

200911001A・B

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19～21年度 総合研究報告書
平成21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22(2010)年 3月

目 次

総合研究報告書(平成19～21年度)

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
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	

I. 総括研究報告(平成21年度)

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 ……	17
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	

II. 分担研究報告(平成21年度)

1. 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 ……	24
山海 直 (独)医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	
2. 体細胞候補の検索と細胞周期の制御に関する研究 ……	28
柴田 宏昭 (独)医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	
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 ……	33
小倉 淳郎 理化学研究所・バイオリソースセンター	
4. カニクイザル体細胞由来iPS細胞樹立に関する検討 ……	38
下澤 律浩 (独)医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	43
------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……	45
--------------------	----

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)
平成 21 年度総括研究報告書

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

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 細胞に加え、それと同等の性質を持つとされる iPS 細胞という多能性幹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における体細胞に由来する多能性幹細胞は、将来的にヒト多能性幹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。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、GnRHa、FSH、hCG の組み合わせで卵巣を刺激することで、ある程度の卵の数を確保できるものの、個体差が存在した。体細胞核移植技術においては、卵を採取するカニクイザルの成熟および未成熟間において、クローン胚を作製、発生させる上で明確な差を認めるには至らなかったが、成熟個体に由来する卵を使用することの優位性が示唆された。iPS 細胞の作製において、その性状解析によって、正常核型の安定的維持、未分化マーカーの発現および三胚葉性テラトーマ形成能が確認され、カニクイザル自身の遺伝子を利用することでヒトなどと同様に iPS 細胞の誘導が可能であることを明らかにした。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 細胞を樹立する基盤的な技術が構築された。また、免疫拒絶のない iPS 細胞をカニクイザルで樹立可能であることを確認した。

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
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

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細胞およびiPS細胞を樹立することを目的とし、再生医療等の前臨床研究にサルモデルを利用できるようにすること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、実績のある実験動物の一つである。このカニクイザルにおいて、免疫拒絶を生じないようなクローンES細胞およびiPS細胞は、将来的にヒト多能性幹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。そこで、クローンES細胞を作出するために必要な卵の採取や核移植に関する検討、さらにiPS細胞の性状解析を行った。

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細胞の性状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

計52頭のメスカニクイザルより、1,873個の卵を回収した。個体あたりの平均採卵数および標準偏差は 36.0 ± 28.9 個であった。採取された卵のMII、GVBDおよびGV期のうちわけは528個(27.7%)、510個(27.2%)および660個(35.2%)であり、実験に使用可能なMII期の卵は3割未満であった。また、採取卵数が10個以下の個体が5頭存在し、その5頭から計13個のMII期卵を採取した。一方、採取卵数100個以上の個体は3頭で、計81個のMII卵を採取した。MII期卵を最も多く回収した個体は、134個の卵を回収した個体であり、71個(53.0%)のMII期卵を含んでいた。

2) 体細胞核移植法の検討

骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)にノコダゾール存在下で24時間培養した後、G2/M期の割合が増える傾向が見られたが、著しくは増えなかった。

次にMSCに SV40 遺伝子を導入し、primary cells と同じ細胞表面マーカー：CD29+CD105+CD116+CD14-CD34-CD44-CD45-を有した不死化細胞を15株得た。更にこの細胞株の幾つかは、継代しても細胞表面マーカーに変化はなかった。また、幾つかの細胞株の多分化能の有無を調べるために、骨芽細胞及び脂肪細胞への分化を試みた。細胞組織染色により骨芽細胞及び脂肪細胞への分化を確認出来た。

hCG 投与後 38 時間に回収した卵を使用した核移植においては、成熟および未成熟個体で、それぞれ成熟卵 259 個および 109 個の内、除核できた卵は 186 個 (72%) および 57 個 (52%) であった。これらに卵丘細胞核を導入して活性化し、培養した。その結果、144 時間後の桑実期胚は、それぞれ 4 個 (2%) および 0 個 (0%) であり、胚盤胞への発生は認められなかった。一方、hCG 投与後 28 時間に回収した卵を使用した核移植においては、成熟および未成熟個体で、それぞれ成熟卵 161 個および 15 個の内、除核できた卵は 94 個 (58%) および 10 個 (67%) であった。これらに卵丘細胞核を導入して活性化し、培養した。その結果、144 時間後の桑実期胚は、それぞれ 3 個 (3%) および 0 個 (0%) であり、胚盤胞への発生は成熟個体由来において 1 個 (1%) が確認された。

3) iPS 細胞の樹立検討

1 株の新生仔皮膚由来および 5 株の胎仔肝臓由来の iPS 細胞全てで Oct3、SSEA4、Nanog および TRA-2-54 の発現を確認した。SSEA3 については、発現は確認されなかった。1 株の新生仔皮膚由来および 4 株の胎仔肝臓

由来の iPS 細胞は、1 株の胎仔肝臓由来 iPS 細胞を除いた全てで奇形種を形成した。これら奇形種は外胚葉、内胚葉および中胚葉の三胚葉性の細胞種から成るテラトーマであることが確認された。核型解析については、1 株の新生仔皮膚由来および 3 株の胎仔肝臓由来の iPS 細胞のそれぞれ 50 個を調べたところ、前者で 41 個 (81%)、後者で 39 個 (78%)、41 個 (81%) および 46 個 (86%) で正常核型を示した。羊膜由来細胞における iPS 細胞への誘導検討については、アルカリフォスファターゼ陽性細胞を持つコロニーが多数確認された。しかし、そのコロニー内には陽性細胞および陰性細胞が混在していた。

D. 考察

1) 卵採取法の検討

本研究では GnRH、FSH および hCG を用いた卵の採取について検討した結果、52 頭の個体から 519 個 (27.7%) の MII 卵を採取した。MII 卵の他に 27.2% の GVBD 卵が採取されており、これらの卵を MII 期の状態で回収することが可能になれば MII 卵は回収卵の約 50%、すなわち 2 倍量採取できることになる。そのためには、投与した hCG を均一に作用させ卵胞卵を成熟させる必要がある。hCG に対するレセプター等の詳細な検討が必要と考える。MII 卵であってもその質は結果に影響する重要な要因となる。本法で得られた卵の核、細胞質の状態の詳細な検討は行っていない。回収する卵の数に注目すると同時に、より良質な卵を得るための技術開発が課題として残っている。

回収卵数は 1 個体あたり平均 36.0 個である

が、標準偏差が 28.9 と極めて大きい。このことは投与した FSH に対する反応性に個体差があることを意味している。サル類の場合、実験動物として人工管理下で飼育されたとしても、遺伝的に均一な個体は存在しない。それがサルの多様性であり、サル類を研究に用いる意義の一つでもある。個体差の小さい卵巣刺激法が確立されれば画期的に研究が進展する可能性があるが、サル類を用いる以上、個体差があることは覚悟しなければならないのかもしれない。

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が確立されたとは言えない状況にある。個体ごとに結果が安定しないということが、研究の進行に影響していることは確かである。今後、個体ごとにモニタリングし、ホルモン投与スケジュールを個体ごとに操作するなどの戦略が考えられる。

2) 体細胞核移植法の検討

MSCにノダゾール存在下で 24 時間培養したけれども、その薬剤の効果であるG2/M期に同調した細胞は著しく増えなかった。MSCの場合には、他の細胞に比べ、ノダゾール処理濃度や時間を更に長くする必要があることが示唆された。SV40 遺伝子を導入したMSCで primary cells と同じ細胞表面マーカー：CD29+CD105+CD116+CD14-CD34-CD44-CD45-を有した不死化細胞を 15 株得た。この細胞株を用いれば、未熟な細胞をより簡便に利用出来るため、今後の体細胞核の提供が容易になることが考えられた。また、他の体性幹細胞の不死化への応用の可能性も期待される。

hCG 投与後 38 時間に回収した卵を使用し

たとき、成熟個体に由来する卵における除核率は未成熟個体よりも高い傾向にあることが認められた。その後の発生においても、着床前期胚のより後期にあたる桑実胚への発生が成熟個体由来の卵を使用したときに確認された。これらのことは、hCG 投与によって誘導された卵の成熟からの時間が比較的長いときには、除核および核移植卵の発生の面から、成熟個体を使用する方が良いことが示唆された。また、hCG 投与後 28 時間に回収した卵を使用したとき、除核率においては、成熟個体および未成熟個体に差は認められず、核移植卵の発生においては、成熟個体由来の卵においてのみ、胚盤胞への発生が認められた。卵の成熟期間が短い間に回収された卵においても、未成熟個体よりも成熟個体に由来する卵を使用する利点が確認された。以上のことより、カニクイザルにおけるクローン研究に成熟個体の利用が良いことが推察された。なお、マウスにおいては、未成熟個体から採取される卵の数は成熟個体よりも多いことが知られている。このため、サルにおいても同様な効果を期待したが、必ずしも卵の数が多く採取できることはなく、クローン研究に使用できる卵を確保するという利点が認められなかった。個々の実験をみると、未受精卵の核を除去できないこともあり、個体間におけるバラツキが大いに認められた。これは、遺伝的に均一なマウスと異なり、サル個体間の遺伝的多様性に一因があるものと考えられ、より効率的なクローン胚作出検討を行うために、1 実験に複数頭のサルが準備されることも十分考慮される事項であると考えられた。

免疫拒絶のない ES 細胞を樹立することを目的に、単為発生由来の ES 細胞樹立に着手したところ、2個の単為発生に由来する胚盤胞への発生が確認され、これらの内部細胞塊を MEF 上で培養した。これらの内、1個で内部細胞塊の outgrowth を確認した。この outgrowth した内部細胞塊は、受精卵由来のものとは比べ、成長速度が遅いことが観察された。通常10〜14 日ほどで継代できる大きさに成長するのだが、単為発生由来のものでは、2週間を過ぎてもそれ程までの成長は認められなかった。この原因として、内部細胞塊の質あるいはメスゲノムのみで構成されていることに一因があると考えられた。これを改善するためには、良質な胚盤胞、特に内部細胞塊を形成させることが重要であり、単為発生誘起の方法および体外培養の方法をさらに改良する必要性が感じられた。また、核移植実験において、胚盤胞への発生はほとんど認められなかった。これには、核移植卵の作出方法、発生能あるいは体外培養環境など、いくつか要因が考えられるが、この単為発生卵の胚盤胞への発生が認められたことから、体外培養環境が、低い発生率の原因ではない可能性が示唆された。

