

200811001A

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由来クローン
ES細胞の樹立に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 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21(2009)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クローン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 ————— 9
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 ————— 13
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 ————— 17
理研・バイオリソースセンター 小倉 淳郎
4. カニクイザルiPS細胞樹立に関する検討 ————— 21
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 ————— 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 27

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

研究代表者

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。さらに今年度からはクローン ES 細胞と同様な性質を持つとされる人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を樹立することも目的とした。カニクイザル体細胞由来クローン ES 細胞を樹立するために、成熟卵の採取法、体細胞核移植技術およびES細胞の樹立法に関して検討を重ね、各々を確立する必要がある。成熟卵の採取においては、サル個体間にホルモンの感受性があることが効率的な卵採取の障害に成っており、個体の選別が重要であると考えられた。体細胞核移植技術においては、多様な点を検討したところ、効果的と示唆される処理が確認された。卵採取用のカニクイザルの使用頭数を増やし、良質な卵を使用すること、且つ効果的な核移植法を取り入れることで良質な胚盤胞の作出を達成できるものと考えられた。ES 細胞の樹立については、昨年報告した。本年は iPS 細胞の樹立に着手したところ、新生児および胎児に由来する体細胞からほぼ iPS 細胞と断定できる細胞株を得ることに成功した。

以上、医科学研究に大きく貢献することが期待されているカニクイザル体細胞由来クローン ES 細胞および iPS 細胞の樹立に着実に近づく成果が得られた。

研究分担者

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り、厚生労働行政においても重要な研究である。このクローン ES 細胞に加え、同様な性質を持つとされる iPS 細胞の樹立を検討に加えた。

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 iPS 細胞の樹立などの課題を検討した。各検討課題の詳細な方法は分担報告書内に記述する。

(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。また遺伝子操作については、独立行政法人医薬基盤研究所・組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1) 卵採取法の検討

月経時に GnRHa を投与することで、FSH、LH の分泌が抑制されることを確認した。その後、各種ホルモン製剤 (eCG、hMG、FSH、リコンビナント FSH) を用いた結果、いずれの製剤においても個体差を認めた。卵胞内の卵の成熟を促すために hCG 製剤の単発投与を行ったが、採卵時に GV、GVBD、MII など複数のステージの卵が採取されることが多かった。

2) 体細胞核移植法の検討

カニクイザル体細胞の細胞周期制御を目的に、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いて検討した結果、ノコダゾール添加量及添加後の反応時間に比例して、G0/G1期、S期、G2/M期の割合の変化はほとんど無なかった。体細胞核移植によって作出されたクローン胚の活性化法として Ca Ionophore (CA) + Dimethylaminopurine (DMAP) 処理を行ったところ、12 個で桑実胚への発生を確認した。一方、電気刺激 + DMAP 処理では、桑実胚および胚盤胞への発生は確認できなかった。クローン胚の培養時のトリコスタチン A (TSA) 処理では、クローン胚の胚盤胞あるいは桑実胚へ

の発生は確認できなかった。さらに、クローン胚のレシピエントとして受精卵の利用を検討したが、その核の除去に難があった。このような現状で、桑実胚への発生が2個で確認された。

3) iPS細胞の樹立検討

カニクイザル ES細胞から、新規を含めて Oct3/4、Sox2、Klf4 および c-Myc をクローニングした。これらをレトロウィルスベクターによってカニクイザル体細胞(新生児皮膚由来細胞および胎児肝臓由来細胞)へ遺伝子導入を行ったところ、ES細胞に似たコロニーが形成された。このコロニーを継代したところ、ES細胞のコロニーに非常に類似したコロニーが形成された。これらのコロニーに対して、ES細胞の樹立に際して行われている未分化マーカーの発現および多分化能の確認を行った。未分化マーカーはES細胞と同様な発現が両細胞種ともに確認できた。多分化能としては、胚様体を形成し、さらに、これら胚様体から形成された細胞は、形態的に神経などの体細胞に分化していることが確認できた。

D. 考察

1) 卵採取法の検討

GnRH α を投与することで内因性の FSH、LH の分泌抑制を確認した。すなわち、卵巣を休止状態に誘導することで、内因性ホルモンを無視してホルモン投与を開始することが可能になった。投与するホルモンの量、投与時期を検討することで卵胞発育をコントロールできる可能性がでてきた。サル類では、卵胞発育に eCG、hMG、FSH、リコンビナント FSH などのホ

