

Characterization of a novel embryonic stem cell line from an ICSI-derived blastocyst in the African green monkey

Nobuhiro Shimosawa¹, Shinichiro Nakamura², Ichiro Takahashi³, Masanori Hatori^{1,4} and Tadashi Sankai¹

¹Tsukuba Primate Research Center (TPRC), National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), 1-1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan, ²Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science, Seta Tsukinowa, Ohtsu, Shiga 520-2192, Japan, ³Department of Biomedical Resources, NIBIO, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan and ⁴Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan

Correspondence should be addressed to N Shimosawa; Email: shimo@nibio.go.jp

Abstract

Several cell types from the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*), such as red blood cells, primary culture cells from kidney, and the Vero cell line, are valuable sources for biomedical research and testing. Embryonic stem (ES) cells that are established from blastocysts have pluripotency to differentiate into these and other types of cells. We examined an *in vitro* culture system of zygotes produced by ICSI in African green monkeys and attempted to establish ES cells. Culturing with and without a mouse embryonic fibroblast (MEF) cell monolayer resulted in the development of ICSI-derived zygotes to the blastocyst stage, while culturing with a buffalo rat liver cell monolayer yielded no development (3/14, 21.4% and 6/31, 19.4% vs 0/23, 0% respectively; $P < 0.05$). One of the nine blastocysts, which had been one of the zygotes co-cultured with MEF cells, formed flat colonies consisting of cells with large nuclei, similar to other primate ES cell lines. The African green monkey ES (AgMES) cells expressed pluripotency markers, formed teratomas consisting of three embryonic germ layer tissues, and had a normal chromosome number. Furthermore, expression of the germ cell markers *CD9* and *DPPA3* (*STELLA*) was detected in the embryoid bodies, suggesting that AgMES cells might have the potential ability to differentiate into germ cells. The results suggested that MEF cells greatly affected the quality of the inner cell mass of the blastocysts. In addition, AgMES cells would be a precious resource for biomedical research such as other primate ES cell lines.

Reproduction (2010) 139 565–573

Introduction

In vitro culturing is an important technique for effectively producing individuals from embryos that were manipulated *in vitro*. However, the *in vitro* culturing for the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) embryos has not been examined. In rhesus monkey embryos, co-culture with a buffalo rat liver (BRL) cell monolayer in CMRL-1066 has been utilized (Zhang *et al.* 1994, Nusser *et al.* 2001). On the other hand, mouse embryonic fibroblast (MEF) cells have been widely utilized for the establishment of embryonic stem (ES) cells, showing that MEF cells affect establishment of the ES cells from the inner cell mass (ICM), where develop to an individual in the future, of blastocyst. We therefore considered that MEF might also enhance the growth of African green monkey embryos cultured *in vitro*.

Primate ES cell lines were established in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the first time in 1995 (Thomson *et al.* 1995) and were subsequently

established in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in 1996 (Thomson *et al.* 1996), in humans in 1998 (Thomson *et al.* 1998), and in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) in 2001 (Suemori *et al.* 2001), aiming at utilization in biomedical research. In particular, application to regenerative medicine is expected. For this purpose, methods to induce ES cells to develop into specific differentiated cells have been examined, based on the pluripotency of ES cells, as well as their self-renewal and stable karyotype characteristics, which are important properties for not only regenerative or transplantation medicines but also research or inspection at the cytological level.

The red blood cells and primary culture cells from kidney of the African green monkey have been used for the inspection of measles infection and human polio vaccine production respectively. In addition, the Vero cell line established from the kidney of the monkey has been used to test viral infections and to introduce foreign genes. Furthermore, spontaneous systemic amyloidosis was

Table 1 Attempt to establish embryonic stem (ES) cell lines in African green monkeys.

	Culture of zygotes	Number of blastocysts	Treatment of blastocysts ^a	Number of outgrowths	Passage methods	Colony appearance	Passage methods	Number of ES cell lines established
I	With MEF monolayer	1	Removal of ZP and TE	1	Enzyme and needles	1	Enzyme and needles	1
II		2	Removal of ZP	2	Enzyme and needles	1	Enzyme and pipetting	0
III	Without cell monolayer	3	Removal of ZP and TE	1	Enzyme and pipetting	1	Enzyme and pipetting	0
IV		3	Removal of ZP	0	–	–	–	–

^aZP, zona pellucida; TE, trophoctoderm.

recently reported in this monkey (Nakamura *et al.* 2008). The African green monkey and the differentiated cells derived from African green monkey ES (AgMES) cells may help to elucidate the mechanism of amyloidosis in humans and contribute to the treatment. Those unique characteristics show that the cells of the monkey are very valuable for biomedical research and testing.

ES cells may be useful as a source of cells with the same genetic background, even if we do not collect them from living individuals. In short, we could reduce the number of monkey needed to supply cells. Here, we report an *in vitro* culture system of ICSI-derived zygotes

and the establishment of a novel ES cell line in the African green monkey. We believe that AgMES cells would be a precious resource for biomedical research in addition to other primate ES cell lines.

Results

In vitro culture of ICSI-derived embryos

Blastocyst stage embryos were prepared from zygotes produced by ICSI as described in our previous report (Shimozawa *et al.* 2007). A total of 68 zygotes with two pronuclei and a second polar body were cultured with or

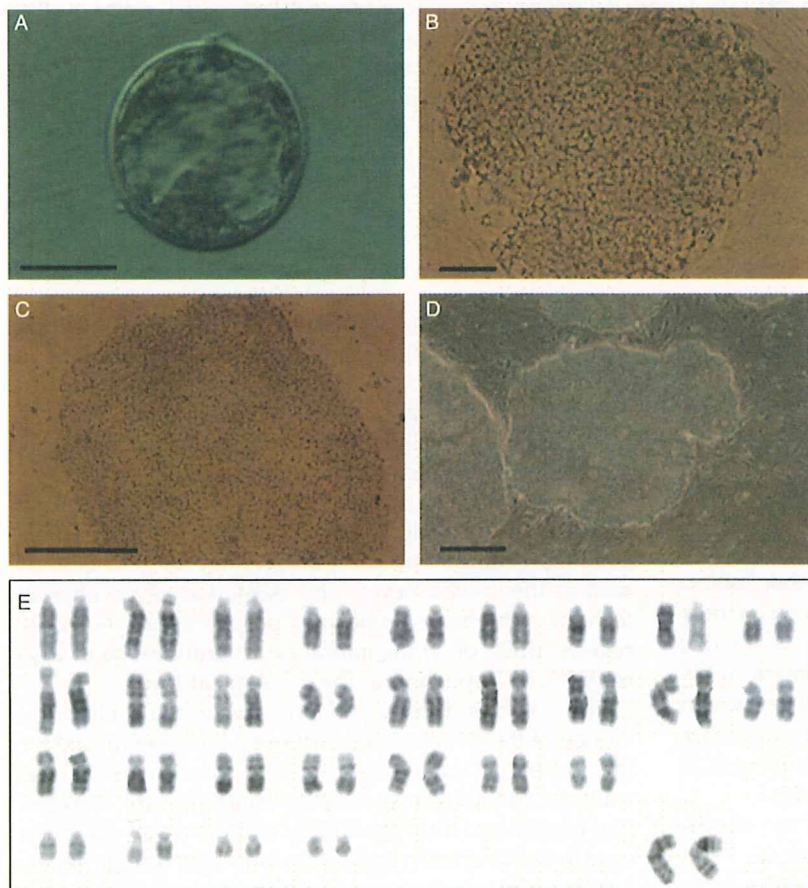


Figure 1 Establishment of the AgMES cell line. Parts of the inner cell mass isolated from an ICSI-derived blastocyst (A) were transferred onto a mitomycin C-treated MEF cell monolayer, which then formed an outgrowth (B). At the first passage dividing the outgrowth into small clusters with collagenase and needles, a new colony appeared (C) and was passaged further. The colonies formed multiple new colonies (D). Hereafter, these colonies were regularly passaged with collagenase and pipetting. Karyotyping analysis revealed that cells examined at passage 19 had a normal chromosome number of 60 and sex chromosomes of XX (E). Bar represents 100 μ m (A and B) and 500 μ m (C and D).

without BRL cell monolayer or MEF cell monolayer, and then nine of those developed to the blastocyst stage. Culturing with and without the MEF cell monolayer yielded development to the blastocyst stage, while culturing with the BRL cell monolayer yielded no development (3/14, 21.4% and 6/31, 19.4% vs 0/23, 0% respectively; $P < 0.05$).

Establishment of ES cells

Nine blastocysts were used to establish ES cells (Table 1). Parts of the ICM isolated by removing the trophectoderm (TE) and the zona pellucida (ZP) with needles (one blastocyst cultured with MEF, hereafter designated I, Fig. 1A; and three without MEF, designated III) or the blastocysts in which the ZP was dissolved with an enzyme (two blastocysts with MEF, designated II; and three without MEF, designated IV) were transferred to ES cell culture medium (ESM) with mitomycin C-treated STO cell or MEF cell monolayer. Of nine blastocysts, four formed outgrowths (one of I blastocysts: Fig. 1B, two of II, and one of III). At the first passage using collagenase and pipetting or dividing into small clusters with needles, three colonies from three outgrowths (one each of I: Fig. 1C, III and IV) appeared and passed further. The colonies from I passed with collagenase

and needles newly formed multiple colonies (Fig. 1D), but the other colonies passed with collagenase and pipetting disappeared. Thereafter, these colonies from I were regularly passed with collagenase and pipetting, and showed flat-formed colony morphology consisting of cells with large nuclei, similar to other primate ES cell lines.

