

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 19-21 年度総合研究報告書

医学研究に資するカン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ン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 細胞という免疫拒絶の無い多能性幹細胞の樹立を目指すものである。医科学研究に多くの実績のあるカンクイザルの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への応用を計る上で、安全性および移植などの評価・検証のために非ヒト霊長類を用いた医科学研究に重要な生物資源となる。以下のように 3 年間の研究内容が要約される。

カン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、基盤技術を確立する必要がある。成熟卵の採取においては、GnRH、FSH および hCG を用いた卵の採取について検討した結果、MII 卵と GVBD 卵がそれぞれ全採取卵の 1/4 を占め、後者の成熟過程を制御できれば、2 倍の MII 卵を採取できることになる。そこで、卵成熟を誘導する hCG の投与量の比較を行ったところ、いずれも回収卵の 1/3 程度の成熟卵しか得られず、顕著な効果を認めなかった。投与した FSH、hCG に対する反応性に個体差があることが明らかとなった。体細胞核移植においては、核移植のドナーとする体細胞の細胞周期制御を骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) で検討したが、他の細胞に比べ、ノコダゾールに対する感受性が低い可能性があることが示唆された。核移植に必要な卵の核は、細胞質へのダメージを極力抑えることで除くことが可能であった。そして、クローン胚の活性化法については、Ionomycin と DMAP の複合処理がより効果的なものであり、また、受精卵を利用した核移植では、正常受精由来の細胞質を利用する利点を確認した。さらに、卵の由来として、個体の年齢および卵の成熟時間の観点から調べたところ、ホルモン投与後の卵成熟時間にかかわらず、成熟個体から採取される卵を使用する方が核移植研究に効果的であった。卵の採取および核移植を通して、個体間におけるバラツキが大いに認められ、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がさらなる効率的な研究に必要であると考えられた。カ

ニクイザル体細胞へカニクイザル由来の初期化誘導遺伝子を導入することで作製された iPS 細胞は、正常核型が安定的に維持され、また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た。これは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人為的に多能性幹細胞を誘導できることを示している。以上、医科学研究に大きく貢献できるカニクイザルにおいて、体細胞由来クローン ES 細胞を樹立する基盤的な技術を構築した。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

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、プロジェクト研究員

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・iPS 細胞のような免疫拒絶のない多能性幹細胞を樹立することを目的とし、再生医療等のヒト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、多くの実績を持つ実験動物の一つである。このようなカニクイザルのクローン ES 細胞・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

な研究となる。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、ドナー細胞、核移植や ES 細胞樹立に関する検討、さらに iPS 細胞の作製およびその性状に関する検討を行った。

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 ES 細胞・iPS 細胞の作製、それらの性状などを検討した。各検討課題の詳細な方法は各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

FSH を投与した 52 頭のメスカイクイザルより、1,873 個の卵を回収し、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、実験に直接使用可能な MII 期の卵は 3 割未満であった。カニクイザルに投与したヒト FSH の尿由来および遺伝子組換え由来の製剤間において、顕著な差は認められなかった。一方、卵成熟に使用する hCG の投与量を比較した場合 1200IU の hCG で処理した場合、GV 期、GVBD(MI 期)、MII 期の卵の数はそれぞれ 19.52 ± 20.8 個、 11.50 ± 14.3 個、 15.87 ± 16.5 個であり、4000IU の hCG で処理した場合、それぞれ 9.50 ± 4.9 個、 6.31 ± 6.0 個、 8.95 ± 6.9 個であった。いずれの投与量であっても大きな個体差が認められ、また回収卵の 1/3 程度の成熟卵しか得られなかった。

2) 体細胞核移植法の検討

体細胞の細胞周期の制御を検討するために、ノクタゾールを接着培養下にある骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)に添加した際の細胞周期をフローサイトメーターで解析した。ノクタゾール添加群では、G0/G1期:66.8%、S期:

14.9%、G2/M期:18.4%。無処置群(コントロール)では、G0/G1期:74.2%、S期:14.0%、G2/M期:11.8%であった。ノクタゾール添加により、G0/G1期の細胞の割合は減少、S期の細胞はほぼ変化無く、G2/M期の細胞の割合は増えた。ノクタゾール存在下で 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ところ、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。

体細胞核移植において、顕微操作下にある卵の核は観察でき、卵への負荷を軽減した中での核除去が可能であった。除核卵とG0期にある卵丘細胞を用いて構築した核移植卵は、Ca Ionophore と Dimethylaminopurine (DMAP) の複合処理後、体外培養により胚盤胞への発生が 1 個確認できた。活性化法として、Ionomycin と DMAP の複合処理や電気刺激と DMAP の複合処理あるいはクローン胚の培養時のトリコスタチンA(TSA)処理では、いずれも劇的に効果的な桑実胚および胚盤胞への発生を確認できなかった。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ところ、桑実胚への発生を 2 個確認したが、このクローン胚作製方法には核の除去に難があった。

また、使用する卵の由来について次の検討を行った。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) 多能性幹細胞の樹立と解析

クローン胚という特殊な操作胚からの ES 細胞の樹立を行う上で、多様な胚から ES 細胞を樹立する技術と経験は必要である。ウサギ、カンクイザルおよびアフリカミドリザルにおいて、基礎検討として受精卵からの ES 細胞の樹立を検討した。これらの種から樹立した ES 様細胞はヒト ES 細胞のように単層で増殖し、アルカリフォスファターゼ、SSEA4、Oct4 および Nanog などの未分化マーカーが陽性であった。核型解析の結果においても、ほとんどの細胞で正常核型を維持していることが明らかとなった。また未分化様の細胞を SCID マウスに移植することで三胚葉性のテラトーマ形成も確認できた。

クローン ES 細胞と同様な性質を持つ iPS 細胞の樹立に関して検討を行った。カンクイザル 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ンクイザル体細胞 (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 細胞様のコロニーを形成した。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。これらの細胞は Oct3、SSEA4、Nanog および TRA-2-54 などの未分化マーカーを発現した。また胎仔肝臓由来の iPS 細胞 1 株を除いた全てで SCID マウスに奇形種が形成された。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全ての株でおよそ 80% 以上の正常性を維持していることが示された。

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、MII 卵と GVBD 卵がそれぞれ全採取卵の 1/4 を占めた。GVBD 卵を MII 期の状態で回収することが可能になれば MII 卵は全採取卵の約 50%、すなわち 2 倍量採取できることになる。一方では卵成熟を誘導する hCG の投与量の比較を行ったが、いずれの投与量であっても大きな個体差を認め、また回収卵の 1/3 程度の成熟卵しか得られなかった。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。このように、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、マウスのような遺伝的に均一な集団は存在しない。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が、ある程度の卵数を確保できない状況でもない。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。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、その個体差を十分考慮した実験計画が必要である。

2) 体細胞核移植法の検討

核移植のドナーとする体細胞の細胞周期の検討において、MSCの細胞周期をM期に制御することを目的に検討した。微小管の重合を阻害するノコダゾールを用いたところ、G0/G1期の細胞が減少した分、G2/M期の細胞が増加した。しかしながら、無処置に比べ、G2/M期が1.5倍に増えたとはいえ、細胞の割合としては、20%弱しかなかった。MSCに対するノコ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はノコ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。

核移植のドナーの安定供給を目的に、MSCにSV40遺伝子を導入した。この遺伝子導入によって、primary cellsと同じ細胞表面マーカーを有する15株を得た。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、核

移植に対して体細胞核の提供が容易になるものと考えられた。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。

一方、カニクイザル体細胞核移植において、卵の核は紫外線や遠心による細胞質の勾配を利用した方法などを利用しなくても除核が可能であり、細胞質へのダメージを極力抑えた除核未受精卵を準備することが可能であった。次の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-について核移植法の検討を行った。(1)クローン胚の活性化法については、IonomycinとDMAPの複合処理がより効果的なものであると考えられた。(2)薬剤による初期化誘導法の検討では、カニクイザル体細胞クローン胚に対してTSA処理を行ったが、胚盤胞への発生は見られず、マウスのような効果が認められなかった。(3)受精卵を利用した核移植技術を検討したところ、桑実胚への発生を確認した。この方法は、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ところが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、その確実な除核法の確立という解決すべき課題を残した。さらに、卵の由来の違いによる核移植胚の発生への影響を個体の年齢および卵の成熟時間の観点から調べた。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、成熟個体を使用の方が良いことを示唆した。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を確認された。以上のことより、カニクイザルにおけるクローン研究において、成熟個体を利用することに利点があると考えられた。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が、カニクイザルにおいて明確に認められなかった。個々の実験をみると、個体間におけるバラツキが大いに認められ、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。以上のような各種検討の中で、クローン胚の胚盤胞への発生が確認できたことは、さらなる修正を重ねることでより効率的な作出が可能であることを示すものである。

3) 多能性幹細胞の樹立と解析

ウサギ、カニクイザルおよびアフリカミドリザルの受精卵から ES 細胞を樹立した。これらの ES 細胞は未分化マーカーの発現、多分化能など、他の霊長類 ES 細胞と同様な性状を示した。特にアフリカミドリザルの ES 細胞の樹立は、

世界唯一の成果である。以上の ES 細胞樹立および性状解析技術は、クローン ES 細胞、単為発生 ES 細胞および iPS 細胞などの多様な多能性幹細胞の樹立等に大きく貢献するものである。

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、その内の 1 個で内部細胞塊の outgrowth を確認した。この成長速度は遅いことが観察され、継代したものの新たなコロニーの形成は見られなかった。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、単為発生誘起および体外培養の方法をさらに改良する必要があるものと考えられた。

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、カニクイザル Oct3/4 および c-Myc 遺伝子を新規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および胎児肝臓由来細胞に導入を行ったところ、ES 細胞様のコロニーを得た。これらの細胞において、未分化マーカーの発現が、カニクイザル、アカゲザル、ヒト ES 細胞などと同様に観察された。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の特徴である。これらのことは、樹立された細胞株は未分化状態を維持していることを顕している。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細胞と類似していた。以上のことから、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ヒト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、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卵が含まれるが、遺伝的背景に起因すると考えられる個体差が存在する。サル類を研究に用いる前提としてこの個体差があることを受け入れ、FSHやhCG投与のタイミング、採卵時間の調節、卵巣のモニタリングにさらなる改善が必要と考える。

2) 体細胞核移植法の検討

ノコダゾールを用いて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。これは体細胞幹細胞という特殊な性状によるものである可能性があり、その核移植への応用のために、更にノコダゾール濃度や反応時間を検討していく必要がある。また、体細胞核の供給源として、体性幹細胞に着目し、そ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を確認した。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、カニ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。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。

3) ES細胞の樹立と解析

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

どにヒト前臨床研究に先だって利用できるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

刊行物一覧を参照

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、小倉 淳郎. 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.

9) 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.

10) 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.

11) Shibata H, Terao K. Phenotype and

- function of natural killer cells in cynomolgus monkeys. International Primatological Society XXII Congress. August 3-8. 2008. Edinburgh.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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ー、2008年7月、神戸.
- 21) 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.
- 22) 小倉淳郎. 新生仔マウス卵巣から分離された莢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。
- 23) 小倉淳郎. 新生仔マウス卵巣から分離された莢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。
- 24) 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。
- 25) 小倉淳郎. 胚を組み立てる—顕微授精と核移植、第55回日本実験動物学会総会、2008年5月、仙台。
- 26) 下澤律浩、岡田浩典、羽鳥真功、山海直、カニクイザルにおける簡略化した卵胞発育誘起法の検討、第54回日本実験動物学会、2007年5月、東京。
- 27) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、八神健一、山海直、カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖様式の比較、第54回日本実験動物学会、2007年5月、東京。
- 28) 岡田浩典、下澤律浩、羽鳥真功、山海直、二種類のカニクイザル ES 細胞株へのリポフェクションによる遺伝子導入条件の検討、第54回日本実験動物学会、2007年5月、東京。
- 29) 下澤律浩、岡田浩典、羽鳥真功、山海直。アフリカミドリザル顕微授精由来胚からの ES 様細胞の樹立。第48回日本哺乳動物卵子学会、2007年5月、山梨。
- 30) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、八神健一、山海直。カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖動態の動画解析。第48回日本哺乳動物卵子学会、2007年5月、山梨。
- 31) 田中裕次郎、中村紳一朗、岸友紀子、池田たま子、柴田宏昭、佐々木京子、阿部朋行、林 聡、北野良博、長尾慶和、花園 豊。異種大型動物におけるサル ES 細胞移植後の長期肉眼的生着。第5回幹細胞シンポジウム、2007年5月、兵庫。
- 32) Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y, Ikeda T, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Nagao Y, Kitano Y, Hanazono Y. Long-term Macroscopic Engraftment of Cynomolgus Tissues in Sheep After In Utero Transplantation of Cynomolgus ES Cells. 10th International Society of Stem Cell Research, 2007年6月、オーストラリア、ケアンズ。
- 33) Kishi Y, Inoue M, Shibata H, Tanaka Y, Sasaki K, Ikeda T, Hasegawa M, Hanazono Y. Pharmacological Control of Sendai Viral Transgene Expression in Cynomolgus Embryonic Stem Cells. 第13回日本遺伝子治療学会、2007年6月、名古屋。
- 34) Shibata H, Hanazono Y. A nonhuman primate model for hematopoietic transplantation with ES cells. 11th Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division and 12th Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation, 2007年9月、中国、北京。
- 35) Honda A, Hirose M, Ogura A. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. 17th Lake Shirakaba Conference, 2007年10月。Vedbæk, Denmark.
- 36) Ogura A, Honda A, Hirose M, Characterization of thecal stem cells and