3) iPS 細胞の性状

免疫蛍光染色による未分化マーカーの発現は、カニクイザル、アカゲザル、ヒト ES 細胞などと同様な発現が確認できた。SSEA3 については、発現が確認できなかったが、これはカニクイザル特有であり、他の霊長類では確認されている。これらのことから、樹立された iPS 細胞の未分化状態は維持されていることが明らかとなった。さらに、多分化能の検討として、テラト

ーマの形成能を調べた。胎児肝臓由来の 1 株を除いた全てで三胚葉性の細胞種からなるテラトーマであることが確認され、多分化能を獲得していることが明らかとなった。テラトーマを形成しなかった 1 株においては、その理由は不明であるが、多分化能を獲得していない、あるいはマウス体内環境下の不適合などが一因にあるかもしれない。核型は、調べられた全てで約 8 割以上の細胞が 42 本の染色体を持つ正常な状態にあることが確認され、その安定性が示された。これらの特徴は、他に報告されている霊長類の ES 細胞や iPS 細胞と類似しており、カニクイザルにおいても、それ自身の Oct3/4、Sox2、Klf4 および c-Myc 遺伝子を導入することで、iPS 細胞が樹立できることが明らかとなった。これらのことからカニクイザルにおいて、iPS 細胞を利用した免疫拒絶のない移植研究などに前臨床研究に先だって利用できるものと考えられた。

E. 結論

1) 卵採取法の検討

良質な卵を採取することを目的として、GnRH α 、FSH、hCG の組み合わせで卵巣を刺激した結果について解析した。ある程度の卵の数を確保し、その中に MII 卵が含まれるが、個体差が存在する。サル類を研究に用いる前提として個体差があることを受け入れ、個体ごとにモニタリングしながら卵巣を刺激する手法の開発が必要である。

2) 体細胞核移植法の検討

ノドダゾールを用いて、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。体細胞核の供給源として、リプログラミングがし易いとされる体性幹細胞を着目し、その体性幹細胞の安定的供給を目的に、MSCの不死化を遺伝子導入で試みた結果、多分化能を有した細胞の株化に成功した。体細胞核移植において、卵を採取するカニクイザルの成熟および未成熟間において、クローン胚を作製、発生させる上で明確な差を認めるには至らなかったが、成熟個体に由来する卵を使用することの優位性が示唆された。また、単為発生由来ES細胞の樹立においては、胚盤胞、特に内部細胞塊の質の向上が必要であることが推察された。

3) iPS細胞の性状

ES細胞と同様な性質を持つiPS細胞の誘導が、カニクイザル自身の遺伝子を利用することで可能であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakurai F, Nakamura S-I, 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.
- 2) Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y., Masud S, Shibata H, Takeuchi K, Komur M, Iwanak T, 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* 18. 381-389. 2009.

- 3) Masuda S, Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K, Ueda Y, Ozawa K, Hanazono Y. Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primate. *Exp Hematology* 37. 1250-1257. 2009.

- 4) Nochi T, Yuki Y, Katakai Y, Shibata H, Tokuhara D, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nakanishi U, Ono F, Mimuro H, Sasakawa C, Takaiwa F, Terao K, Kiyono H. A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J Immunology* 183. 6538-6544. 2009.

- 5) Shimozawa N, Nakamura S, Takahashi I, Hatori M, Sankai T. Characterization of a novel embryonic stem cell line from an intracytoplasmic sperm injection-derived blastocyst in the African green monkey. *Reproduction*, 139. 565-573, 2010.

- 6) Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A. A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS ONE*, 4, e4943. 2009.

- 7) Miki H, Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Mori M, Kim JM, Ohta A, Ogura A. Embryonic rather than extraembryonic tissues have more

impact on the development of placental hyperplasia in cloned mice. *Placenta*, 30, 543-546, 2009.

8) Kim J-M, Ogura A. Changes in allele-specific association of histone modifications at the imprinting control regions during mouse preimplantation development. *Genesis*, 47, 611-616, 2009.

9) Inoue K, Ogonuki N, Mekada K, Yoshiki A, Sado T, Ogura A. Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse. *J Reprod Dev*, 55, 566-569, 2009.

10) Sankai T. In vitro manipulation of nonhuman primates gametes for the application to medical science research. *Primate Res.* (in Japanese with English summary). 医科学への応用を目的としたサル類の発生工学的研究. *霊長類研究* 24: 357-366, 2009.

2. 学会発表

1) S. Masuda, N. Ageyama, H. Shibata, Y. Obara, T. Ikeda, K. Takeuchi, Y. Ueda, K. Ozawa, Y. Hanazono. Co-transplantation of MSCs improves the engraftment of HSCs in nonhuman primates. 第7回幹細胞シンポジウム、東京、2009.5.15-16.

2) S. Masuda, N. Ageyama, H. Shibata, Y. Obara, T. Ikeda, K. Takeuchi, Y. Ueda, K. Ozawa, Y. Hanazono. Improved engraftment of gene-modified HSC after co-transplantation with MSC in non-human primates. 第15回日本遺伝子治療学会総会、大阪、2009.7.9-11.

3) 柴田宏昭、寺尾恵治、保富康宏. 抗 CD2 抗体によるカニクイザル NK 細胞の抗体依存性

細胞性細胞傷害活性の抑制、第18回サル類疾病ワークショップ、神奈川、2009.7.4.

4) S. Masuda, N. Ageyama, H. Shibata, Y. Obara, T. Ikeda, K. Takeuchi, Y. Ueda, K. Ozawa, Y. Hanazono. Co-transplantation of MSCs improves the engraftment of HSCs in nonhuman primates. 第7回国際幹細胞研究学会総会、スペイン・バルセロナ、2009.7.8-11.

5) 柴田宏昭. 霊長類 ES 細胞を用いた再生医療の有効性と安全性評価、第5回霊長類医科学フォーラム、茨城、2009.12.10.

6) 井上 貴美子、越後貫 成美、幸田 尚、佐渡 敬、石野 史敏、小倉 淳郎. 体細胞核移植胚盤胞期胚に観察される遺伝子発現異常の解析. 第102回日本繁殖生物学会大会、奈良、2009年9月.

7) Inoue K, Ogonuki N, Mekada K, Yoshiki A, Sado T, Ogura A, "Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse" 6th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2009 Seam Reap City Cambodia Nov. 2009.

3) 越後貫 成美. 実験動物における顕微授精の応用. 第2回疾患モデルシンポジウム、東京、2009年11月.

8) 小倉 淳郎. 雄性生殖細胞の受精能とゲノム刷り込み. 独立行政法人農業生物資源研究所、生殖機構研究シンポジウム、東京、2009年12月.

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

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

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

サル類を用いた本分野の研究は、広範な応用研究が可能となるため重要課題として位置づけられている。しかし、マウスで確立された方法をそのままサル類に適用しても同様の結果が得られないのが現状である。実験の結果に大きく影響する要因として、使用する卵の質があげられる。すなわち、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と言える。ここでは、カニクイザルから良質な卵を採取することを目指し、採取したカニクイザルの卵に関するデータ解析を行った。内因性の性ホルモンの影響を受けないように GnRH アゴニストを投与して月経周期を停止させ、その後、卵胞発育を誘起するために 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。この方法により、実験に使用可能なMII期の卵は採取できるが、その数、回収卵の中の MII 期卵の割合は個体差が大きく、安定した技術確立には至っていない。今後も、より効率よく安定して MII 期卵を得るための手法を模索しなければならない。また、得られた MII 期卵の質をより詳細に解析する必要があると考えられた。

A. 研究目的

サル類を用いた発生工学的研究は、広範な応用研究が可能となるためその成果は注目されている。しかし、マウスで確立された方法をそのまま適用しても同様の結果が得られないことを多くの研究者が経験している。実験の結果に大きく影響する要因として、使用する卵の質があげられる。すなわち、できるだけ多くの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となっている。分担研究として、ホルモン製剤による卵

巣刺激後に採取したカニクイザルの卵に関するデータを解析した。

卵巣刺激に用いるホルモン製剤は、様々な点を考慮して選抜していかなければならない。たとえば、投与ホルモンと個体のレセプターとの結合力、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の性ホルモンの影響、ホルモン反復投与による抗体の産生とその抗体の影響などへの配慮が必要となる。

これまでの経験から内因性の性ホルモンの

影響を避けるために GnRH アゴニストの投与が有効であると考えられる。また、抗体産生の可能性が小さく比較的良質な卵胞を発育させることができると思われるものが FSH 製剤である。さらに、卵胞内の卵の成熟を促すためには hCG 製剤の投与が必須と考えられる。そこで今回は GnRH、FSH、hCG の組み合わせで卵巣刺激を施したのちに採取した卵について解析した。

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。性成熟したメスカニクイザル 52 頭から採取した卵を解析対象とした。カニクイザルの月経を確認し、直ちに GnRH アゴニストを投与した。内因性の性ホルモンの分泌が抑制されたと思われる数週間後に FSH あるいはリコンビナント FSH を反復投与した。その後、hCG を投与した。

卵の採取は全身麻酔下で開腹手術を施し、注射針を接続したシリンジを用いて、肉眼で確認できる一つ一つの卵胞か卵胞液、卵丘細胞とともに卵を採取した。卵丘細胞は実体顕微鏡下でヒアルロニダーゼ処理により卵から外し、倒立顕微鏡にて卵を観察した。卵は MII、GVBD および GV 期について見極め記録した。MII 期の卵は体細胞由来クローン胚の作出実験に供した。

(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

計 52 頭のメスカニクイザルより、1,873 個の卵を回収した。個体あたりの平均採卵数および標準偏差は 36.0 ± 28.9 個であった。回収卵の MII、GVBD、GV 期および変性卵のうちわけは 528 個 (27.7%)、510 個 (27.2%)、660 個 (35.2%) および 54 個 (2.9%) であり、実験に使用可能な MII 期の卵は 3 割未満であった。また、採取卵数が 10 個以下の個体が 5 頭存在し、その 5 頭から計 13 個の MII 期卵を採取した。一方、採取卵数 100 個以上の個体は 3 頭で、計 81 個の MII 卵を採取した。MII 期卵を最も多く回収した個体は、134 個の卵を回収した個体であり、71 個 (53.0%) の MII 期卵を含んでいた。