ルモン製剤を用いている。これらすべてのホルモン製剤を用いたが、個体差を打ち消すような画期的な成果は得られていない。しかし、いずれの製剤を用いても成熟卵を得ることはできる。個体差をどのように克服するかが課題となるが、現状は同じ投与方法、投与回数であっても得られる結果にばらつきを認める。むしろ個体差があることを前提とした投与方法、すなわち卵胞の発育を超音波診断装置や内視鏡などを用いてモニタリングしながらホルモン製剤を投与するという戦略を導入するべきかもしれない。発育した卵胞内の卵を成熟させるために hCG 製剤を投与するが、その適切な投与量、投与時期の決定には至っていない。卵胞発育のときに認めた個体差をそのまま反映して、成熟卵の採取にバラツキが見られる。すなわち、発育した全ての卵胞は、それぞれ異なった状態にあることを意味している。

以上のように、現時点では良好な卵を採取するための安定した技術は確立されていない。今後、hCG 投与のタイミング、hCG 投与から卵採取までの時間を個体ごとに決定していくための指標を見出すことが重要と考える。

2) 体細胞核移植法の検討

一般的には、ノダゾール処理により、細胞は分裂のための微小管重合が起きないため、M 期で停止する。しかしながら、MSC を用いて検討した結果、ノダゾール無添加、コントロール群と比較してもほとんど変化が見られず、MSC に対するノダゾールの濃度及び反応時間がまだ最適化されていない、または他の細胞に比べ、MSC はノダゾールに対する感受性が低い可能性があることが考えられた。

本年はカニクイザル体細胞核移植法の基盤技術を確立するために、主に3つの点(1)クローン胚の活性化法の検討、(2)薬剤による初期化誘導法および(3)受精卵の利用について検討を行った。クローン胚の活性化法について、今回検討した2法では、いずれにおいても胚盤胞への発生が確認されず、昨年行った Ionomycin (IM) + DMAP 処理がより効果的なものであると考えられた。IM + DMAP 処理において、胚盤胞が得られたことは、受精直後から初期の卵細胞質内で生じている現象を模倣でき、その結果、十分な発生能を誘起できたことが大きい要因の一つであるかもしれない。

次に薬剤による初期化誘導法の検討を行った。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA はクローン胚のドナーである体細胞核の遺伝子発現を初期胚時の状態に誘導するものと考えられる。今回、カニクイザル体細胞クローン胚に対して処理を行ったが、胚盤胞への発生は見られず、その効果が確認できなかった。しかし、マウスに対する有効性が示されていることから、カニクイザルにおいても、他の効果的と考えられる核移植関連技術と組み合わせることで、クローン胚の発生を改善することが期待できるものと考えられる。

受精卵を利用した核移植技術の検討に着手したところであるが、胚盤胞の前のステージである桑実胚への発生を確認する事ができた。これは精子によって正常な発生能を誘起された細胞質を利用している点を利点の一つとして挙げられる。しかし、受精卵の核の確認が非常に難しく、確実な除核法の確立という解決すべき課題を残した。今後さらに検討を重ね、本

法の有効性を確認する予定である。

3) iPS 細胞の樹立検討

本検討において、体細胞クローン ES 細胞と同様な性質を持つと考えられる iPS 細胞の樹立をカニクイザルで行った。初期化を誘導する4遺伝子の内、Oct3/4 および c-Myc を新たにクローニングすることに成功した。既知の Sox2 および Klf4 と併せて4つの遺伝子を新生児皮膚由来細胞 (NSC) および胎児肝臓由来細胞 (FHC) に導入を行い、iPS 細胞の誘導が可能かどうかを検討した。実際に両細胞種から ES 細胞に非常によく似た形態をもつコロニーが形成され、繰り返された継代によっても類似の形態を持つコロニーとして維持された。次にこれらの細胞株の特徴を ES 細胞と比較するために、未分化マーカーおよび多分化能を確認した。未分化マーカーについては Oct3, Nanog, SSEA4, TRA-60, および TRA-81 の発現が確認され、SSEA1 および SSEA3 の発現は確認されなかった。これはカニクイザル ES 細胞の発現様式と一致した。つまり、カニクイザル ES 細胞と同様な未分化状態にあることを示唆した。

次に、多分化能については、胚様体の作出とそれから各種体細胞への分化を確認すること、および免疫不全マウスへ移植し、三胚葉から成るテラトーマ形成を確認することが必要である。前者については一部確認することができた。すなわち、細胞株コロニーを浮遊培養したところ、ES 細胞のものと類似した胚様体を形成した。さらに、この胚様体から神経などの細胞種への分化が形態的に見ることができた。以上、性状解析の途中であるが、非常にカニクイザル ES 細胞と同様な性状を示すことから、本検

討によって誘導された細胞株は iPS 細胞であるものと考えられた。

E. 結論

1) 卵採取法の検討

安定した卵採取技術の確立には至っていない。今後、hCG 投与のタイミング、hCG 投与後卵採取までの時間を個体ごとに見極める手法を開発することが重要と考える。

2) 体細胞核移植法の検討

ノダゾールを用いて、MSCをM期にあわせる試みをおこなったが、明らかな効果が見られなかった。今後、更にノダゾール濃度や反応時間を検討していくと共に、MSCだけではなく、皮膚由来繊維芽細胞の体細胞等を用いた同調検討を行う。また、体細胞核移植によって構築されたクローン胚の活性化誘起法としては、Ionomycin + DMAP 処理が有効であることが確認できた。技術的にも検討を重ねる必要があるが、受精卵を利用した核移植方法は、カンクイザルの体細胞核移植において大いに期待できるものと考えられた。

3) iPS 細胞の樹立検討

iPS 細胞の誘導をカンクイザルでも可能であることを示唆する結果が得られた。さらに、性状解析を行い、カンクイザル ES 細胞と同様な性状を持つ細胞株であるかを調べる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimozawa N, Sankai T, Ogura A.

Reproductive technologies and related studies in the cynomolgus monkey. J Mamm Ova Res, 25:133-142, 2008.

2) Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Murata T, Hirose H, Katayama K, Wakisaka N, Miyoshi H, Yokoyama KK, Sankai T, Ogura A. Stable ES cell lines in rabbits - potential small animal models for human ES cell research. Reprod Biomed Online, 17: 706-715, 2008.

3) Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Sekita Y, Hanaki K, Akatsuka K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Ultrastructure of placental hyperplasia in mice: Comparison of placental phenotypes with three different etiologies. Placenta, 29:753-759, 2008.

4) 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 and Development, 17:367-382, 2008.

5) 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. Gene Therapy. 16:726-733, 2008.

6) Kishi Y, Inoue M, Tanaka Y, Shibata H,

- Masuda S, Ikeda T, Hasegawa M, Hanazono Y. Knockout Serum Replacement (KSR) has a suppressive effect on Sendai virus-mediated transduction of cynomolgus ES cells. *Cloning and Stem Cells*, 10:307-312, 2008.
- 7) Kishi Y, Tanaka Y, Shibata H, Nakamura S, Takeuchi K, Masuda S, Ikeda T, Muramatsu S, Hanazono Y. Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of nonhuman primate ES cells into immunodeficient mice. *Cell Transplantation*, 17:1095-1102, 2008.
- 8) Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Therapy*, 16:297-302, 2009.
- 9) Sultana F, Hatori M, Shimozawa N, Ebisawa T, Sankai T. Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *JAALAS*, 48:1-5, 2009.
- 10) Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Tadashi Iwanaka, Muramatsu S, Kondo Y, Takahashi K, Yamanaka S, Hanazono Y. ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplantation*, *in press*.
- 11) Honda A, Hirose M, Inoue K, Hiura H, Miki H, Ogonuki N, Sugimoto M, Abe K, Kanatsu-Shinohara M, Kono T, Shinohara T, Ogura A. Large-scale production of growing oocytes in vitro from neonatal mouse ovaries. *Int J Dev Biol*, *in press*.
- 12) Miki H, Hirose M, Ogonuki N, Inoue K, Kezuka F, Honda A, Mekada K, Hanaki K, Iwafune H, Yoshiki A, Ishino F, Ogura A. Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. *Genesis*, *in press*.
2. 学会発表
- 1) Shimozawa N, Nakamura S, Hatori M, Sankai T. Characterization of a novel primate embryonic stem cell line in African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). 41st Annual Meeting of The Society for the Study of Reproduction. May 27-30. 2008. Hawaii.
- 2) Shimozawa N, Hatori M, Sankai T. Fertility of older female cynomolgus monkeys compared with younger monkeys. International Primatological Society XXII Congress. August 3-8. 2008. Edinburgh.
- 3) Shibata H, Terao K. Phenotype and function of natural killer cells in cynomolgus monkeys. International Primatological Society XXII Congress. August 3-8. 2008. Edinburgh.
- 4) Higashino A, Shibata H, Terao K. Establishment of an ELISA system for the

detection of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) auto-antibodies against calreticulin. International Primatological Society XXII Congress. August 3-8, 2008. Edinburgh.

5) Sultana F, Hatori M, Shimozawa N, Sankai T. Continuous observation of microscopic development of mouse and rabbit pre-implantation embryos in vitro. 15th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction. August 6-7, 2008. Bangladesh.

6) Masuda S, Obara Y, Ageyama N, Shibata H, Ikeda T, Ueda Y, Ozawa K, Hanazono Y. Co-transplantation of MSC improves the engraftment of HSC after auto-iBMT in non-human primates. 第50回アメリカ血液学会総会、米国、サンフランシスコ、2008.

7) 下澤律浩、中村紳一郎、羽鳥真功、山海直。アフリカミドリザルにおける新規な非ヒト霊長類 ES 細胞の樹立。第55回日本実験動物学、2008年5月、仙台。

8) 羽鳥真功、Fowzia Sultana、下澤律浩、八神健一、山海直。カニクイザル胚性幹細胞株における神経細胞への分化誘導。第55回日本実験動物学会、2008年5月、仙台。

9) 藤本浩二、高野淳一郎、羽成光二、大藤圭子、加藤美代子、牛尾直美、成田豊子、下澤律浩、山海直、吉田高志、保富康宏。カニクイザル繁殖コロニーにおけるサルタイプ D レトロウイルス (SRV/D) の感染様式と SPF 化。第55回日本動物実験学会、2008年5月、仙台。

10) 東濃篤徳、数藤由美子、菊池俊彦、東濃佳子、柴田宏昭、寺尾恵治。カニクイザルの染色体情報を伴うマイクロサテライトマーカー開発の試み、第24回日本霊長類学会大会、2008年7月、東京。

11) 寺尾恵治、東濃篤徳、柴田宏昭。老齡カニクイザルで検出される自己抗体 (抗単鎖 DNA 抗体) の概要と産生機序に関する考察、第24回日本霊長類学会大会、2008年7月、東京。

12) 本多新、廣瀬美智子、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、下澤律浩、羽鳥真功、清水なつみ、村田武英、広瀬めぐみ、形山和史、脇阪紀子、三好浩之、横山和尚、山海直、小倉淳郎。ウサギES細胞の効率的な樹立とその維持。第3回ウサギフォーラム—医療に貢献する実験用ウサギ—、2008年7月、神戸。

13) 増田茂夫、小原陽子、揚山直英、柴田宏昭、池田たま子、上田泰次、小澤敬也、花園豊。霊長類モデルにおける間葉系幹細胞の共移植による造血幹細胞の生着促進、第70回日本血液学会総会、2008年10月、京都。

14) 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、「幹細胞の可塑性と未分化維持機構」成果公開シンポジウム「幹細胞研究を支える新しいテクノロジー」、2008年2月、東京。

15) 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、第10回麻布大学「生殖・発生工学セミナー」、2008年2月、相模原。

16) 小倉淳郎. 雄性生殖細胞の発生と受精
能、第10回生殖工学研究会、2008年3月、
東京.

2008年5月、仙台.

17) 小倉淳郎. 胚を組み立てる一顕微授精
と核移植、第55回日本実験動物学会総会、

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

研究分担者 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

実験に使用するカニクイザル卵の質は本研究の結果に大きく影響するため、良質な卵を採取する方法を確立することは、研究を遂行するうえで極めて重要な課題である。ここでは、ホルモン製剤の投与方法とその結果について考察した。内因性性ホルモンの影響を受けないように GnRHa を投与し、卵胞発育を誘起するために eCG、hMG、FSH あるいはリコンビナント FSH を複数回投与した。また、発育した卵胞内の卵を成熟させるために hCG を投与した。ホルモン製剤の様々な組み合わせで卵採取を試みきたが、現在のところ、個体差を無視できる安定した卵採取技術の確立には至っていない。今後、hCG 投与のタイミング、hCG 投与から卵採取までの時間を個体ごとに見極める手法を開発することが重要と考える。

