Miyoshi H, Sankai T, Ogura A, "Improvements in the derivation and culture of rabbit embryonic stem-like cells and their characterization in vitro and in vivo" 4th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007, 2007年11月, Singapore, Singapore.
- 4) 小倉 淳郎, "新生仔マウス卵巢から分離された莢膜幹細胞と卵子の特徴について" 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究シンポジウム「幹細胞研究を支える新しいテクノロジー」, 2008年2月, 東京.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし