

図1. カニクイザルサンプル中の特異的SRV/Dプロウイルス又はRNAの検出
 (A)env1234を用いたRT-PCR, 1 ; #1母ザル血, 2 ; positive control. (B) gag4を用いたPCR, 3 ; #1胎児, 4 ; #2胎児, 5 ; positive control. (C) gag4を用いたPCR, 6 ; #2母ザル血液, 7 ; positive control. (D)env1234用いたRT-PCR, 8 ; #3臍帯血, 9 ; #3羊水, 10 ; #3母ザル血液. (E) gag4を用いたPCR, 11 ; #2羊水, 12 ; #3臍帯血, 13 ; #3羊水, 14 ; #3母ザル血液, 15 ; positive control. M ; marker.

霊長類を用いた感染症モデルに関する研究

研究分担者：岡村 智崇 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

風疹は、ヒトが唯一の自然宿主であり、風疹ウイルスの胎児感染は胎盤を介して起こる。これまで、風疹の動物モデルにはマウス、フェレット等の報告がある。しかし、小動物モデルを用いた研究では解剖学的にヒトの胎盤構造の隔たりが極めて大きく、ヒトの動物モデルとして機能しているとはいえない。このため妊婦の動物モデルには、免疫機構や解剖学的な胎盤構造がヒトと類似した霊長類を用いることは重要である。

本研究では、まずカニクイザルの風疹ワクチンに対する感受性について調べ、ワクチン接種後、風疹特異的な抗体誘導を認めた。次に 7 頭の妊娠カニクイザルに風疹ワクチンを接種したところ 1 頭の死産が認められ、さらにサル胎児からは風疹ワクチンが分離された。またワクチン接種後、経時的に採取した鼻汁や咽頭 Swab、解剖後に採取した複数のリンパ節や臓器からワクチン遺伝子が検出され、妊娠カニクイザルは風疹ワクチンに持続的に感染していることが示唆された。

これらの結果から、妊娠カニクイザルはワクチンの評価系動物モデルとして利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

風疹は、古くから知られている全身性のウイルス感染症の一つである。風疹に伴う最大の問題は、風疹免疫が不十分な妊娠初期の妊婦が風疹ウイルスに感染すると、新生児に先天性風疹症候群（CRS）（先天性心疾患、難聴、白内障）を起こすことである。この CRS 発生の多い年度は、風疹の流行年と完全に一致しており、さらに風疹ウイルス感染を危惧した人口流産も多く行われている。現在の妊婦の多くは、風疹ワクチン定期接種世代であるが、例年、風疹ウイルスに対する抗体保有状況の調査では、十分な風疹免疫を誘導されていない妊婦が報告されており（約 10～15%）、先天性風疹症候群の発生は、常に懸念されている。また現在使用されている風疹ワクチンは生ワクチンであるため、風疹抗体が未熟な妊婦に接

種するには危険が伴い、現状のワクチンでは対策を取ることが難しい。

本研究では、妊婦に安全な新規風疹ワクチンの開発に向けて、風疹ウイルス感染症におけるカニクイザルモデルを確立する。動物モデルには初期妊娠カニクイザルを用い、高度弱毒化された風疹ワクチンを投与し、母体および胎児への影響を検討する。

B. 研究方法

1. 免疫スケジュール

当センター繁殖育成しているカニクイザルを用いて、風疹ワクチンの感受性を検討する。2 頭のカニクイザルに風疹ワクチンを接種し、免疫誘導能を解析した。

次に風疹ワクチンの胎児への影響を解析するため、妊娠陽性 3 週齢のカニクイザルに風疹ワクチンを接種し、採血および Swab

を採取する。その後3週で解剖し、胎児感染の有無や母体内ワクチン分布を解析する (Fig.2)。

2. 風疹ワクチン抗体誘導

風疹ワクチンに対する感受性を評価するため、希釈した血漿を用いて抗風疹 IgM 抗体および IgG 抗体の ELISA 法を行った。

3. 風疹ワクチン遺伝子検出およびウイルス分離

採材したサンプルから風疹ワクチン遺伝子検出のため、風疹ウイルス遺伝子特異的な Primer を作製し、PCR 法を行った。また、風疹ワクチン遺伝子が検出されたサル胎児については、RK-13 細胞株を用いて、風疹ワクチンのウイルス分離を行った。

4. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. カニクイザルを用いた風疹ワクチン感受性試験

カニクイザルの風疹ワクチンに対する感受性について検討したところ、ワクチンを接種された2頭のカニクイザルは、抗風疹 IgM および IgG 抗体を誘導した (図 1)。

2. 妊娠カニクイザルを用いた風疹ワクチンの胎児感染の検討

7頭の妊娠3週カニクイザルに、風疹ワクチンを接種したところ (図 2)、1頭の死産が確認された。また死産したサル胎児からは、風疹ワクチン遺伝子が検出され、さらにウイルスも分離された (図 3A, B, C)。

3. 妊娠カニクイザルを用いた風疹ワクチンの持続感染の検討

風疹ワクチンを接種した4頭の妊娠カニクイザルから PBMC、鼻汁および咽頭 Swab を経時的に採取し、風疹ワクチンの持続感染を確認したところ、それぞれのサンプルから風疹ワクチン遺伝子が検出された (図 4)。

4. 妊娠カニクイザルを用いた風疹ワクチンの生体内分布

風疹ワクチンを接種した4頭の妊娠カニクイザルを解剖し、様々な臓器やリンパ節から風疹ワクチン遺伝子が検出された (図 5)。

D. 考察

風疹ウイルスの胎児感染は、胎盤を介して起こる。このため妊婦の動物モデルには、胎盤構造がヒトと類似した霊長類を用いることは重要である。

本研究では、風疹ワクチンを接種した妊娠陽性カニクイザル7頭のうち、1頭で死産を確認し、サル胎児からウイルス (ワクチン) が分離された。血漿中にはウイルスが不検出のため、感染した PBMC から胎盤を介し胎児への感染が疑われるが、詳細は不明である。今後も引き続き、調査を継続したい。また風疹ワクチンの生体内分布について、妊娠カニクイザルの背中に皮下接種後、採取した鼻汁や咽頭 Swab からワクチン遺伝子が検出され、また解剖後、複数のリンパ節や臓器からも検出された。また、風疹特異的な抗体の誘導についても確認できたことから、カニクイザルは風疹ワクチンの感受性を持っていることが示唆された。

これまでの研究結果から、カニクイザルは有用な風疹ワクチン評価系モデルとして利用できると考えられた。

E. 結論

妊娠カニクイザルは、風疹ワクチン研究の動物モデルとして利用できる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity. Scand. J. Immunol. 72(2):98-105. 2010.

2. 学会発表

1. 萩原晶代、岡村智崇、新井陽子、齊藤守弘、伊藤誠一 地方病型牛白血病の血清学のおよび遺伝子学的検討 平成 22 年度関東・東京合同地区獣医師大会日本獣医公衆衛生学会、宇都宮、2010 年 9 月 12 日（日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

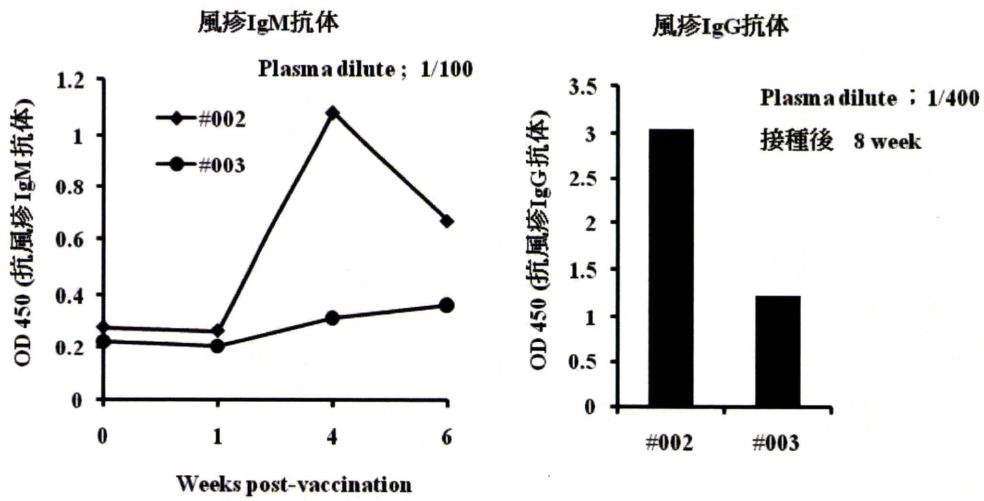


図1. 風疹ワクチンを接種したカニクイザルの抗風疹IgMおよびIgG抗体

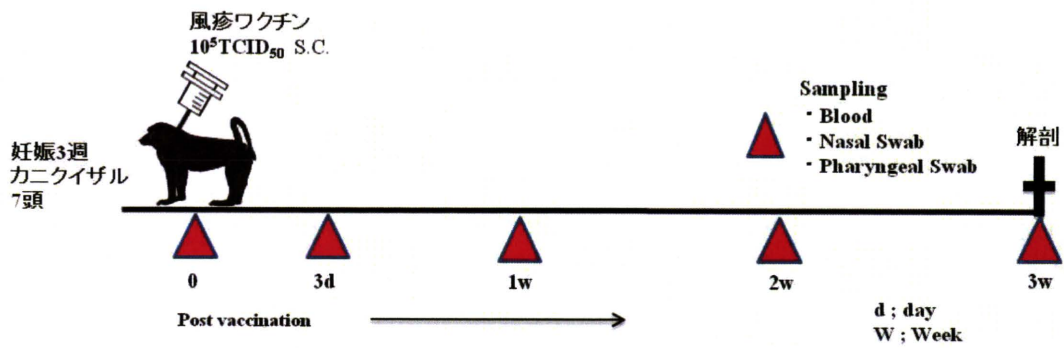


図2. 妊娠カニクイザルを用いた風疹ワクチン接種スケジュール

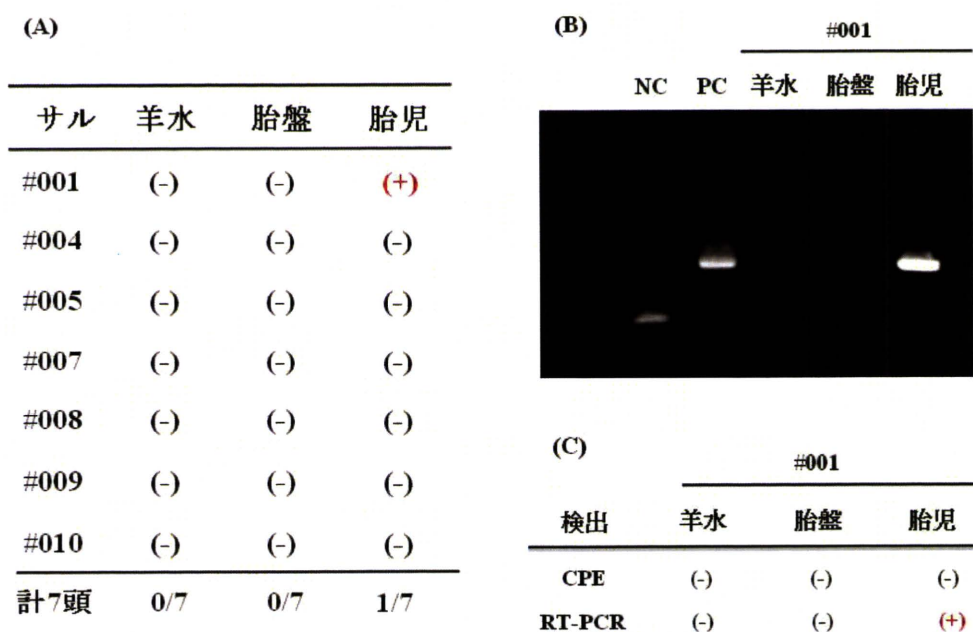


図3. 風疹ワクチンを接種した妊娠カニクイザルの胎児感染の検討(A)。胎児感染の認められた#001のPCRの写真(B)、RK-13細胞株を用いた#001ウイルス分離の結果(C)

サルNo.	Sample	Post vaccination				
		0 d	3 d	1w	2w	3w
#001	PBMC	(-)	(+)	(+)	(+)	N.D.
	鼻汁Swab	(-)	(-)	(-)	(+)	N.D.
	咽頭Swab	(-)	(-)	(-)	(-)	N.D.
#004	PBMC	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	鼻汁Swab	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	咽頭Swab	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
#005	PBMC	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	鼻汁Swab	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
	咽頭Swab	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
#007	PBMC	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	鼻汁Swab	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	咽頭Swab	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

図4. 風疹ワクチンを接種後の妊娠カニクイザルPBMC、鼻汁および咽頭Swabを用いたウイルス遺伝子の検出

妊娠カニクイザル No.

	#001	#004	#005	#007
下顎リンパ節	(-)	(+)	(+)	(+)
縦隔リンパ節	(-)	(+)	(+)	(-)
腋窩リンパ節	(-)	(+)	(+)	(-)
腸間膜リンパ節	(-)	(+)	(+)	(-)
肺	(+)	(-)	(-)	(-)
肝臓	(-)	(-)	(-)	(-)
脾臓	(-)	(+)	(-)	(-)
腎	(-)	(-)	(-)	(-)
皮膚	N.D	(+)	(-)	(-)

図5. 風疹ワクチン接種妊娠カニクイザルのワクチン生体内分布

疾患モデルマウスの生殖工学手法の最適化に関する研究

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 研究リーダー

研究要旨

繁殖能力が低く系統維持が困難な、難病指定の急速進行性糸球体腎炎モデルマウス（SCG マウス）を繁殖学的特性に基づいて系統維持し、体外受精は困難であったが自然交配由来の胚を凍結-融解-胚移植して産仔を得ることに成功し、産仔の病態発現を確認することができ、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクからの供給体制を整備した。

A. 研究目的

医薬基盤研究所疾患モデル小動物研究室では、難病を始めとした疾患研究や創薬への支援を目的に、実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に資源の収集・保存・提供・情報発信などを行っている。これらの疾患モデルマウスの中には繁殖が困難なマウスも多く、貴重な研究資源を安定的に供給する体制を整備するためには、病態や繁殖特性に応じた繁殖法の改良が必要である。とくに、本研究では、繁殖が困難な疾患モデルマウスにおいて系統保存法として常用されている体外受精、胚・精子凍結、胚移植による産仔作出という一連の生殖工学技術の開発を行い、良質のマウスの供給体制の整備を行うことを目的とする。本研究によって、実験動物研究資源バンクから各種疾患モデル動物が安定的に供給されることで、創薬研究や難病の治療法開発が推進されるとともに、周産期疾患の解明や不妊治療への応用にも繋がると期待される。

本年度は、難病指定の急速進行性糸球体腎炎の唯一のモデルマウスである SCG/ThpNkc マウス（通称 SCG/Kj、SCG）を研究対象とした。SCG マウスは自然発症モデルで、発症が早く、腎病理組織所見により系統の選抜を行う必要があるなどのために、繁殖・維持には困難が伴う。すなわち SCG マウスでは、半月体形成性糸球体腎炎及び ANCA（抗好中球細胞質抗体）関連血管炎を発症するが、糸球体における半月体形成については、生後 10 週頃から始まり、3.5 ヶ月齢（ピーク時）で発症率は雌 58.3%、雄 34.4%と報告されている。先行して起こる ANCA 関連血管炎は生後 6 週齢頃から発症し、12 週の頃には発症率は 80-100%に達するとされている。そこで私達は、SCG マウスの繁殖学的特性に基づいて系統維持を行い、さらに体外受精、胚凍結、胚移植などの生殖工学技術を応用するとともに、それらの技術によって得られた産仔の病態発現を確認し、SCG マウスの実験動物研究資源バンクからの供給体制の整備を目指した。

B. 研究方法

SCG マウスは、早期に糸球体腎炎及び血管炎を発症する個体がいるために、生後 6 週齢で交配を開始し、出産後に尿検査（潜血と蛋白）を行い、おおむね 100 日前後で解剖・採材した。早期に死亡する個体についても状態の良いものは採材した。常法により、各臓器をホルマリン固定、切り出し、パラフィン包埋、薄切の後、H. E. 染色を行い、病理標本作製・病理組織検査を行った。腎臓における半月体形成と血管炎の有無に注目して病理判定を行った。また、常法に従って体外受精や自然交配によって採取した胚を凍結または移植し、産仔の発症状況及び繁殖成績を比較した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

実験動物研究資源バンクへの寄託を受けた SCG 第 1 世代については、半月体形成率 41.7%（雌雄合計、以下同じ）、血管炎の発症率 66.7%であった。第 2 世代以降では半月体形成率 45.7%、血管炎発症率 80.0%であり、当研究室の飼育条件においても既報と同様の発症率が維持されていることが確認できた。血管炎については、雌雄差が大きく、雄よりも雌の方が 1.5~2 倍も発症していた。繁殖成績は、第 1 世代の平均産子数 8.3 匹、離乳率 57.6%、第 2 世代以降の平均産子数 6.2 匹、離乳率 63.6%で、産仔数がやや低下傾向を示した。体外受精によって作出した 2 細胞期胚の胚凍結-融解-移植については 2 回行ったが、産仔が得られなかった。そこで、自然交配で得られた胚を新鮮なまま、あるいは凍結融解後に移植することを試みたところ、産仔が得られた。得られたマウスを交配し、産子を得た後に親の病理診断を行ったが、凍結前と同程度の発症率を得た。上記の結果から、当バンクにおける SCG マウスの継代維持方法を確立することができ、胚凍結やレシピエント（ICR 等）への

移植によっても急速進行性糸球体腎炎モデルとしての特性が保持されていることが分かった。

D. 考察

SCG マウスの発症は、早い個体では6週齢頃と比較的早期であることから、交配を6週齢という若齢から開始することが系統維持には効果的であった。世代が進むに従い産仔数がやや減少傾向を示したが、発症率は維持されており、当バンクにおいて疾患モデルとしての特性を保持しつつ生体で繁殖維持することができた。一方、体外受精由来胚を用いた場合、胚凍結-融解-移植による産仔作出は、現時点ではこの系統マウスでは困難であり、このマウスに応用可能な最適化された体外受精技術の開発が今後の課題である。また、自然交配由来胚については、とくに胚凍結を行った場合、産仔数が減少し、出産後、里子に付けるなどの工夫が必要なことが多かった。今後、胚凍結法についても更なる改良が必要であろう。実際に実験動物研究資源バンクから分譲する場合は、凍結胚を融解し、胚移植によって得られたマウスを交配させ、この親マウスの発症を確認してから仔マウスを提供することが必要である。従って、他の系統に比べてかなり多くの凍結胚由来の産仔を得て、交配ペアを準備する必要がある。以上のように、今後改良すべき点もあるが、SCG マウスの継代維持方法を確立し、実験動物研究資源バンクからの供給を可能とすることができた。

E. 結論

繁殖能力が低く系統維持が困難な、難病指定の急速進行性糸球体腎炎モデルマウス (SCG マウス) を繁殖学的特性に基づいて系統維持し、体外受精は困難であったが自然交配由来の胚を凍結-融解-胚移植して産仔を得ることに成功し、産仔の病態発現を確認することができ、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクからの供給体制を整備した。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. *Exp Anim* in press, 2011.
- 2) Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni AB, Furukawa K, Ishii S. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human

{alpha}1,4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem.* 2011 Feb;149(2):161-170.

2. 学会発表

- 1) 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎. マウス排卵誘起における hCG の血中動態. 第 57 回日本実験動物学会総会. 2010 年 5 月 12 日~14 日、京都.
- 2) Matsuda J. *Animal Models of Lysosomal Diseases. Yonago International Symposium: Chaperone Therapy Update.* (シャペロン療法国際シンポジウム) July 29, 2010. Yonago.
- 3) 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎. シリアンハムスター卵巣凍結保存における卵巣サイズの影響. 第 103 回日本繁殖生物学会総会. 2010 年 9 月 2 日~4 日、十和田.
- 4) 小浦美奈子、島かおる、中村和臣、野口洋子、鈴木 治、鈴木和男、亀岡洋祐、松田潤一郎. 急速進行性糸球体腎炎モデル SCG/ThpNkc マウスの繁殖及び腎炎の発症状況について. 第 44 回日本実験動物技術者協会総会 2010 年 9 月 3, 4 日、旭川.
- 5) 中村和臣、小浦美奈子、野口洋子、鈴木治、松田潤一郎. BALB/c 凍結胚における個体復元率の改善. 第 44 回日本実験動物技術者協会総会 2010 年 9 月 3, 4 日、旭川.
- 6) 松田潤一郎、疾患モデル動物の現状と問題点. 第 8 回医療機器フォーラム-動物実験の最前線-疾患動物治療を用いる医療機器の有効性、安全性評価. 2010 年 10 月 15 日、東京.
- 7) 増井 徹、保富 康弘、川原 信夫、古江-楠田 美保、松田 潤一郎、小原 有弘、高橋 一朗、亀岡 洋祐、厚生労働省：創薬・医学研究用研究資源-薬用植物、医学実験用霊長類、遺伝子、培養細胞、実験動物-。BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) 2010 年 12 月 7~10 日、神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