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重要課題である。使用する卵の質は、得られる研究成果に大きな影響を与える。しかし、カニクイザルの卵胞発育誘起は個体差が無視できるような安定した技術は確立されていない。分担研究の目的は安定した卵採取技術を開発することである。

ホルモン製剤を用いた卵胞発育誘起には以下のような配慮しなければならない点が存在する。

- ・投与ホルモンとカニクイザル卵巣レセプターとの結合力
- ・カニクイザルの体重とホルモン投与量の関係

・ホルモン製剤の種類と組み合わせ

・投与するホルモンに対する内因性ホルモンの影響

・ホルモン反復投与による抗体の産生とその抗体の影響

本稿では、これまでの経験をもとに上記のポイントについて考察し報告する。

B. 研究方法

本研究は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で飼育管理されているカニクイザルを用いて実施した。以下の項目について検討した。

- 1) 内因性性ホルモンの分泌抑制

月経を確認し、直ちに GnRHa を静脈内投与し、その後の末梢血 E2、プロジェステロン濃度を測定することで月経周期への影響を検索した。

2) 卵胞発育誘起

卵胞発育を誘発させるために、eCG、hMG、FSH、リコンビナント FSH などをそれぞれ反復投与する実験を行った。また、各ホルモンの投与量、投与時期についても検討した。

3) 卵の成熟誘起

卵の成熟を促すためにhCGを単発投与した。また、投与のタイミング、hCG 投与から卵採取までの時間について検討した。

(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

1) GnRHa の利用

月経時に GnRHa を投与することで FSH、LH の一過性の分泌を誘発し、その後、FSH、LH の分泌が抑制されることを確認した。

2) 卵胞発育誘起

各種ホルモン製剤、eCG、hMG、FSH、リコンビナント FSH を用い、投与量、投与時期を検討した結果、いずれの製剤においても個体差を認めた。良好な卵を回収することもあれば、ほとんど卵胞が発育しない個体も存在した。

3) 卵の成熟誘起

すべての卵採取実験において卵の成熟を促すための方法としてhCG 製剤の単発投与を行ってきたが、実験ごとに得られる卵の質は異なっていた。1 回の卵採取で GV、GVBD、MII など複数のステージの卵が採取されることが多く、完全なhCG の効果を期待できる方法は確立できていない。

D. 考察

いくつかの試みの中で、GnRHa 投与がある。月経時に GnRHa を投与することで内因性の FSH、LH の分泌を抑制する結果を得ている。すなわち、GnRHa 投与により、卵巣を休止状態に誘導することが可能になったといえる。GnRHa を用いない場合、月経周期にあわせて卵胞発育を目的としたホルモンを投与しなければならなかった。しかし、卵巣を休止状態に誘導することで、内因性ホルモンを無視してホルモン投与を開始することが可能になった。この技術により作業上の時間に余裕がもてるようになったことはいうまでもなく、投与するホルモンの量、投与時期を検討することで卵胞発育をコントロールできる可能性がでてきた。分担研究者は同様の考え方にに基づき月経が発来していない未性成熟個体を用いて卵胞発育を誘発した経験がある。これらの個体にホルモン製剤を投与すると投与回数を増すごとに外陰部が顕著に赤く腫脹した。また、比較的良好な卵胞が発育することを確認している。

サル類では、卵胞を発育させるために eCG、hMG、FSH、リコンビナント FSH などのホルモン製剤が用いられている。これらのホルモンを複数回投与することで卵胞を発育させる。記