D. 考察

これまでに、卵巣刺激のためのホルモン投与方法として様々な製剤で検討を行ってきた。その経験から GnRH アゴニストの投与で内因性の性ホルモンの分泌を抑制し、性周期を無視して卵巣刺激を開始できることが明らかになってきた。卵胞発育を目的として、eCG、HMG などが使われてきたがここでは、比較的安定した成果が得られ、かつ分子量が小さいために抗体産生が起こりにくいことが予測される FSH を用いたときの結果を解析した。

FSH、hCG の投与量について、さらに投与方法などの工夫を行ってきたが、処理ごとの差

を認めることはできていない。

本研究では受精可能な成熟卵、すなわち MII 卵をより多く採取することが目的の一つとなっているが、GnRH、FSH および hCG を用いて検討した結果、52 頭の個体から 519 個の MII 卵を採取している。この数字は決して悪いものではないと考えているが、総回収卵数は 1,873 個であり、その 27.7% にすぎない。MII 卵の他に 27.2% の GVBD 卵が採取されており、これらの卵を MII 期の状態で回収することが可能になれば MII 卵は回収卵の約 50%、すなわち 2 倍量採取できることになる。そのためには、投与した hCG を均一に作用させ卵胞卵を成熟させる必要がある。hCG に対するレセプター等の詳細な検討が必要と考える。

最大 1 個体から 71 個の MII 卵を回収している。しかし、この卵を使った実験により最良の成果が得られたわけではない。MII 卵であってもその質は結果に影響する重要な要因となる。本法で得られた卵の核、細胞質の状態の詳細な検討は行っていない。回収する卵の数に注目すると同時に、より良質な卵を得るための技術開発が課題として残っている。

回収卵数は 1 個体あたり平均 36.0 個であるが、標準偏差が 28.9 と極めて大きい。このことは投与した FSH に対する反応性に個体差があることを意味している。サル類の場合、実験動物として人工管理下で飼育されたとしても、遺伝的に均一な個体は存在しない。それがサルの多様性であり、サル類を研究に用いる意義の一つでもある。個体差の小さい卵巣刺激法が確立されれば画期的に研究が進展する可能性があるが、サル類を用いる以上、個体

差があることは覚悟しなければならないのかもしれない。FSH は半減期が短く、理論的にはその効果の人為的コントロールが容易な製剤と言える。また、ウサギなどの実験動物では、極めて有用な卵巣刺激製剤となっているが、カニクイザルにおいて個体差を打ち消すような成果は未だ得られていないのが現状である。

今回、投与ホルモンに対する抗体価は測定していない。しかし、FSH は分子量が小さく、比較的抗体が産生しにくい製剤であると考えられる。個体の複数回使用などを考えると、やはり FSH は有用と言える。また、本解析により、回収卵の数、その中の MII 卵の割合に個体差はあることが明確になったが、同時にほぼ確実に MII 卵が得られつということも明らかになった。そういった観点から考えると FSH はカニクイザルの卵巣刺激のための最適なホルモンと言えるかもしれない。ただし、これまで以上の成果を上げるための改良研究は継続していきたいところである。

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が確立されたとは言えない状況にある。個体ごとに結果が安定しないということが、研究の進行に影響していることは確かであるが、サル類を実験動物とするときには、このことは受け入れなければならない事項なのかもしれない。今後、個体ごとにモニタリングし、ホルモン投与スケジュールを個体ごとに操作するなどの戦略が考えられる。そのモニタリング法を確立することが新たな課題と考えられる。

E. 結論

良質な卵を採取することを目的として、GnRHa、FSH、hCG の組み合わせで卵巣を刺激した結果について解析した。ある程度の卵の数を確保し、その中に MII 卵が含まれることが明らかとなったが個体差が存在する。サル類を研究に用いる前提として個体差があることを受け入れ、個体ごとにモニタリングしながら卵巣を刺激する手法の開発が必要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sankai T. In vitro manipulation of nonhuman primates gametes for the application to medical science research. Primate Res. (in Japanese with English summary). 医科学への応用を目的としたサル類の発生工学的研究. 霊長類研究 24: 357-366, 2009.