不妊の機序解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者：鈴木 治（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 主任研究員

研究要旨

マウスの体外受精効率の系統差は、マウス増産の深刻な問題である。これまで体外受精系（培地組成など）の改良がなされてきたが、低繁殖系統の個体に対し採精・採卵以前にいわゆる不妊治療を検討した研究は稀である。そこで、本研究では各種ホルモン剤等の薬剤を体外受精前に個体に投与することにより、体外受精効率を向上させる方法を検討する。本年度は精子採取前に雄マウスへ徐放性ステロイド剤を留置し、その後の体外受精効率への影響を2系統（C57BL/6N系および129系）のマウスで検討・比較した。ステロイド剤投与は、体外受精率で若干の増加傾向がみられたものの、精巣および精巣上体アンドロジェン受容体量への効果はなく、投与量の検討が必要と思われた。一方、精巣アンドロジェン受容体量には系統差があり、受精能に影響している可能性が示唆された。

A. 研究目的

動物資源の増産・系統保存は配偶子の使用を前提とし、配偶子、特に卵子・胚の安定供給が必須である。マウスにおいては、誘起排卵卵子と精巣上体精子を用いた体外受精による胚作成が日常的に行われている。しかし、マウスの体外受精による受精率には大きな系統差がある（Suzuki et al. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8(6):975-980）。系統保存を実施する際には、様々な系統マウスを扱わねばならないため、系統差は深刻な問題である。

マウスでは卵子および精子、それぞれに体外受精能における系統差がある。精子の受精能の系統差は、特に形態異常との相関が指摘されており、所属研究室でも形態と受精率との相関について報告してきた（Kawai et al., 2006, *J Reprod Dev* 52(4):561-568）。こうした受精率の系統差を克服すべく、これまで体外受精培地組成の検討による体外受精の改良がなされてきたが、その方法には限界があると思われる。なぜなら、卵子や精子は、高度に分化した最終段階として産生される細胞であるため、産生後は系統差の要因が既に確定しており、産生後には

その性質を人為的に操作するのは困難と思われるからである。そこで、配偶子形成過程および成熟過程で何らかの手を加え、系統差が生じる原因を採卵・採精前に排除できれば、体外受精成績のさらなる向上が期待できると考えられる。しかし、現在のところ低繁殖系統のマウス個体に対し採卵・採精前にいわゆる不妊治療を検討した研究は稀である。

ヒト不妊治療においては内分泌的療法と非内分泌的療法がなされている。前者では、性腺刺激ホルモンや性ステロイドホルモン、またはそれらの拮抗薬により内分泌的環境を是正して妊娠に至らしめるものである。後者は、栄養的な補充（アミノ酸、ミネラルなど）や漢方薬などを用いて造精機能・造卵機構を補助する方法である。

そこで、本研究ではヒト不妊治療を参考に、各種ホルモン剤等の薬剤を配偶子採取前に個体に投与することにより、体外受精効率を向上させる方法を検討する。本年度では特に雄への影響に注目し、男性ホルモンを増強すると期待される Dehydroepiandrosterone (DHEA) の徐放性製剤の投与による体外受精能、精巣と精巣上

体アンドロゲン受容体 (AR) 量, および精巣プロテオームへの影響について調べた。

B. 研究方法

1) 徐放性ステロイド剤の投与

9 週齢の C57BL/6NCrSlc (B6 系) および 129X1/SvJmsSlc (129 系) の雄マウスに DHEA の徐放性製剤 (21 日用, 総量 5 mg, Innovative Research of America), または, プラセボ (Placebo) を頸部皮下にイソフルラン麻酔下で専用の挿入用針 (trochar) にて挿入した。21 日後, 雄が 12 週齢に達した時点で体外受精に用いた。