載したすべてのホルモン製剤を用いて実験を行っているが個体差を打ち消すような画期的な成果は得られていない。しかし、いずれの製剤を用いても成熟卵を得ることはできる。個体差をどのように克服するかが課題となるが、現状は同じ投与方法、投与回数であっても得られる結果にばらつきを認める。むしろ個体差があることを前提とした投与方法、すなわち卵胞の発育を超音波診断装置や内視鏡などを用いてモニタリングしながらホルモン製剤を投与するという戦略を導入すべきかもしれない。また、同一個体を実験に再利用する場合、これらのホルモンに対する抗体が問題となる。同じ製剤を用いて 2 回目の実験を行った場合、卵胞が全く発育しないという経験がある。eCG について抗体価を測定したところ、検索したすべての個体が抗体を産生していた。FSH 製剤を用いたときの抗体価は測定していないが、eCG よりも分子量が小さいため抗体ができにくいことも予測される。このような観点で判断すると FSH 製剤は理想的な卵胞発育誘起ホルモンかもしれないが、半減期がきわめて短いことも知られている。また、リコンビナント FSH 製剤を用いることでより安定した成果が得られるものと期待したが、今のところ個体差を無視できるような成果は認められていない。同一個体で卵胞発育誘起を試みる場合、現状では異なったホルモン製剤を使用しなければならない。

発育した卵胞内の卵を成熟させるために hCG 製剤を投与しているが、未だ投与量、投与時期の決定には至っていない。卵胞発育と同様個体差を認める。投与した hCG は発育した卵胞内の顆粒膜細胞に作用し卵の成熟を促す

ものと考えられ、卵胞発育のときに認めた個体差がそのまま反映しているものと思われる。これまでの経験ではほとんどの場合、1 度の卵採取で様々なステージの卵が回収されている。すなわち、発育した卵胞はすべて同等のものという解釈は危険であり、それぞれ異なった状態にあると考えなければならないことを意味している。

以上のように、現時点では良好な卵を採取するための安定した技術は確立されていない。今後、hCG 投与のタイミング、hCG 投与から卵採取までの時間を個体ごとに決定していくための指標を見出すことが重要と考える。また、未成熟卵も多数採取できることを考えると、体外成熟培養技術の確立も本研究を遂行するうえで重要な課題かもしれない。

E. 結論

良質な卵を採取することを目的として、ホルモン製剤の投与方法とその結果について考察した。しかし、安定した卵採取技術の確立には至っていない。今後、hCG 投与のタイミング、hCG 投与後卵採取までの時間を個体ごとに見極める手法を開発することが重要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimozawa N, Sankai T, Ogura A. Reproductive technologies and related studies in the cynomolgus monkey. J Mamm

Ova Res, 25:133-142, 2008.

2) Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Murata T, Hirose H, Katayama K, Wakisaka N, Miyoshi H, Yokoyama KK, Sankai T, Ogura A. Stable ES cell lines in rabbits - potential small animal models for human ES cell research. *Reprod Biomed Online*, 17: 706-715, 2008.

3) Sultana F, Hatori M, Shimozawa N, Ebisawa T, Sankai T. Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *JAALAS*, 48:1-5, 2009.

2. 学会発表

1) Shimozawa N, Nakamura S, Hatori M, Sankai T. Characterization of a novel primate embryonic stem cell line in African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). 41st Annual Meeting of The Society for the Study of Reproduction. May 27-30. 2008. Hawaii.

2) Shimozawa N, Hatori M, Sankai T. Fertility of older female cynomolgus monkeys compared with younger monkeys. International Primatological Society XXII Congress. August 3-8. 2008. Edinburgh.

3) Sultana F, Hatori M, Shimozawa N, Sankai

T. Continuous observation of microscopic development of mouse and rabbit pre-implantation embryos in vitro. 15th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction. August 6-7. 2008. Bangladesh.

4) 羽鳥真功、Fowzia Sultana、下澤律浩、八神健一、山海直. カニクイザル胚性幹細胞株における神経細胞への分化誘導. 第55回日本実験動物学会、2008年5月、仙台.

5) 下澤律浩、中村紳一郎、羽鳥真功、山海直. アフリカミドリザルにおける新規な非ヒト霊長類ES細胞の樹立. 第55回日本実験動物学、2008年5月、仙台.

6) 本多新、廣瀬美智子、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、下澤律浩、羽鳥真功、清水なつみ、村田武英、広瀬めぐみ、形山和史、脇阪紀子、三好浩之、横山和尚、山海直、小倉淳郎. ウサギES細胞の効率的な樹立とその維持. 第3回ウサギフォーラム - 医療に貢献する実験用ウサギ -, 2008年7月、神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

体細胞候補の検索と細胞周期の制御に関する研究

研究分担者 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はだかっている。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未受精卵に移植したクローン胚から作出されるクローン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、昨年と同様にクローン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、健康なカニクイザル成体の腸骨又は大腿骨から骨髄を採取し、骨髄細胞を単離した。単離した細胞を 20%FBS-a(+)-MEM に懸濁して、37°C、5%CO₂ 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、