2. 学会発表

なし

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、プロジェクト研究員

研究要旨

臓器移植においては臓器不足や免疫拒絶などが問題となっており、その解決策として、幹細胞から分化させた体細胞を移植する再生医療が注目されている。その幹細胞のシーズのひとつとして、ES細胞やiPS細胞があり、現在、多くの研究者が、これらの細胞を用いた再生医療の研究をおこなっている。しかしながら、これらの細胞を用いた再生医療の実用化には、多くの問題を抱えている。ES細胞を用いた再生医療の主要な問題は、受精卵を用いると云う倫理的な側面と自分の受精卵を用いることは事実上不可能なため、非自己の細胞を用いた移植系となり、移植後の免疫不寛容などがあげられる。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。臨床応用へのトランスレーショナルを念頭に、ヒトと同じ霊長類であるサルを用いた体細胞由来クローンES細胞の樹立をめざし、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本研究では試みた。体細胞候補として、採取・単離のし易い幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)に注目した。安定したMSCの供給を目的に、MSCにSV40を遺伝子導入し、不死化細胞15株を得ることが出来た。この細胞株の幾つかは、本来のMSCと同じ細胞表面マーカー及び多分化能を有しており、今後の研究に有益なものとなった。また、体細胞核移植の際に細胞周期をM期に制御が重要であるため、有糸分裂阻害剤であるノダゾール処理によるMSCの細胞周期の制御を試みたが、24時間の反応処理では効果がなかった。引き続き、細胞周期の制御の条件検討が必要であった。

A. 研究目的

樹立したクローンES細胞の有効性と安全性の検証については、特に霊長類モデルが適したものと考えられる。そこで、本研究はサ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目的とした。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。また、体細胞候補の検索として、より未熟な細胞ほど、リプログラミングし易いとの報告もあり、研究をおこなう上で未熟な細胞を安定的に使えることも重要である。本報告では、昨年と同様にクローンES細胞作製の際の体細胞候補として、体性幹細胞(成体幹細胞、組織幹細胞)であるMSCに着目し、細胞周期制御方法の検討をおこない、かつ、MSCの株化を試みた。

B. 研究方法

1. 体細胞細胞周期の制御方法の検討

サルクローン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、アフリカミドリザル成体の腸骨又は大腿骨から骨髓を採取し、骨髓細胞を単離した。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、付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2.0 mg/mL添加し、24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°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。

2. 体性幹細胞の株化

カニクイザル由来MSCの株化をおこなった。健全なカニクイザル成体の腸骨又は大腿骨骨髓由来MSCを分離したMSCに、pSV3-neoをエレクトロポレーションにより遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞は、ネオマイシン耐性によりスクリーニングした。遺伝子導入により不死化した細胞は、細胞表面分子であるCD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD105、CD166の発現をフローサイトメーターで継代ごとに解析した。また、細胞株の多分化能を調べるために、骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導を試みた。骨芽細胞の分化条件は、市販のosteogenic differentiation medium(ascorbate 2-phosphate、L-proline、Its+premix、dexamethasone、TGF- β 3を含む)で2-3週間分化培養した。脂肪細胞の分化条件は、市販のadipogenic differentiation medium(IBMx、insulin、dexamethasone、indomethacinを含む)で2週間分化培養した。それぞれ分化した細胞は、アルシアンブルーとサフラニンO染色、オイルレッド染色で確認した。

(倫理面の配慮)

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して、「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」及び霊長類医学研究センター「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、組換えDNA 実験安全委員会の承認を得ている。

C/D. 研究結果及び考察

アフリカミドリザルMSCにノダゾール存在下で24時間培養した後、細胞周期をPI染色で、フローサイトメーターにより解析した。ノダゾール処理により、G2/M期の割合が増える傾向が見られたが、著しくは増えなかった(図1)。カニクイザルMSCでも同様の結果を既に報告しており、この現象はカニクイザル特有のものではなかった。MSCの場合には、他の細胞に比べ、ノダゾール処理濃度や時間を更に長くする必要があることが示唆された。

カニクイザルMSCにSV40 遺伝子を導入することで、primary cells と同じ細胞表面マーカー:CD29+CD105+CD116+CD14-CD34-CD44-CD45-を有した不死化細胞を15株得た。更にこの細胞株の幾つかは、継代しても細胞表面マーカーに変化はなかった(図2)。また、幾つかの細胞株の多分化能の有無を調べるために、骨芽細胞及び脂肪細胞への分化を試みた。細胞組織染色により骨芽細胞及び脂肪細胞への分化を確認出来た(図3)。この細胞株を用いれば、未熟な細胞をより簡便に利用出来るため、今後の体細胞核の提供が容易になった。また、他の体性幹細胞の不死化への応用の可能性も期待される。

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。

体細胞核の供給源として、リプログラミングがし易いとされる体性幹細胞を着目し、その体性幹細胞の安定的供給を目的に、MSCの不死化を遺伝子導入で試みた結果、多分化能を有した細胞の株化に成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakurai F, Nakamura S-I, 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.
- 2) Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y., Masud S, Shibata H, Takeuchi K, Komur M, Iwanak T, 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 18. 381-389. 2009.
- 3) Masuda S, Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K, Ueda Y, Ozawa K, Hanazono Y. Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primate. Exp Hematology 37.

1250-1257. 2009.

4) Nochi T, Yuki Y, Katakai Y, Shibata H, Tokuhara D, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nakanishi U, Ono F, Mimuro H, Sasakawa C, Takaiwa F, Terao K, Kiyono H. A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J Immunology* 183. 6538-6544. 2009.

2. 学会発表

1) S. Masuda, N. Ageyama, H. Shibata, Y. Obara, T. Ikeda, K. Takeuchi, Y. Ueda, K. Ozawa, Y. Hanazono. Co-transplantation of MSCs improves the engraftment of HSCs in nonhuman primates. 第7回幹細胞シンポジウム、東京、2009.5.15-16.