Characterization of undifferentiated ES cells

We examined karyotype and the expression of undifferentiated markers in the AgMES cell line established. Karyotyping analysis revealed that 88% (88/100) of cells examined at passage 19 had a normal chromosome number of 60 and sex chromosomes of XX (Fig. 1E). Immunofluorescence revealed that this cell line strongly expressed POU5F1 (Oct-3), TRA-1-60, TRA-1-81, and NANOG, but not SSEA1 (Fig. 2A–E), and showed alkaline phosphatase activity (Fig. 2F). The expression of SSEA3 and SSEA4 was vaguely observed. Furthermore, gene expression analysis of the pluripotency markers by RT-PCR demonstrated that *POU5F1* (*OCT3/4*), *NANOG*, *SOX2*, and *REX1* were present in AgMES cells, but *FOXD3* was not, although three primer sets for *FOXD3* were used (Fig. 2G). On the other hand, in CMK6 (AGC Techno Glass Co., Ltd, Chiba, Japan),

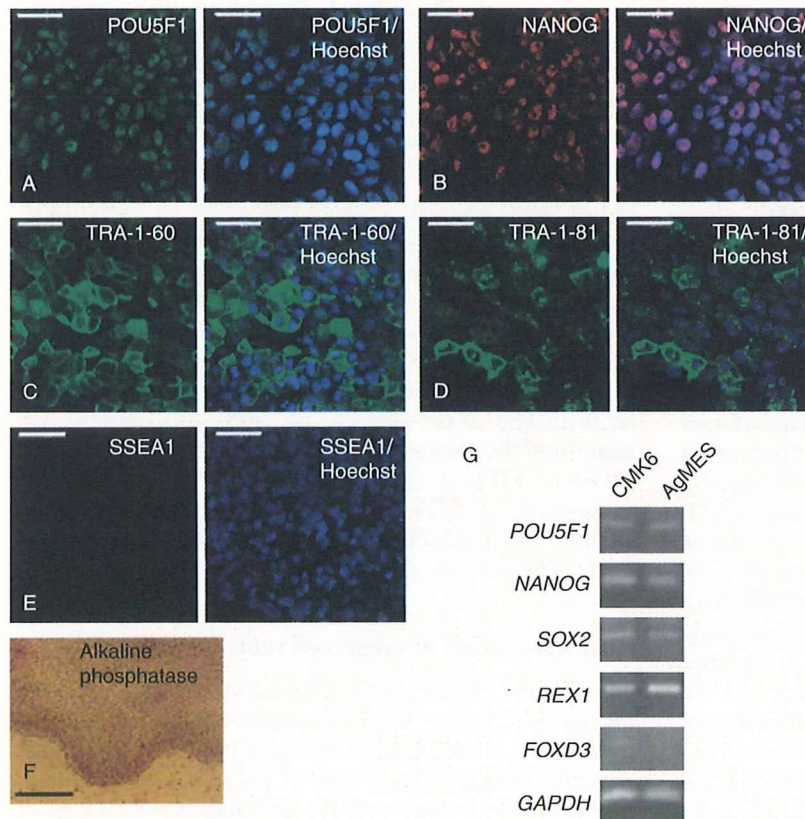


Figure 2 Characterization of undifferentiated AgMES cells. AgMES cells were stained with antibodies against pluripotency markers and alkaline phosphatase (A–F). POU5F1 (A), NANOG (B), TRA-1-60 (C), TRA-1-81 (D), SSEA1 (E), and alkaline phosphatase (F). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue) (A–E). A double staining with POU5F1 (A) and NANOG (B) was conducted in the same specimen. Bar represents 50 μ m (A–E) and 200 μ m (F). Gene expression analysis of pluripotency markers by RT-PCR in AgMES cells was conducted (G). The results were compared with those for CMK6, a cynomolgus monkey ES cell line established by Suemori *et al.* (2001), as a control.

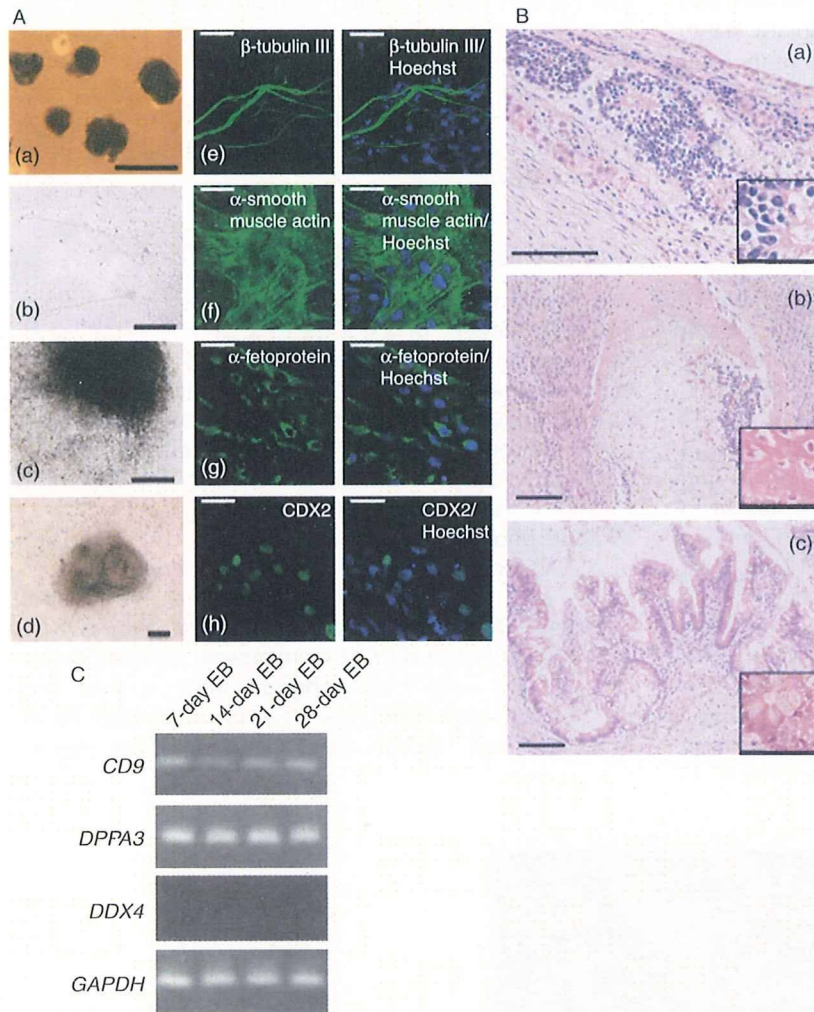


Figure 3 Characterization of derivatives from AgMES cells. (A) EBs (a) at 2 weeks after unattached culture spontaneously differentiated to neuron-like cells (b), pigment cells (c), and myocardial-like cells with beating clusters (d). In the derivatives, the expression of β -tubulin III (e, ectoderm), α -smooth muscle actin (f, mesoderm), α -fetoprotein (g, endoderm), and CDX2 (h, trophoblast) was confirmed. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue) (e–h). Bar represents 250 μ m (a–d) and 50 μ m (e–h). (B) Histological analysis of teratomas formed from AgMES cells. Characteristic morphologies; neural (ectoderm, a), osseous (mesoderm, b), and gut tissues (endoderm, c) were confirmed. Each figure includes insets for showing high magnification of typical cells, such as neuroblasts (a), osteoblasts with osseous matrix (b), and goblet cells (c). Bars represent 100 μ m, 40 μ m (inset a), and 20 μ m (inset b and c). (C) Gene expression analysis of germ cell markers by RT-PCR in EBs at days 7, 14, 21, and 28 of culture.

the cynomolgus monkey ES cell line established by Suemori *et al.* (2001) and employed here as a control, the expression of all markers examined was detected (Fig. 2G).

Pluripotency analysis

To examine the pluripotency of AgMES cells, we induced the development of embryoid bodies (EBs) and teratomas *in vitro* and *in vivo* respectively. EBs were developed by the floating culture of ES cell colonies recovered with collagenase treatment (Fig. 3A; a). After 2 weeks of culturing, most EBs formed solid type clusters. EBs were transferred to tissue culture dishes and then attached. Attached EBs showed outgrowths and spontaneously formed the various differentiated cells such as neuron-like cells, pigment cells, and beating myocardial-like cells (Fig. 3A; b–d). These spontaneous differentiated cells from EBs showed the expression of β -tubulin III (ectoderm), α -smooth muscle actin (mesoderm), α -fetoprotein (endoderm), and CDX2 (TE; Fig. 3A; e–h).

Histological analysis revealed that the ES cells transferred into two immunodeficient mice formed teratomas consisting of neural and dermal tissues as ectoderm (Fig. 3B-a; neural tissue), smooth muscle, osseous, cartilage, fatty, fibrous, and vascular tissues as mesoderm (Fig. 3B-c; osseous tissue), and gut tissue as endoderm tissue (Fig. 3B-e). The teratoma formation rate was 100% (2/2). In EBs at days 7, 14, 21, and 28 of culture, we examined the expression of the germ cell markers *CD9*, *DPPA3* (*STELLA*), and *DDX4* (*VASA*) by RT-PCR. Expression of *CD9* and *DPPA3* was detected in all samples, while *DDX4* was not, although two primer sets for *DDX4* were used (Fig. 3C).