附着した細胞を培養し、この細胞をMSCとした。MSCをM期に合わせるために、有糸分裂阻害剤であるノダゾールを 0.4 又は 4.0 mg/mL 添加し、2、4、6、16 時間培養をおこない、ノダゾール添加後の影響を経時的に調査した。細胞は、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℃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。ノダゾール処理したMSCを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」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、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/D. 研究結果及び考察

同一個体由来のMSCにノダゾール 0.4 mg/mL 又は 4.0 mg/mL を添加し、2、4、6、16

時間反応後のMSCの細胞周期をPI染色によるフローサイトメーターで解析した。ノダゾール添加量及添加後の反応時間に比例して、物理的な細胞障害の傾向は見られたものの、G0/G1期、S期、G2/M期の割合の変化はほとんど無なかった(図1)。

一般的には、ノダゾール処理により、細胞は分裂のための微小管重合が起きないため、M期で停止する。しかしながら、ノダゾール無添加、コントロール群と比較してもほとんど変化がないので、MSCに対するノダゾールの濃度及び反応時間がまだ最適化されていない可能性はあるが、他の細胞に比べ、MSCはノダゾールに対する感受性が低い可能性が示唆された。

E. 結論

ノダゾールを用いて、MSCをM期にあわせる試みをおこなったが、処理方法の最適条件が、まだ不十分であった。今後、更にノダゾール濃度や反応時間を検討していくと共に、MSCだけではなく、皮膚由来繊維芽細胞の体細胞等を用いたM期の同調条件の検討等もおこなっていききたい。

F. 健康危険情報

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 and Development*, 17:367-382, 2008.
- 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. *Gene Therapy*. 16:726-733, 2008.
- 3) Kishi Y, Inoue M, Tanaka Y, Shibata H, Masuda S, Ikeda T, Hasegawa M, Hanazono Y. Knockout Serum Replacement (KSR) has a suppressive effect on Sendai virus-mediated transduction of cynomolgus ES cells. *Cloning and Stem Cells*, 10:307-312, 2008.
- 4) Kishi Y, Tanaka Y, Shibata H, Nakamura S, Takeuchi K, Masuda S, Ikeda T, Muramatsu S, Hanazono Y. Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of nonhuman primate ES cells into immunodeficient mice. *Cell Transplantation*, 17:1095-1102, 2008.
- 5) Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Therapy*, 16:297-302, 2009.
- 6) Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Tadashi Iwanaka, Muramatsu S, Kondo Y, Takahashi K, Yamanaka S, Hanazono Y. ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplantation*, *in press*.
2. 学会発表
- 1) 東濃篤徳、数藤由美子、菊池俊彦、東濃佳子、柴田宏昭、寺尾恵治 カニクイザルの染色体情報を伴うマイクロサテライトマーカー開発の試み 第24回日本霊長類学会大会、東京、2008
- 2) 寺尾恵治、東濃篤徳、柴田宏昭 老齢カニクイザルで検出される自己抗体(抗単鎖DNA抗体)の概要と産生機序に関する考察 第24回日本霊長類学会大会、東京、2008.
- 3) 増田茂夫、小原陽子、揚山直英、柴田宏昭、池田たま子、上田泰次、小澤敬也、花園豊 霊長類モデルにおける間葉系幹細胞の共移植による造血幹細胞の生着促進 第70回日本血液学会総会、京都、2008.
- 4) Shibata H, Terao K. Phenotype and function of natural killer cells in cynomolgus monkeys. International Primatological Society XXII Congress. August 3-8. 2008. Edinburgh.
- 5) Higashino A, Shibata H, Terao K. Establishment of an ELISA system for the detection of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) auto-antibodies against calreticulin. International Primatological Society XXII Congress. August 3-8. 2008. Edinburgh.
- 6) Masuda S, Obara Y, Ageyama N, Shibata