2) S. Masuda, N. Ageyama, H. Shibata, Y. Obara, T. Ikeda, K. Takeuchi, Y. Ueda, K. Ozawa, Y. Hanazono. Improved engraftment of gene-modified HSC after co-transplantation with MSC in non-human primates. 第15回日本遺伝子治療学会総会、大阪、2009.7.9-11.

3) 柴田宏昭、寺尾恵治、保富康宏. 抗CD2抗体によるカニクイザルNK細胞の抗体依存性細胞性細胞傷害活性の抑制、第18回サル類疾病ワークショップ、神奈川、2009.7.4.

4) S. Masuda, N. Ageyama, H. Shibata, Y. Obara, T. Ikeda, K. Takeuchi, Y. Ueda, K. Ozawa, Y. Hanazono. Co-transplantation of MSCs improves the engraftment of HSCs in nonhuman primates. 第7回国際幹細胞研究学

会総会、スペイン・バルセロナ、2009.7.8-11.

5) 柴田宏昭. 霊長類ES細胞を用いた再生医療の有効性と安全性評価、第5回霊長類医科学フォーラム、茨城、2009.12.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

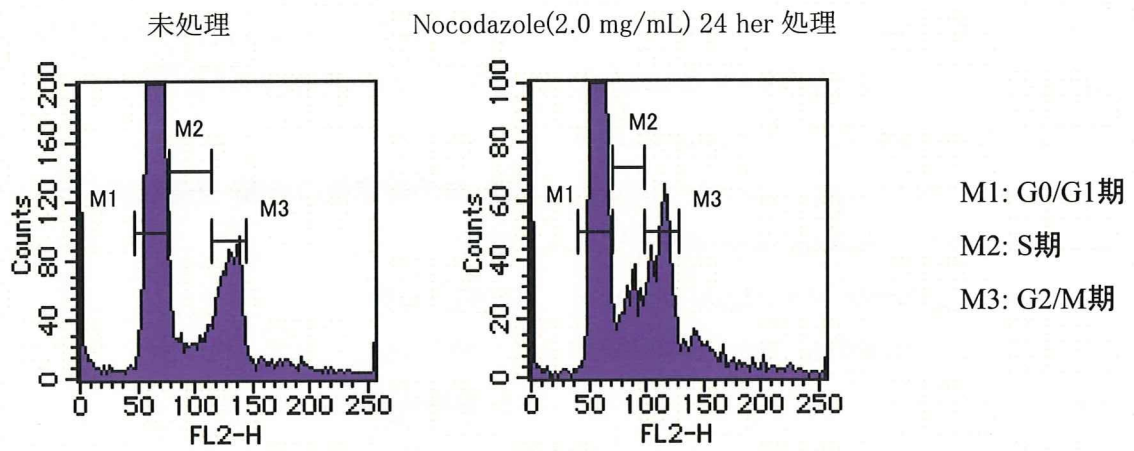


図1. ノコダゾール処理したアフリカドリザル プライマリーMSCの細胞周期

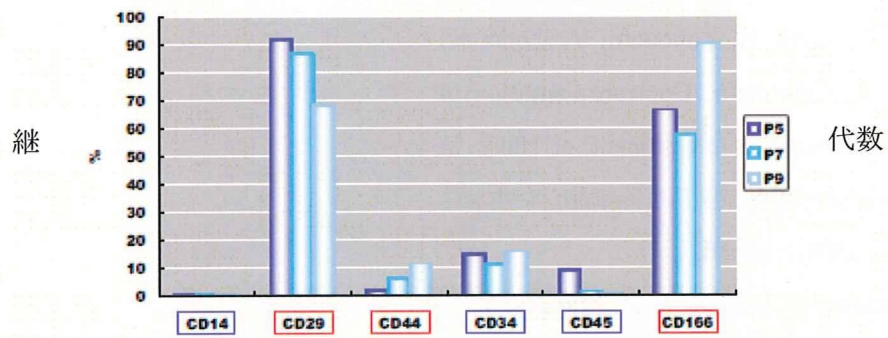


図2. カニクイザルMSC株の細胞表面抗原の推移

A 骨芽細胞分化

B 脂肪細胞分化

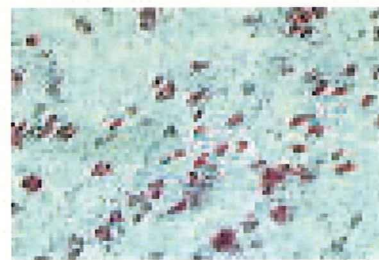
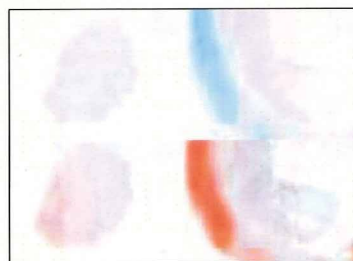


図3. カニクイザルMSC株からの分化誘導

A:アルシアンブルー染色(上段)、サフランインO染色(下段)