Characterization of single-cell subcultured ES cells

To further characterize the AgMES cell line, we examined whether this cell line could be subcultured by dividing it into single cells with trypsin. The average replating efficiency and rate of colonies with undifferentiated morphology until 52 passages were 20.2 ± 5.7

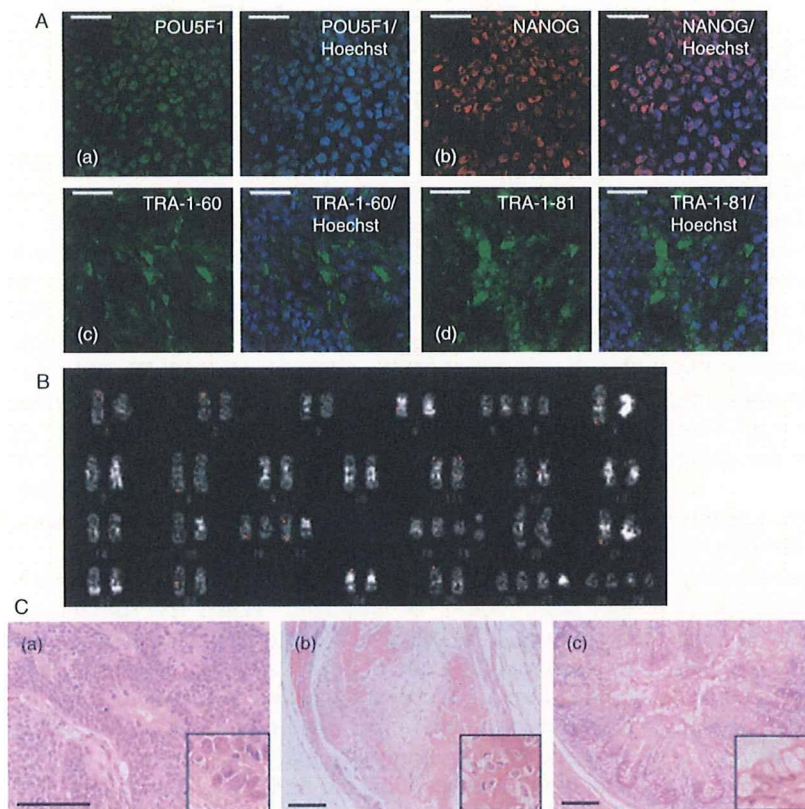


Figure 4 Characterization of single-cell subcultured AgMES cells. (A) The expression of the pluripotency markers, POU5F1 (a), NANOG (b), TRA-1-60 (c), and TRA-1-81 (d), was confirmed. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue) (a–d). A double staining with POU5F1 (a) and NANOG (b) was conducted in the same specimen. Bar represents 50 μ m. (B) Karyotyping of single-cell subcultured AgMES cells. At passage 34, 80% (40/50) of the single-cell subcultured AgMES cells had a normal karyotype (60 chromosomes, XX). (C) Histological analysis of teratomas formed from single-cell subcultured AgMES cells. The teratomas showed neural (ectoderm, a), osseous (mesoderm, b), and gut (endoderm, c) tissues. Each figure includes insets for showing high magnification of typical cells, such as neuroblasts (a), osteoblasts with osseous matrix (b), and goblet cells (c). Bars represent 100 μ m, 40 μ m (inset a), and 20 μ m (inset b and c).

and $15.4 \pm 5.8\%$ respectively and $74.5 \pm 13.8\%$ of the subcultured single cells formed the undifferentiated colonies. Immunofluorescence revealed that this cell line strongly expressed POU5F1, TRA-1-60, TRA-1-81, and NANOG but not SSEA1 (Fig. 4A). Karyotyping analysis revealed that 80% (40/50) of cells examined at passage 34 after single-cell subculture had a normal chromosome number of 60 (Fig. 4B). Histological analysis revealed that teratomas by single-cell subcultured ES cells in two immunodeficient mice consisted of three embryonic germ layer tissues, e.g. neural and dermal tissues as ectoderm (Fig. 4C-a; neural tissue), musculoskeletal, fatty, fibrous, and vascular tissues as mesoderm (Fig. 4C-b; osseous tissue), and gut tissue as endoderm tissue (Fig. 4C-c). The teratoma formation rate was 100% (2/2).

Discussion

We examined *in vitro* culturing of ICSI-derived zygotes and the establishment of an ES cell line, rather than examining developmental potential to term, in the African green monkey. As a result, we succeeded in developing the zygotes to the blastocyst stage and were able to establish a novel primate ES cell line from nine of the blastocysts. The cells derived from African green monkeys are utilized in many types of research and tests.

Therefore, it is expected that the AgMES cell line described in this report could contribute to these applications as a novel biological resource.

Reproductive technologies in the African green monkey have hardly been reported. Development to the blastocyst stage was only reported by *in vitro* culture in a simple medium following production of the fertilized eggs with IVF in 1997 (Sankai *et al.* 1997). We reported follicle growth stimulus methods and the fertilization ability by ICSI in 2007 (Shimozawa *et al.* 2007). Herein, we examined an *in vitro* culture system using zygotes produced by ICSI. *In vitro* culturing with and without a MEF cell monolayer supported development to the blastocyst stage, while culturing with a BRL cell monolayer did not. Although a BRL cell monolayer supported development to the blastocyst stage of rhesus monkey embryos (Zhang *et al.* 1994, Nusser *et al.* 2001), the reason for this negative effect by BRL cells in African green monkey embryos in the present study is uncertain. On the other hand, the ES cell line was established from the blastocysts that originated from the culture system with the MEF cell monolayer. The number of cells constituting the blastocysts or their ICMs could not be examined because we gave priority to the establishment of the ES cell line. Consequently, it was impossible to compare effects between the culture systems in detail. However, one of the reasons for the successful

establishment of an ES cell line may have been that MEF cells greatly affected the quality of the ICM.

The novel established AgMES cell line showed characteristics similar to those of other primate ES cell lines (Thomson *et al.* 1995, 1996, 1998, Suemori *et al.* 2001). The ratio of nuclei to the cytoplasm in an ES cell was very high, and the colony morphology was flat. Expression of the primate ES cell-specific markers was confirmed by immunofluorescence staining and RT-PCR analysis, and we confirmed that ES cells spontaneously differentiated into three embryonic germ cells via the EBs under *in vitro* culturing and formed teratomas that consisted of three embryonic germ cells by being transplanted to SCID mice. In addition, 88% of the examined cells had maintained the normal chromosome number of 60. As described above, the cell line established herein demonstrated that it is an exact match to the ES cell line.

Immunofluorescence revealed that AgMES vaguely expressed SSEA3 and SSEA4. This may be due to antibodies not suitable for African green monkey epitopes. However, it is possible that expressions of SSEA3 and SSEA4 are not indispensable for ES cells (Brimble *et al.* 2007). The cynomolgus monkey ES cells are used for basic experiments aimed at application in regenerative medicine (Sánchez-Pernaute *et al.* 2005, Takagi *et al.* 2005, Shibata *et al.* 2006, Osakada *et al.* 2008). Reports of the differentiation from cynomolgus monkey ES cells to various types of cell suggest that the expression of SSEA3 may not be necessary.

The gene expression analysis also showed that AgMES cells were positive for *POU5F1*, *NANOG*, *SOX2*, and *REX1*. The expression of *FOXD3* was not detected, despite the use of three primer sets for *FOXD3*. However, in EB, the expression of *FOXD3* was detected (data not shown). It has been reported that *FOXD3* has the antagonistic effect on *POU5F1* (Guo *et al.* 2002) and was not expressed in undifferentiated human and common marmoset ES cells (Ginis *et al.* 2004, Mandal *et al.* 2006, Müller *et al.* 2009). We demonstrated that *FOXD3* of African green monkey was not expressed in undifferentiated cells but was detected during differentiation the same as human and common marmoset. In addition, a difference in the gene expression of the pluripotency marker *REX1* in ES cells has been observed among species. *REX1* expression has been detected in human ES cells (Ginis *et al.* 2004, Mandal *et al.* 2006) but not in rhesus monkey ES cells (Mitalipov *et al.* 2006). In the present study, both of African green and cynomolgus monkey ES cells expressed *REX1*, suggesting that the characterization of different ES cell lines within the same species may differ.

Several researchers have examined the differentiation of primate ES cells into germ cells (Clark *et al.* 2004, Chen *et al.* 2007, Sparman *et al.* 2009). When we examined the expression of three germ cell markers, *CD9*, *DPPA3*, and *DDX4*, in EBs derived from AgMES

cells by RT-PCR, the expression of *CD9* and *DPPA3* was detected. This suggested that AgMES cells might have the potential ability to differentiate into germ cells, although further study is necessary. Differentiation into germ cells may be enabled in the primates by doing the comparative study using primate and mouse ES cell lines. Additionally, it was reported that epiblast stem cells (EpiSCs) established in mice did not possess the ability to differentiate into germ cells *in vivo* (Brons *et al.* 2007, Tesar *et al.* 2007). Primate ES cells may also lack the potential to differentiate into germ cells because EpiSCs show characteristics similar to primate ES cells such as culture condition and colony morphology. However, it is unclear whether primate ES cells can differentiate into germ cells. It will thus be very important to study the differentiation of nonhuman primate ES cells into germ cells both *in vivo* and *in vitro*. We consider that the AgMES cells could become a highly valuable research tool as well as rhesus, cynomolgus, and common marmoset monkey ES cell lines.

Next, we examined whether single AgMES cells can continuously be passaged. When the subcultures of single ES cells dissolved with trypsin were repeated 52 times, a replating rate of 20.2% and an undifferentiation colony formation rate of 15.4% were obtained. These ES cells were positive for the primate ES cell-specific markers, formed teratomas, and had normal karyotype, which demonstrated that the AgMES cells maintained by the single-cell subculture method had the same characteristics of undifferentiation and pluripotency. Human ES cell lines were difficult to continue to subculture by single cells, and because the undifferentiation colony formation rate was ~1%. Improvements of culture environment by using some feeder cells or chemical compounds have been examined (Amit *et al.* 2000, Hasegawa *et al.* 2006, Ellerström *et al.* 2007, Watanabe *et al.* 2007). However, single AgMES cells showed 15% of the undifferentiation colony formation rate in the same culture environment as the subculture by small clusters. The AgMES cell line has the potential for easy application in various examinations under *in vitro* culture and to contribute to the research into the proliferation mechanisms underlying colony formation from a single cell in the primate ES cells.

The primary culture cells or the Vero cells that originate from the kidney of the African green monkey have been used for applications such as vaccine developments and virus inspections. In addition, the red blood cells of the African green monkey are used for the measles virus test. We think that studies of the erythropoiesis or hematopoiesis differentiation in cynomolgus ES cells might be able to contribute to differentiation of the red blood cells from AgMES (Hiroyama *et al.* 2006, Umeda *et al.* 2006). The characteristics and chromosomes of kidney-derived cells may have mutated naturally by repeating the subculture for a long time. Inducing differentiation of

pluripotent ES cells, whose chromosomes are relatively steady compared with the various cell lines, may facilitate their becoming a source of cells with uniform properties. This shows the possibility that the red blood cells and the cells of kidney differentiated from the AgMES cells may become a substitute for cells from living monkeys. Producing the various cells from the ES cells would alleviate the need to collect the cells from living animals.

Materials and Methods

Animals

The mature African green monkeys (*C. aethiops*) used in this study were bred and maintained in an air-conditioned room with controlled illumination (12 h light:12 h darkness), temperature (25 ± 2 °C), humidity ($60 \pm 5\%$), and ventilation (10 cycles/h), and were given 70 g of commercial food (Type AS; Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo, Japan) and 100 g of apples daily, and unlimited access to tap water at the Tsukuba Primate Research Center (Tsuchida *et al.* 2008). Every morning, the health condition (e.g. viability, appetite, fur-coat appearance) and menstruation status of each female monkey were monitored. For ovarian stimulation, eight female monkeys were used. Maintenance of animals was conducted according to the guidelines set by the National Institutes of Biomedical Innovation (NIBIO) for the care, use, and biohazard countermeasures of laboratory animals. This study was approved by the Animal Welfare and Animal Care Committee of NIBIO.

Ovarian stimulation and oocyte collection

For ovarian stimulation, the administration of human FSH (hFSH: Fertinorm, Merck Serono), equine chorionic gonadotropin (eCG: Serotropin, ASKA Pharmaceutical, Tokyo, Japan), or human menopausal gonadotropin (hMG) followed by human chorionic gonadotropin (hCG: Gonatropin, ASKA Pharmaceutical) was conducted. Protocols of hFSH and eCG administration, and oocyte collection were reported previously (Shimozawa *et al.* 2007). Briefly, on the first day of menstruation, the female monkeys were administered leuprolin acetate s.c. as a GnRH agonist (GnRH_a; Leuplin, Takeda Pharmaceutical, Osaka, Japan). At 2–3 weeks after that, the follicular growth of these monkeys was stimulated by 25 IU/kg per day hFSH administered for 9 days, 200 IU/head per day eCG administered i.m. for 6 days, or 37.5 IU/head per day hMG administered i.m. daily for 6 days. Thirty-six hours after the final hFSH, eCG, or hMG administration, 1200 IU/head hCG was administered. At 36–38 h after hCG administration, females were anesthetized by 10 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar, Bayer Yakuhin) and 1 mg/kg xylazine hydrochloride (Seractarl, Bayer Yakuhin) administration. Ovaries were exposed through an abdominal incision, and the contents of the follicles were aspirated through a 25-gauge needle. The collected follicular contents were immediately placed in TYH medium modified by adding Heparin (Hepes-TYH) containing 2.5 IU/ml heparin (Novo Nordisk Pharma, Tokyo, Japan). The oocytes were freed from cumulus cells by

pipetting after treatment with 0.1% hyaluronidase (Sigma) in Hepes-TYH medium. Collected oocytes were then transferred to CMRL-1066 (Invitrogen) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA), Gluta-MAX ($\times 100$, Invitrogen), and penicillin–streptomycin solution ($\times 100$, Sigma), hereafter simply called CMRL.

ICSI and embryo culture

Sperm collection and ICSI were performed as described previously (Shimozawa *et al.* 2007). Briefly, fresh semen was collected in TYH medium by rectal probe electrostimulation. Semen suspension was layered onto 90% Percoll (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England) diluted with 9% NaCl solution and then centrifuged at 800 *g* for 10 min. The precipitate containing sperm was suspended in CZB modified by adding Heparin (Heparin-CZB). Sperm suspended in Heparin-CZB with 10% polyvinylpyrrolidone (Sigma) was used for ICSI. Mature oocytes with a polar body were subjected to ICSI using a micromanipulation system equipped with a piezo drive unit (Primetech, Ibaraki, Japan) under an inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan). An immobilized spermatozoon drawn into the injection pipette was injected into the mature (MII) oocyte by using a few piezo pulses, and then injected oocytes were transferred into CMRL microdroplets. The fertilized embryos were judged to be normal based on the formation of two pronuclei and the release of a second polar body 15–16 h after ICSI. Embryos were cultured with or without a MEF cell monolayer or a BRL cell monolayer in 500 μ l CMRL using a four-well multidish (Nunc, Rochester, Denmark). Half of the CMRL was changed every other day. Culturing was performed under CMRL covered with mineral oil at 37.5 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% air.

Establishment of ES cells

The TE and ZP of blastocysts were removed mechanically with 27-G needles or dissolved in the ZP with 0.5% actinase. Treated blastocysts were cultured with mitomycin C-treated STO cell or MEF cell monolayer on gelatin-coated dishes in ESM consisting of DMEM/F12 (1:1) supplemented with 20% knockout serum replacement (KSR, Invitrogen), 1% GlutaMax (Invitrogen), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma), 1% nonessential amino acids (Invitrogen), and 10 ng/ml human recombinant leukemia inhibitory factor (hLIF, Millipore, Billerica, MA, USA). In one case, ESM in which FBS replaced KSR and that was supplemented with 4 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor (hbFGF, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) was used. The extended colony was treated with 0.1% collagenase (Wako) in DMEM (Sigma) and divided mechanically into small clusters with pipetting or with 27-G needles, then passaged onto a new feeder layer. The resulting stem cell colony was expanded using 0.1% collagenase and passaged with pipetting or 27-G needles into a 6-cm dish (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA). ES cell colonies were divided into small clusters using 0.1% collagenase and pipetting.

Table 2 Primer sequences used for RT-PCR analyses.

Gene	Forward	Reverse	bp
<i>POU5F1</i>	TTGGAGACCTCTCAGCCTGA	ACACATGTTCTTGAAGCTAA	326
<i>SOX2</i>	CCCCCGCGGGCAAC GCA	TCGGCGCGGGGAGATACAT	448
<i>NANOG</i>	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC	GACTGTCCAGGCCTGATTGTT	217
<i>REX1</i>	CAGATCGAAAACAGCTCGCAGAAT	CGTACGCAAATTGAAGTCCAGG	305
<i>FOXD3</i>	TACATCGCGCTCATCACCATG	GTTGTCCAACATGTCCTCGGA	246
<i>CD9</i>	AAATAGCTGCGGCCATCTGGGGATA	G CCCCAGCCAAACCACAGCA	167
<i>DPPA3</i>	GTTACTCGGCAGAGTTCGTA	TGAAGTGGCTTGGTTCGTA	167
<i>DDX4</i>	AGGATGAGGACTCCATCTTTGCACATTAT	CAGACCCTGTTTGAGCACAAGCCA	252
<i>GAPDH</i>	TGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAAGAGTGGGTGTCGCTGT	152

For the investigation of undifferentiated colony formation from a single ES cell, ES cell colonies recovered after collagenase treatment were dispersed to single cells with 0.25% trypsin/0.1 m EDTA (Sigma), and a thousand single ES cells were cultured with MEF cell monolayer in a 3.5-cm dish (BD Falcon).

Characterization

Alkaline phosphatase was detected using Alkaline Phosphatase Chromogen Kit (Biomedica, Plovdiv, Bulgaria). For immunofluorescence, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Following permeabilization with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min and blocking with 5% skim milk in PBS for 30 min, cells were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C and visualized by IgG or IgM conjugated with Alexa 488 (A11001, A21042, and A21212) or 555 (A21428) (1:1000, Invitrogen). Primary antibodies used were as follows: *POU5F1* (1:50, 611202; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), *NANOG* (1:50, RCAB0003P, ReprCELL Inc., Tokyo, Japan), *SSEA1* (MAB4301), *SSEA3* (MAB4303), *SSEA4* (MAB4304), *TRA-1-60* (MAB4360), *TRA-1-81* (MAB4381) (1:80, Millipore), *Nestin* (1:50, MAB1259), α -smooth muscle actin (1:100, MAB1420, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), β -tubulin III (1:50, T 8660), α -fetoprotein (1:500, A 8452, Sigma), and *CDX2* (1:100, GTX15258, GeneTex, San Antonio, TX, USA). The nuclei were stained with 10 μ g/ml Hoechst 33342 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) in PBS.

For pluripotency analysis, EBs and teratomas were prepared from ES cells. EBs were grown by culturing unattached ES cell colonies in ESM without hLIF and hbFGF. After 2 weeks, EBs were transferred to 6-cm dishes in DMEM containing 10% FBS for attachment culture. Spontaneous differentiated cells from EB were observed and analyzed by immunofluorescence. Teratoma formation was as follows: six 6-cm dishes of small cluster subcultured and single-cell subcultured ES cells suspended in ESM without hLIF and hbFGF were injected into the hind leg muscle of two immunodeficient mice (NOD/SCID, Charles River Japan, Kanagawa, Japan) respectively. Tumors were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, then embedded in paraffin, and sectioned for histological analysis by hematoxylin and eosin staining. No tumors formed in two NOD/SCID mice that were injected with ESM without hLIF and hbFGF as a control.

Karyotype analyses were performed at the International Council for Laboratory Animal Science Monitoring Center (Kanagawa, Japan) or the Chromosome Science Labo Inc (Hokkaido, Japan).

Gene expression analysis

Undifferentiated AgMES cells and EBs at days 7, 14, 21, and 28 of culture were treated with RNA^{later} (Ambion, Austin, TX, USA). RNA was isolated using an RNAqueous Kit (Ambion) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA was primed via random hexamers, and RT-PCR was performed with the primer sets showing in Table 2. The expected sizes of the PCR products were inferred from rhesus monkey and human sequences.

Statistical analysis

Data were analyzed using Fisher's exact probability test. $P < 0.05$ was considered significant.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the Corporation for Production and Research of Laboratory Primates for their kind cooperation in the collection of samples.

References

- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J & Thomson JA 2000 Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology* **227** 271–278.
- Brimble SN, Sherrer ES, Uhl EW, Wang E, Kelly S, Merrill AH Jr, Robins AJ & Schulz TC 2007 The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. *Stem Cells* **25** 54–62.
- Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA *et al.* 2007 Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448** 191–195.
- Chen HF, Kuo HC, Chien CL, Shun CT, Yao YL, Ip PL, Chuang CY, Wang CC, Yang YS & Ho HN 2007 Derivation, characterization and differentiation

- of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. *Human Reproduction* 22 567–577.
- Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT & Pera RA 2004 Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Human Molecular Genetics* 13 727–739.
- Ellerström C, Strehl R, Noaksson K, Hyllner J & Semb H 2007 Facilitated expansion of human embryonic stem cells by single-cell enzymatic dissociation. *Stem Cells* 25 1690–1696.
- Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J *et al.* 2004 Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 269 360–380.
- Guo Y, Costa R, Ramsey H, Starnes T, Vance G, Robertson K, Kelley M, Reinbold R, Scholer H & Hromas R 2002 The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression. *PNAS* 99 3663–3667.
- Hasegawa K, Fujioka T, Nakamura Y, Nakatsuji N & Suemori H 2006 A method for the selection of human embryonic stem cell sublines with high replating efficiency after single-cell dissociation. *Stem Cells* 24 2649–2660.
- Hiroshima T, Miharada K, Aoki N, Fujioka T, Sudo K, Danjo I, Nagasawa T & Nakamura Y 2006 Long-lasting *in vitro* hematopoiesis derived from primate embryonic stem cells. *Experimental Hematology* 34 760–769.
- Mandal A, Tipnis S, Pal R, Ravindran G, Bose B, Patki A, Rao MS & Khanna A 2006 Characterization and *in vitro* differentiation potential of a new human embryonic stem cell line, ReliCellhES1. *Differentiation* 74 81–90.
- Mitalipov S, Kuo HC, Byrne J, Clepper L, Meisner L, Johnson J, Zeier R & Wolf D 2006 Isolation and characterization of novel rhesus monkey embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 24 2177–2186.
- Müller T, Fleischmann G, Eildermann K, Mätz-Rensing K, Horn PA, Sasaki E & Behr R 2009 A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Human Reproduction* 24 1359–1372.
- Nakamura S, Okabayashi S, Ageyama N, Koie H, Sankai T, Ono F, Fujimoto K & Terao K 2008 Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey. *Veterinary Pathology* 45 67–72.
- Nusser KD, Mitalipov S, Widmann A, Gerami-Naini B, Yeoman RR & Wolf DP 2001 Developmental competence of oocytes after ICSI in the rhesus monkey. *Human Reproduction* 16 130–137.
- Osakada F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N, Akaie A, Sasai Y & Takahashi M 2008 Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 26 215–224.
- Sánchez-Pernaute R, Studer L, Ferrari D, Perrier A, Lee H, Viñuela A & Isacson O 2005 Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyno-1) after transplantation. *Stem Cells* 23 914–922.
- Sankai T, Cho F & Yoshikawa Y 1997 *In vitro* fertilization and preimplantation embryo development of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *American Journal of Primatology* 43 43–50.
- Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K *et al.* 2006 Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting. *Stem Cells* 24 1450–1457.
- Shimozawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T & Sankai T 2007 Comparison of methods to stimulate ovarian follicular growth in cynomolgus and African green monkeys for collection of mature oocytes. *Theriogenology* 67 1143–1149.
- Sparman M, Dighe V, Sritanaudomchai H, Ma H, Ramsey C, Pedersen D, Clepper L, Nighot P, Wolf D, Hennebold J *et al.* 2009 Epigenetic reprogramming by somatic cell nuclear transfer in primates. *Stem Cells* 27 1255–1264.
- Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, Kondo Y, Iritani A & Nakatsuji N 2001 Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Developmental Dynamics* 222 273–279.
- Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M *et al.* 2005 Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *Journal of Clinical Investigation* 115 102–109.
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL & McKay RD 2007 New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448 196–199.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA & Hearn JP 1995 Isolation of a primate embryonic stem cell line. *PNAS* 92 7844–7848.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP & Hearn JP 1996 Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biology of Reproduction* 55 254–259.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM 1998 Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 1145–1147.
- Tsuchida J, Yoshida T, Sankai T & Yasutomi Y 2008 Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 47 29–34.
- Umeda K, Heike T, Nakata-Hizume M, Niwa A, Arai M, Shinoda G, Ma F, Suemori H, Luo HY, Chui DH *et al.* 2006 Sequential analysis of α - and β -globin gene expression during erythropoiesis differentiation from primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 24 2627–2636.
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K *et al.* 2007 A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 25 681–686.
- Zhang L, Weston AM, Denniston RS, Goodeaux LL, Godke RA & Wolf DP 1994 Developmental potential of rhesus monkey embryos produced by *in vitro* fertilization. *Biology of Reproduction* 51 433–440.

Received 22 February 2009

First decision 23 March 2009

Revised manuscript received 24 November 2009

Accepted 1 December 2009

医科学への応用を目的としたサル類の発生工学的研究

山海 直

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

はじめに

サルはヒトと同じ霊長類である。本稿では、ヒト以外の霊長類という意味で「サル類」という言葉を用いることにする。サル類を用いた発生工学的研究の現状について紹介するとともに、先端医療を支える研究として発生工学に何が求められ、何が課題になっているのか、著者の経験を中心に述べてみたい。

動物実験なくして医科学研究の進展は考えられない。実験動物としては、主としてマウス、ラットなどの小型げっ歯類が用いられており、これらの動物は、取り扱いやすい、施設管理のうえで制御しやすいなどの利点がある。さらにマウスにおいては遺伝的に統御されているという大きな利点がある。一方、サル類は種ごとに生理、解剖等が微妙に異なり、同種のサルであっても個体差が大きい。しかし、サル類でなければ実施できない研究も多数存在し、ヒトに応用するための前臨床試験としてサル類で研究を実施する意義は大きい。近年の生殖医療、再生医療等の進展はめざましく、サル類での発生工学的研究への期待も大きくなっている。

発生工学的研究の概要

発生工学的研究は明らかにマウスを用いた研究が先行して進展してきた。その技術は家畜に応用され、現在、ヒトの臨床においてもなくてはならない技術となっている。しかし、マウスの卵、精子では開発が困難であったという事象も少なくない。たとえば、精子凍結技術は畜産分野では古くから開発され、オスにおいては優秀な遺伝子を有する個体のみを残すという戦略がとられている。畜産業界に大きく影響した精子凍結技術がマウスで可能になったのはこの10年くらいのことである。また、体細胞由来のクローン個体が生まれたことは記憶に新しいところであるが、その最初の報告はヒツジである。その後、マウスでも成功しているが卵の性状、発生の特性がヒツジとマウスでは異なることから決して容易な技術開発ではなかった。家畜で開発が先行し、その後小型実験動物で詳細な研究がなされた例であるが、体細胞クローン個体産生の成功により、その周辺の基礎研究が大きく進展した。発生時のゲノムインプリンティングの問題は体細胞クローン研究においてどうしても解明しなければならない事項の一つであり、発生と遺伝子情報の伝達という次世代に

つながる重要な機構が多くの研究により明らかになっている。ひとつひとつの成果が積み重ねられ、理論的背景を明確にしながらか本分野の研究は進展してきた。サル類においても多くの研究者が体細胞クローン個体作成に挑戦しているものと思われるが、その成功例は報告されていない。その一方で、これらの発生工学的技術はすぐにでも応用可能であるという誤解も生じている。近年、人工万能体細胞 (iPS 細胞) 樹立の成果が報告され、本分野の研究者でなくてもその情報を耳にするようになった。クローン動物の産生、iPS 細胞の樹立などの成果はこれまでの常識を覆すほどの大きなできごとである。これらの成果は広く臨床応用できる可能性を有しているため、社会の期待も大きい。iPS 細胞の開発は地道に基礎データが蓄積されてきた胚性幹細胞 (ES 細胞)、体性幹細胞等の研究が基盤になっている。現在は臨床応用可能な技術として様々な幹細胞 (後述) を用いた研究に期待がよせられ、それぞれの成果をリンクさせながら研究が進められている。

発生工学は生殖生理学、繁殖学等を基盤として生まれた分野であり、最終的には畜産、実験動物、そしてヒトの臨床への応用と活用範囲も広い。そのような状況の中で、幹細胞を用いた研究に代表されるような先端医科学研究は、臨床応用を意識した研究が中心となる。一方、動物の生殖現象を体外で再現するという古くからなされてきた研究、すなわち受精、胚発生、着床、妊娠維持、分娩といった一連の生殖現象の仕組みを正確に把握することさえ完結していないことを忘れてはいけない。これらの研究はマウスを用いてかなり進展してきたが、サル類では決して十分な研究が成されてきたとは言えない。マウスなどの小型実験動物や家畜では当たり前のように実施できる技術であってもサル類では容易には再現できないという現状がある。ホルモン処理を施して良質な卵を採取するというごく基本的な手技ですら確立されたとは言えない。

サルやヒトでの多くの成果が報告されているが、どんな手法も個体差の大きさを打ち消すような安定した技術とは言い難い。また、受精に関しても精子の先体反応や受精能獲得に関わる現象は動物種ごとに差があることが知られており、現在用いられている精子の処理方法がサル類に最も適したものであるかどうかは疑問である。さらにサル類の胚移植となるとかなり困難な状況と言わざるを得ない。サル類で体外受精、胚移植によりはじめて産児が得られたのは 1984 年であり、ヒトでの成功から 6 年後のことである (Balmaceda *et al.*, 1984; Bavister *et al.*, 1984; Clayton & Kuehl, 1984)。それから 24 年が経過しているが、実際にサル類の胚移植で産児を得る技術を有している研究機関は限られている。

このような状況から考えると、ごく基本的な技術開発を進めつつ先端研究を併行して実施していかなければならないのが本分野の研究の現状である。

サル類の発生工学的技術の現状と課題

良質な卵の採取

サル類においても体外受精等により受精卵を作出し、その卵を卵管に移植することで産児が得られている。これらの成果を再現性ある安定した技術にするためには良質な卵を回収する必要がある。近年は ES 細胞等の研究も重要な課題として取り組まれているが、やはり卵の質が結果に大きく影響してしまう。サル類では同じホルモン処理を施したとしても卵巣の反応性に大きな個体差が生じてしまう。サル類を実験に用いるということは、種間の差、個体差という要因も含めて検討しなければならないことは誰もが認識しているところであるが、未だに実験の初期段階で認められる個体差は多くの研究者を悩ませている。

通常、卵を採取するためにはホルモン処理を施し卵胞を人為的に発育させる。これまでに様々なホルモン製剤を組み合わせた方法が

試みられているが、ここではFSH製剤を使用した研究の一端を紹介する。FSH製剤は動物から抽出、精製してつくられるためそのロットごとに効力が異なっている可能性がある。また、FSHそのものの分子構造は動物種ごとに微妙に異なるため、他種の動物の卵巣が反応するかどうかは不明である。当然、サル種ごとにその反応性が異なることも承知しなければならない (Shimozawa *et al.*, 2007)。幸いマカカ属のサルの卵巣は市販のFSH製剤に対し非常によく反応することが確認されている。この方法で多数の卵胞を发育させることができるが、平均採卵数を算出したとき標準偏差がかなり高値となる。すなわちここでも個体差がかなり大きいことを意味するデータが示されている。また、内因性のLHサージにかわるものとしてhCG製剤が投与されるがその投与量は研究者ごとに工夫されている。また、hCGを投与する時期の決定は極めて困難である。現時点では、至適時期を示した報告はない。卵胞发育誘起法が同じであっても卵胞の发育程度が個体ごとに異なるためhCGを投与する最適な時期を示すことができない。hCG投与により卵核胞期 (GV期) の卵胞卵がMII期にまで发育すると期待されるが、実際に卵を採取してみるとGV期、MI期、またMII期といった様々なステージの卵が回収されることが多い (図1)。良質なMII期の卵を採取することが卵採取の基本技術であるが、今後も継続して検討しなければならない課題である。

また、精子および卵の培養に関する研究もかなり重要である。サル類に関わらず多くの動物種で共通の課題と言える。この分野を先行してきたマウスの成果があまりにも安定しているため、大きな話題にならないのかもしれない。しかし、サル類を用いて本研究を手がけた研究者が必ず行きあたる壁である。私の経験では実験に用いる卵の質が良ければ、その発生成績は向上するが、それでも発生が停止する卵も多い。これらの問題は、卵の質、

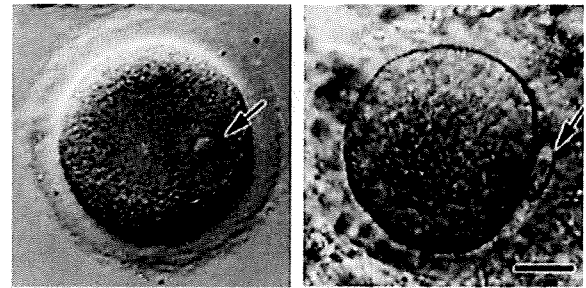


図1 カニクイザルの卵

GVステージ (左:矢印は卵核胞) と MII ステージ (右: 矢印は第1極体)。Bar = 20 μ m

培養液の組成、温度など複数の要因が影響して結果として示されるため問題は単純なものではないが、安定した技術を着実に開発していくためには避けられない研究課題である。

受精卵の作出と胚移植

シャーレの中で受精させるいわゆる体外受精はカニクイザル、アフリカミドリザル、ニホンザルなど (Sankai *et al.*, 1997a, 1997b, 1998)、複数のサル種で成果が報告されている。著者らはカニクイザルにおいて、その受精卵の发育ステージと月経周期が同期したメス個体の卵管に卵を移植することで産児を得ている (Sankai, 2000)。また、運動活性をほぼ完璧に維持したまま凍結できるカニクイザル精子のための凍結保存技術を開発し、その精子による体外受精に成功している (Sankai *et al.*, 1994)。この方法はマカカ属サル類の精子凍結法として広く用いられるようになった。しかし、凍結融解後、運動活性は維持されていても精子先体の細胞膜が膨化していることが電子顕微鏡で観察されている (Okada *et al.*, 2001)。すなわち、非凍結の状態を完全に維持できる凍結法は未だ開発途上にあると言える。しかし、この膨化は受精のときに必須の現象である先体反応と類似しているため、体外受精を実施するときにはそのことを考慮した実験スケジュールをたてることで受精させることができる。

顕微授精においてもいくつかの成果が報告されている。精子を卵細胞質内に注入する ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) では、高率に前核を形成させることができるようになった (Ogonuki *et al.*, 1998, 2001)。精子になる前の減数分裂を起こした直後の円形精子細胞を卵細胞質に注入する ROSI (Round spermatid injection) もサル類で成功している。ROSI で得られた受精卵の卵管への移植によりサル類で妊娠例が報告されたがこの個体は流産しており (Ogonuki *et al.*, 2003), 未だに ROSI 由来のサルの産児は得られていない。我が国では ROSI の臨床応用は認められておらず、サル類を用いたこれらの研究を展開しその安全性あるいは危険性を示すべきである (図 2)。

このように体外受精や顕微授精により受精卵を作出することは可能であるが、かなり厳しい現状がある。前述のとおり、これらの成績は使用する卵の質で大きく変わってしまうということ、また受精を確認してもすべての卵が順調に発生するわけではないということをしつかり理解した上で研究に臨まなければならない。地道にその要因を解明していくことは重要な課題である。近年、受精卵を用い