- H, Ikeda T, Ueda Y, Ozawa K, Hanazono Y.
Co-transplantation of MSC improves the
engraftment of HSC after auto-iBMT in
non-human primates. 第 50 回アメリカ血液学
会総会、米国、サンフランシスコ、2008.
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究分担者 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を使用した核移植技術は確立されていない。そのため核移植胚に由来するクローン ES 細胞は樹立されていない。そこで、マウス体細胞核移植において効果的と報告されている処理法などをカニクイザルの体細胞クローン胚作出の基盤技術に応用するためにいくつかの検討を行った。構築された核移植胚の活性化刺激を検討したところ、Ionomycin および Dimethylaminopurine 処理の有効性が改めて確認された。核の初期化を誘導するために、トリコスタチン A (TSA) 処理を行ったが、クローン胚の発生に改善は認められなかった。また、受精卵をレシピエントとして用いた核移植法の検討を開始し、桑実胚への発生を確認した。カニクイザル体細胞核移植における多様な検討を行い、カニクイザル体細胞核移植に効果があると考えられる処理法が確認された。

A. 研究目的

クローン ES 細胞はマウスにおいて初めて樹立され、さらにサル類では、その効率は非常に低いもののアカゲザルにおいても樹立された。一方、カニクイザルにおいてもクローン個体やクローン ES 細胞を樹立するための多くの検討が行われているが、そのいずれも成功に至っていない。クローン ES 細胞を樹立するためには、それを作出する核移植技術の確立が急務である。しかしながら、核移植において作出されるクローン胚の発生に影響する要因として、卵の質、顕微操作法、活性化誘起法あるいは

体外培養法など様々なものが挙げられる。これらの各項目について、一つずつその効果の有無を検討することで本研究課題であるクローン ES 細胞を樹立するという目的に到達できるものと考えられる。そこで、マウスにおける体細胞核移植などにおいて効果的と報告されている手法をカニクイザル体細胞核移植技術へ応用することで、カニクイザルにおける体細胞クローン作出の基盤技術を洗練し、その高度化を計った。

B. 研究方法

カニクイザルにおける体細胞核移植技術の検討として、(1)クローン胚の活性化法、(2)薬剤による初期化誘導法および(3)受精卵の利用の3つの項目に関して検討を行った。

(1)クローン胚の活性化法の検討

常法により、カニクイザル成熟卵の核を除去後、卵周囲を覆っていた G0 期の卵丘細胞を除核卵の細胞質内に注入した。それから 1-2 時間後に活性化処理を開始した。活性化処理には Ca Ionophore (CA) + Dimethylaminopurine (DMAP) または電気刺激 + DMAP の処理を行い、その後のカニクイザルクローン胚の発生を比較した。

(2)薬剤による初期化誘導法

マウスにおける核移植研究において有効性が報告されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) 溶液にクローン胚を浸漬した。

(3)受精卵の利用

成熟卵に顕微授精を行って作出した受精卵を核移植に応用する検討を行った。2 細胞期に分割する直前の体細胞分裂中期のステージの胚をレシピエントとし、卵丘細胞を顕微注入して、クローン胚を作出した。

クローン胚の発生培養については、サル受精卵の培養に広く用いられている 10%ウシ胎児血清加 CMRL-1066 を使用した。

(倫理面への配慮)

理化学研究所および医薬基盤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)クローン胚の活性化法の検討

CA + DMAP 処理において、12 個が桑実胚へ発生したものの、胚盤胞への発生は認められなかった。一方、電気刺激 + DMAP 処理では、桑実胚および胚盤胞への発生は確認できなかった。

(2)薬剤による初期化誘導法

TSA 処理によるクローン胚の胚盤胞あるいは桑実胚への発生は確認できなかった。

(3)受精卵の利用

実験に着手したばかりである。実際の顕微操作において、受精卵の核の除去に難しいところがあり、さらに検討を重ねる必要がある。そのような現状において、胚盤胞への発生は見られなかったものの、桑実胚への発生が 2 個確認された。

D. 考察

本年はカニクイザル体細胞核移植法の基盤技術を確立するために、主に 3 つの点-(1)クローン胚の活性化法の検討、(2)薬剤による初期化誘導法および(3)受精卵の利用-について検討を行った。これらはカニクイザルだけでなく、霊長類の体細胞核移植が確立されていない現状では、検討しなければならない課題である。このような核移植に関わる一つ一つの操作において、効果が認められるものを実際のカニクイザル体細胞核移植の一連の操作に取り入れることで、良質なクローン胚盤胞の作出、そしてクローン ES 細胞の作出に大きく貢献するものと考えられる。

実際にまずクローン胚の活性化法について 2