primordial oocytes concomitantly isolated from mouse neonatal ovaries. 4th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007, 2007 年 11 月 Singapore, Singapore.

37) Hirose M, Honda A, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Wakisaka N, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Katayama K, Miyoshi H, Sankai T, Ogura A. Improvements in the derivation and culture of rabbit embryonic stem-like cells and their characterization in vitro and in vivo. 4th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007. 2007 年 11 月. Singapore, Singapore.

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

39) Shibata H, Terao K. Subset and Function of Natural Killer Cells in Cynomolgus Macaques. 第 16 回サル類疾病国際ワークシ

ョップ、2007 年 12 月、茨城.

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

41) 羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、Fowzia Sultana、八神健一、山海 直. カニクイザル胚性幹(ES)細胞、線維芽細胞、およびマウス ES 細胞の増殖動態の比較. 第 16 回サル類疾病国際ワークショップ、2007 年 12 月、茨城.

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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
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
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
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
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

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
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
山海 直	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
Shimozawa N, Sankai T, Ogura A.	Reproductive technologies and related studies in the cynomolgus monkey.	J Mamm Ova Res	25	133-142	2008
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
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
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
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 into nonhuman primates.	Gene Therapy	16	726-733	2008

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
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
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	2008
Sultana F, Hatori M, Shimosawa 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
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	53	605-613	2009
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	47	155-160	2009
Shimosawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T.	Comparison of follicular growth stimulation methods for collecting mature oocytes from cynomolgus and African green monkeys	Theriogenology	67	1143-1149	2007
Okada H, Hatori M, Shimosawa N, Tsuchiya H, Kuwana T, Sankai T.	Collection and culture of primordial germ cells from cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>)	Reprod Med Biol	6	203-210	2007

Yamamoto M, Tase N, Okuno T, Kondo Y, Akiba S, Shimozawa N, Terao K.	Monitoring of gene expression in differentiation of embryoid bodies from cynomolgus monkey embryonic stem cells in the presence of bisphenol A	J Toxic Sci	32	301-310	2007
Shinmen A, Honda A, Ohkawa M, Hirose M, Ogonuki N, Yuzuriha M, Miki H, Mochida K, Inoue K, Abe K, Ito M, Ogura A.	Efficient production of intersubspecific hybrid mice and embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection	Mol Reprod Dev	74	1081-1088	2007
Inoue K, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H, Ogura A.	Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells	Stem Cells	25	1279-1285	2007
Honda A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T, Shinohara T, Ogura A.	Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells	Proc Natl Acad Sci USA	104	12389-12394	2007
Endoh K, Mochida K, Ogonuki N, Ohkawa M, Shinmen A, Ito M, Kashiwazaki N, Ogura A.	The developmental ability of vitrified oocytes from different mouse strains assessed by parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection	J Reprod Dev	53	1199-1206	2007
Kawahara M, Obata Y, Sotomaru Y, Shimozawa N, Bao S, Tsukadaira T, Fukuda A, Kono T.	Viable bi-maternal mice: An oocyte reconstruction system for functional analysis of imprinted genes regulated by parent-of-origin-specific methylation	Nat Protocols	3	197-209	2008