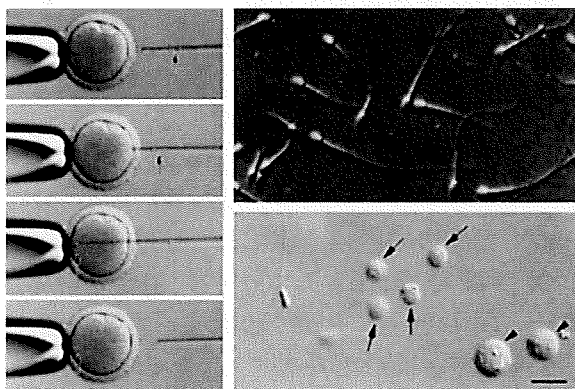


図 2 顕微授精 : ICSI と ROSI の比較

精子 (右上) を卵細胞質に注入する方法が ICSI, 円形精子細胞 (右下の矢印 : Bar = 20 μ m) を注入する方法が ROSI である。左の図は円形精子細胞の卵細胞質注入の流れを示している。矢印のところに円形精子細胞がある。

た研究が急増している。たとえば ES 細胞の研究、遺伝子操作を絡めた研究などは受精卵が材料となる。基本となる研究が中途半端なまま先端の研究を手がけなければならない状況がある。

さらに胚移植については、我が国でも成功例が報告されているが、サル類の胚移植により産児を得るためには、少しでも多くの情報を持ちそれを理解して実験に臨まなければならない。それでも妊娠率は決して高いものではないだろう。移植する受精卵の問題に加えて、卵を移植するレシピエント個体の状況が関連する。ヒトの前臨床試験としてサル類の実験は位置づけられるが、未だヒトでの成績を上回ることはできていない。

幹細胞

再生医療はその臨床応用が期待されている分野である。再生医療に関係してくるのが幹細胞であるが、幹細胞はいくつかに分類することができる (表 1)。幹細胞を用いた研究の中には発生工学の技術なしには発展が望めないものも多い。基本的な戦略は、多分化能を有した細胞を樹立して、目的の細胞、組織に分化させたものを個体にもどすというものである (図 3)。多分化能を有した細胞を代表するものが ES 細胞である。すでにヒトの ES 細胞も樹立されており、多くの研究者が臨床応用に向けて研究に取り組んでいる。ヒトの ES 細胞を用いた研究は臨床応用を目指すうえで大変意義のあることであるが、移植実験は安全性が証明されなければ実施は困難である。そこでサル類を用いた研究を実施することが最も信頼性が高い成果が得られ、臨床応用への近道となる。

これまでにマウスで試みられてきた方法ではサル類の ES 細胞は樹立できないことが分かっている。マウスで先行されてきた研究成果がこの種の研究においても基本となっているが、明らかにマウスと他の動物種で異なっている部分がある。ES 細胞の形態ですらマウ

表1 各種幹細胞とその特性

幹細胞	幹細胞の特性等
<u>体性幹細胞 (Somatic stem cell)</u>	特定の組織に分化する能力を有している (特定外の組織に分化させることも可能)。自己の細胞を利用することが可能。
<u>胚性幹細胞 (ES cell: Embryonic stem cell)</u>	受精卵由来の多分化能を有した細胞。作成のためには胚盤胞に発生した受精卵が必要。自己のES細胞を樹立することは困難。
<u>クローンES細胞 (ntES cell: Nuclear transfer ES cell)</u>	体細胞核由来のES細胞。多分化能を有している。作成のためには卵が必要。自己の体細胞を用いて作成することが可能。
<u>始原生殖細胞 (PGC: Primordial germ cell)</u>	生殖層に分化する前の細胞。多分化能を有したEG細胞を樹立できる。自己のPGCを得ることは考えられない。
<u>人工万能幹細胞 (iPS cell: Induced pluripotent stem cell)</u>	体細胞の遺伝子操作によって得られる細胞。多分化能を有している。作成のために卵は不要。自己の細胞で作成が可能。

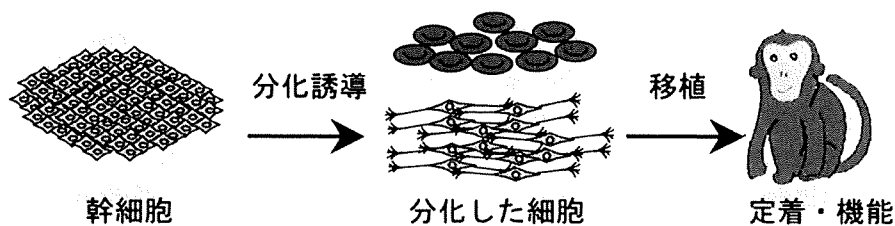


図3 再生医療の戦略の一例

スとサル類では異なっている。いくつかの動物種でES細胞は樹立されているがそのほとんどは扁平である。マウスは立体であり、立体構造を示す動物はマウスだけかもしれない。ES細胞であることを示す細胞表面マーカーもマウスとサル類では明らかに異なる(表2)。このことをつきつめればES細胞の定義は何かということになる。マウスの場合、あらゆる細胞に分化する能力(全能性)を有することを証明する必要があり、生殖巣キメラを介して樹立した細胞由来の個体ができることが条件となっていた。しかし、これまでにES細胞のキメラ個体が作成された動物種はマウスだけである。よって、全能性を有するというこ

とは条件にはならないと言わざるを得ない。これまでの報告から考えると、スキッドマウスに細胞を移植することでテラトーマを形成し三胚葉に分化することが証明されたものをES細胞と定義できるように思われる。すなわち、内胚葉、中胚葉および外胚葉に分化する能力を有する細胞である。この段階では、生殖細胞に分化し次の世代を残せる細胞か否かについては不明ということになる。言葉の定義は重要であるが、現実的にはすべての細胞に分化する能力を有している必要はなく、目的の機能を有する細胞に分化する能力があれば臨床応用が十分に期待できる。

このような観点から考察すれば、体性幹細

表2 カニクイザルとマウス ES 細胞の比較の一例

動物種	コロニーの形態	LIFによる分化抑制	ALP活性	細胞表面マーカーの活性			
				SSEA-1	SSEA-4	SRTA-1-60	SRTA-1-80
カニクイザル	扁平	効果無し	+	-	+	+	+
マウス	立体	効果有り	+	+	-	-	-

胞を使った方法が再生医療においてもっとも可能性を有しているのかもしれない。すなわち、それぞれの臓器に分化することが決定している体性幹細胞を用いることでES細胞がもつ多くの問題点を解決することができる。

ES細胞がかかえる大きな課題が二つ挙げられる。一つは、様々な細胞に分化する能力を有しているため臨床応用するときにも少しでも未分化な細胞が混入していると目的外の細胞に分化して増殖してしまう可能性があるということである。それががん化する可能性も十分に配慮しなければならない。現在、完全な終末細胞に分化させる研究が進み、また、分化した細胞のみを抽出する技術の開発、あるいは未分化な細胞を除去する研究が進められている。もう一つの課題は、自己の細胞から作成したES細胞でなければ体内に戻したときに拒絶反応が起きてしまうということである。その対策として患者の体細胞からES細胞を作出することが可能となるクローンES細胞作出という手法が注目されている。マウスにおいてその樹立に成功し、最近、クローンES細胞を用いた手法でパーキンソン病の治療に成功したという報告がなされた (Tabar *et al.*, 2008)。しかし、マウス以外の動物ではクローンES細胞を作出することが未だ困難な状況にある。種の壁が大きな問題として残っている。未分化細胞の遺伝子情報をもとに作成されたiPS細胞も拒絶反応という課題を解決するカギを握っている。iPS細胞は体細胞由来であり、臨床応用を考えた時、容易に入手できる体細胞を用いる利点は大きい。患者自身の体細胞を使えば拒絶反応の問題は解決する。これま

でマウス、ヒト等においてiPS細胞が樹立されており、ES細胞同様、サルを用いた前臨床試験の重要性については議論の余地はなく、数年あるいは数か月後にはサルのiPS細胞も樹立されてくることが予測される。

再生医療分野の今後の展開としては、体性幹細胞を用いた研究は大きく展開し広く臨床に応用されていくことが予測される。また、ES細胞、iPS細胞を用いた研究はそれぞれに対して重要な情報を提供しながら、併行して基礎研究を展開していくことになると思われる。また、クローンES細胞を用いた手法はブレークスルーのための大きな発見が必要かも知れないが、可能性ある研究として展開していくべきものと考えられる。

近未来、容易に幹細胞を作成する技術が開発されたときには再生医療に関する研究も広く、かつ深く急速な展開を見ることになるだろう。先端の研究として多くの研究者がES細胞やiPS細胞に注目して研究に取り組んでいるが、様々な問題を解決するための大きなヒントが正常な受精卵から様々な組織、臓器に分化していくという生体内での個体発生の情報にあるということには忘れてはならない。

医科学研究への応用が期待されるサル類の発生工学の技術

遺伝的にヒトに近いということがサル類が研究に用いられる大きな理由である。霊長類だけに感染する病原体の研究、高次脳機能の解析研究などサル類でなければ解明できない研究が多数存在する。また、サル類でなされ

た研究の成果は、ヒトに応用したときに極めて類似した結果が得られる可能性が高く、これはサル類で医科学研究を実施する大きな利点である。マウスやラットとくらべて寿命が長いということから長寿科学研究にもサル類が適していると言える。医科学研究に用いられるサル種は主として新世界ザルと旧世界ザルであり、高次脳機能研究や心理行動学研究においては類人猿からも多くの情報が得られている。サル類で医科学研究を実施するにあたり、サル種を選択、個体を選択、綿密な実験計画の立案など、様々な配慮がなされている。