B:オイルレッド染色

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

研究要旨

核移植技術を利用して作出されるクローン胚に由来する ES 細胞から分化させた体細胞を移植することで、免疫拒絶を生じないものとして期待されている。この系を実験動物であるカニクイザルで構築することで、ヒトへ応用する前段階としての基礎研究が可能となる。カニクイザルにおけるクローン ES 細胞を効率良く作出するためには卵を必要とする。そこで、卵を採取する個体、あるいは卵の成熟時間を比較検討したところ、成熟した個体に由来する卵を核移植に利用した方が良好な成績が得られることが示唆された。さらに、核移植とは異なる免疫拒絶のない ES 細胞を樹立することを目的に、単為発生胚を利用したところ、胚盤胞へ発生し、その内部細胞塊を培養したところ、outgrowth が認められた。単為発生由来 ES 細胞の樹立が可能である知見が得られた。

A. 研究目的

ヒトにおいて、成体皮膚への遺伝子導入等の手段によって ES 細胞と同様な能力を持つとされる人工多能性幹 (iPS) 細胞が樹立された。この iPS 細胞は免疫的な拒絶を回避できるなどのため、ES 細胞よりもいくつか利点を持ち、再生医療等への応用が世界的に検討されている。サル類においても、iPS 細胞の樹立は報告され、再生医療モデルとしての利用が検討されている。

クローン技術を利用した ES 細胞の樹立には、遺伝子操作を必要としないものの、卵を必要とし、その成功率は低いことが知られている。しかし、この研究はクローン個体の作出にも繋がる重要なものである。つまり、体外で遺伝子操

作された体細胞を利用することで、マウス以外での動物種における遺伝子操作動物の作出に大いに貢献できると考えられる。この作製効率は非常に低いものであり、このクローン技術を改善する余地が十分に残されており、その解決が重要な課題となっている。

本年は卵を採取するカニクイザルの年齢として、未成熟および成熟に分けて、どちらがクローン胚作出に適したものであるかを検討した。また、単為発生に由来する ES 細胞の樹立についても検討を行った。

B. 研究方法

1) 核移植によるクローン胚樹立の検討

カニクイザルは3才以降に初潮を迎える。それ

を境に未成熟と成熟個体に分けて、それらに由来する卵をクローン研究に使用した。未成熟個体に対して、FSH 製剤を9日間連続で投与後、卵成熟の誘導のためにhCGを投与した。成熟個体に対しては、内在性のホルモン動態を抑制するために、月経確認直後GnRHaを投与し、その2〜3週間から、未成熟個体と同様にFSHおよびhCGを投与した。未成熟および成熟個体へのhCG投与からおおよそ28時間あるいは36時間に卵胞を吸引し、卵を回収した。核移植法としては、卵を除核した後、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へ注入することで実施した。その後、活性化を誘起するためにCa Ionophore + Dimethylaminopurine (DMAP)あるいは電気刺激 + DMAP のどちらかの処理を行った。クローン胚の体外発生培養には、10%ウシ胎児血清加CMRL-1066を使用した。

2) 単為発生卵由来ES細胞の樹立検討

採取された卵の卵丘細胞を除去後、Ionomycin (IM) + DMAP で活性化を誘起し、1)と同様な体外培養を行った。胚盤胞へ発生したものは、Immunosurgery により栄養外胚葉層を除去して内部細胞塊を摘出し、マウス胎児線維芽細胞(MEF)の単層上に静置、培養した。

(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) 核移植によるクローン胚樹立の検討

hCG 投与後 38 時間に回収した卵を使用した核移植においては、成熟および未成熟個体で、それぞれ成熟卵 259 個および 109 個の内、除核できた卵は 186 個 (72%) および 57 個 (52%) であった。これらに卵丘細胞核を導入して活性化し、培養した。その結果、144 時間後の発生状況は、1 細胞期胚、2 細胞期胚、4-8 細胞期胚、16 細胞期胚ならびに桑実期胚に、それぞれ 84 個 (45%) および 25 個 (44%)、26 個 (14%) および 7 個 (12%)、65 個 (35%) および 25 個 (44%)、7 個 (4%) および 0 個 (0%)、ならびに 4 個 (2%) および 0 個 (0%) であり、胚盤胞への発生は認められなかった。

一方、hCG 投与後 28 時間に回収した卵を使用した核移植においては、成熟および未成熟個体で、それぞれ成熟卵 161 個および 15 個の内、除核できた卵は 94 個 (58%) および 10 個 (67%) であった。これらに卵丘細胞核を導入して活性化し、培養した。その結果、144 時間後の発生状況は、1 細胞期胚、2 細胞期胚、4-8 細胞期胚、16 細胞期胚ならびに桑実期胚には、それぞれ 35 個 (37%) および 3 個 (30%)、1 個 (1%) および 2 個 (20%)、46 個 (49%) および 5 個 (50%)、8 個 (9%) および 0 個 (0%)、ならびに 3 個 (3%) および 0 個 (0%) であり、胚盤胞への発生は成熟個体由来において 1 個 (1%) が確認された。

2) 単為発生卵由来ES細胞の樹立検討

成熟卵 24 個に対して単為発生誘起処理を行ったところ、正常な前核形成を 21 個で確認し