サル類での医科学研究の戦略の一つとして疾患モデルを用いた研究があげられ、モデルザルの開発には様々な手法が用いられている(図4)。日々の慎重な観察とともに定期的な検査体制を構築することは、自然発症の疾患を見出すための重要な手法である。たとえば自然発症個体を解析し、それをモデル化するという方法は偶然を伴うものであるが、これらの手法により子宮内膜症、高脂血症、糖尿病などの個体が検出されている。超音波診断装置による詳細な観察により循環器疾患、とくに心臓に見られる疾患に対するモデル個体も検出されている (Koie *et al.*, 2005)。また、計

画的な繁殖を実施して家系調査を可能にするシステムを構築することは遺伝性疾患を解析するために有用である (Honjo, 1985)。これまでに眼底にみられる黄斑変性疾患、高脂血症、循環器疾患などが遺伝性であることが知られており、その家系に注目した解析がなされている。ただし、遺伝性疾患であることを証明するためには計画的に交配を繰り返す必要があり、サル類でそれを実施するという事は、かなりの年月を要する大規模実験となる。可能な限りの生殖、繁殖学等の基礎データを蓄積し、効率の良い繁殖システムを構築することが望まれる。この繁殖システムに発生工学的技術を用いることで一度に多数の受精卵を作出することができ、さらに凍結技術の導入により貴重な遺伝子の保存が可能となる。

特定の疾患を発症するモデル動物を人為的に作出することもできる。疾患によっては、薬品により疾病を誘発することができる。また、物理的(外科的)に自然発症疾患に近い疾病を作り出すことも可能であろう。しかし、これらの方法はすべての疾患に有用というわけではなく、むしろほんの一部の疾患にしか対応できない。近年、タンパク、DNA レベルでの疾病の解析も進んでおり、マウスで実施されているようなトランスジェニック (Chan

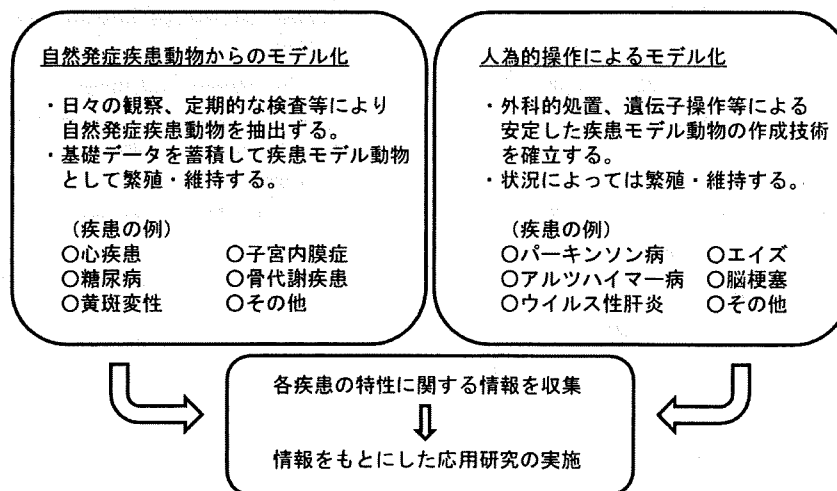


図4 サル類疾患モデルの作成の手法例と応用のための戦略

et al., 2001) やノックアウト個体の作出がサル類でも可能になりつつある。その実現のためには発生工学的手法の開発が重要なカギをもっている。

自然発症個体の疾患モデル、遺伝子操作等により作出された疾患モデルは貴重な研究資源となるが、これらの個体を使用する研究者はその個体の情報を十分に理解して実験を実施しなければならない。自然発症の疾病には複雑な要因が関連している可能性がある。また、人為的に作出されたモデル個体は本当にその疾患を再現しているかという疑問は常に残る。研究者は得られた結果を正確に解釈することで、はじめて有用な研究となる。

このように、発生工学的研究は疾患モデル動物の作出のみならず、保存や再生医療等の基盤的あるいは応用的手法として医科学研究になくってはならないものとなっている。

おわりに

サル類を用いた医科学研究は、ヒトの医療の安全性を確保しながら、新しい技術を導入していくうえで極めて重要である。ただし、容易に成果が得られるものではなく、基盤研究なくして進展は望めない。ごく基本となる研究成果が先端研究を支えていることは間違いないが、基礎研究と先端研究を併行して進めなければならないという現状があることを紹介した。サル類を用いた研究から得られる成果の個体差についても本稿で述べたが、得られた成果が大きくばらついたとしても、それぞれの個体が示す結果はすべて真実であることをしっかりうけとめ評価していかなければならない。遺伝的統御がなされたマウスを用いた実験とサル類を用いた実験は研究目的が異なっている。ヒトにおいても疾病に対する治療効果は当然、個人差が認められることを考えると、サル類で実験を行うことはそういった観点からもむしろ意味あることと言えるのかも知れない。

本稿が掲載されるころには様々な研究の状況が大きく変化している可能性もある。本分野の研究はそれほど急速に進展していることを最後に記しておきたい。

引用文献

- Balmaceda JP, Pool TB, Arana JB, Heitman TS, Asch RH 1984: Successful in vitro fertilization and embryo transfer in cynomolgus monkeys. *Fertil Steril* 42: 791-795.
- Bavister BD, Boatman DE, Collins K, Dierschke DJ, Eisele SG 1984: Birth of rhesus monkey infant after in vitro fertilization and nonsurgical embryo transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2218-2222.
- Chan AW, Chong KY, Martinovich C, Simerly C, Schatten G 2001: Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291: 309-312.
- Clayton O, Kuehl TJ 1984: The first successful in vitro fertilization and embryo transfer in a nonhuman primate. *Theriogenology* 21: 228.
- Honjo S 1985: The Japanese tsukuba primate center for medical science (TPC): An outline. *J Med Primatol* 14: 75-89.
- Koie H, Ageyama N, Ono F, Kanayama K, Sakai T, Sankai T 2005: Echocardiographic diagnosis of muscular ventricular septal defect in a cynomolgus monkey. *Cont Top* 44: 26-27.
- Ogonuki N, Sankai T, Cho F, Sato K, Yoshikawa Y 1998: Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): Intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination. *Hum Reprod* 13: 2555-2560.
- Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikano T, Oda S, Miyazaki S, Ogura A 2001: Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biol Reprod* 65: 351-357.
- Ogonuki N, Tsuchiya H, Hirose Y, Okada H, Ogura A, Sankai T 2003: Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum Reprod* 18: 1273-1280.
- Okada A, Igarashi H, Kuroda M, Terao K, Yoshikawa Y, Sankai T 2001: Cryopreservation-induced acrosome vesiculation in live sperm from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Hum Reprod* 16: 2139-2147.

- Sankai T 2000: In vitro manipulation of nonhuman primate gamete for embryo production and embryo transfer. *Exp Anim* 49: 69-81.
- Sankai T, Cho F, Yoshikawa Y 1997a: *In vitro* fertilization and preimplantation embryo development of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Am J Primatol* 43: 43-50.
- Sankai T, Ogonuki N, Tsuchiya H, Shimizu K, Cho F, Yoshikawa Y 1998: Comparison of results from IVF-related studies for cynomolgus monkeys, Japanese monkeys, African green monkeys, and red-bellied tamarins. *J Fertil Implant* 15: 177-179.
- Sankai T, Shimizu K, Cho F, Yoshikawa Y 1997b: In vitro fertilization of follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Lab Anim Sci* 47: 58-62.
- Sankai T, Terao K, Yanagimachi R, Cho F, Yoshikawa Y 1994: Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 101: 273-278.
- Shimozawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T 2007: Comparison of methods to stimulate ovarian follicular growth in cynomolgus and African green monkeys for collection of mature oocytes. *Theriogenology* 67: 1143-1149.
- Tabar V, Tomishima M, Panagiotakos G, Wakayama S, Menon J, Chan B, Mizutani E, Al-Shamy G, Ohta H, Wakayama T, Studer L 2008: Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. *Nat Med* 14: 379-381.

(Summary)

In Vitro Manipulation of Nonhuman Primate Gametes for the Application to Medical Science Research

Tadashi SANKAI

Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation

Since non-human primates are closely related to human and share many physical similarities, they are important for use in translational research from basic research. The study of non-human primates has contributed to our understanding of basic biological phenomena such as reproduction; diseases and the development of drugs, treatment and vaccines for the promotion of better health for human and non-human primate alike. A lot of researches are obtained basic data from rodents such as mouse. However, even if the results are directly applied to human clinical situations, new generation therapeutics in reproduction are often so specific and cannot be predicted by testing in rodents. Often these important side effects can only be detected in specific primate models. The close genetic, immunological and virological relation with human makes non-human primates an excellent model of diseases. Therefore, primate research for medical science is conducted and the formation of the breeding colonies for this purpose is recognized to be great importance. It is necessary to pay attention to developmental study on reproduction field for the reproductive medicine and regenerative medicine. In this paper, I describe the current state of this research and the problems of developmental reproductive technology in the non-human primate.

Key words: gamete, non-human primate, reproductive technology

山海 直 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
〒 305-0843 茨城県つくば市八幡台 1 - 1

Tadashi SANKAI Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation
1-1, Hachimandai, Tsukuba, 305-0843 Japan
e-mail: sankai@nibio.go.jp