2) 体外受精および胚培養

3 週齢の Slc:ICR 系雌マウスに PMSG (5 iu) を投与し, 48 時間後に hCG (5 iu) を投与して排卵を誘起した。hCG 投与の約 16 時間後にミネラルオイル (Sigma) で覆った TYH 培地 (三菱化学メディエンス) の小滴内へ卵管膨大部より卵子を採取した。精子は採卵 2 時間前に精巣上体尾部より採取し, TYH 培地にて 2 時間培養後, 卵子の入った小滴内へ 150 sperm/ μ L の濃度となるように添加した (媒精)。約 5 時間後, ミネラルオイルで覆った mW 培地 (三菱化学メディエンス) の小滴に胚を 3 回移すことによって洗浄し, ミネラルオイルで覆った mW 培地の小滴にて媒精後 96 時間まで培養した。

全ての培養は, 37°C のインキュベーター内に静置した密閉容器 (Modular incubator chamber, Billups-Rothenberg) 内にて, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ の気相下で行った。

媒精後 24 時間後の 2 細胞期への発生率を受精率, 媒精後 96 時間後の桑実期もしくは胚盤胞期への到達率を体外発生率とした。

3) AR 蛋白質の定量

採精時に精巣と精巣上体を採取し, 使用時まで Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 内で冷蔵保存した。個体毎に各臓器から ReadyPrep™ protein extraction kit (Total Protein 用, Bio-Rad) を用いて蛋白質を抽出し, AR 蛋白質の定量 Western blot 解析を行った。抽出した蛋白質 (約 3 μ g) を 4-12% NuPAGE® Bis-Tris ゲルと NuPAGE® MES SDS ランニングバッファー

(Invitrogen) による SDS-PAGE の後, PVDF 膜 (Pall) へ転写し, 一次抗体として抗 AR 抗体 (1:10,000, Millipore, ウサギポリクローナル抗体) と抗 GAPDH 抗体 (1:50,000, Millipore, マウスモノクローナル抗体) を, 二次抗体として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 抗体 (1:10,000, Vector Laboratories) および Peroxidase ラベル抗マウス IgG 抗体 (1:10,000, Jackson ImmunoResearch) を用いて免疫染色を行った。視覚化には化学発光 (ECL plus, GE) を用い, CCD カメラ (LAS3000-Multi, Fujifilm) にて発光像を記録し, 各バンドの発光強度を測定した (Multigauge ソフトウェア, Fujifilm)。各サンプルの AR と GAPDH のバンドの発光強度を元に, GAPDH を内部標準として各個体の AR 蛋白質量を「AR / GAPDH 比」として求めた。

4) 精巣蛋白質の 2 次元電気泳動

ReadyPrep™ protein extraction kit (Total Protein 用, Bio-Rad) を用いて抽出した精巣蛋白質 (約 100 μ g) を pH 範囲 3-10 の等電点電気泳動の後, 4-12% NuPAGE® BisTris ゲルと NuPAGE® MES SDS ランニングバッファー (Invitrogen) による SDS-PAGE を行い, SyproRuby 染色の後, レーザースキャナー (FX-Pro, Bio-Rad) にて二次元電気泳動像を撮影した。

5) 統計処理

DHEA 投与の有無による受精率, 体外発生率への効果については角度変換後, 供試卵子数で重み付けをした分散分析により同一系統内で比較した。精巣および精巣上体 AR 発現量の有意差については二要因分散分析 (系統間と DHEA 投与の有無) により判定した。p<0.05 を有意とした。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は, (独) 医薬基盤研究所の動物実験規定に従い, 実験計画の承認を得て実施した (承認番号: DS22-54)。

C. 研究結果

1) DHEA の体外受精への影響

B6 系では受精率に, 129 系では胚盤胞形成率に若干の上昇傾向が見られたが, 受精率, 体

外発生率は両系統とも DHEA 投与の有無の間で有意差はなかった (図 1)。

2) AR 蛋白質の発現比較

精巣における AR 蛋白質量は, DHEA 投与の有無では有意差がなかったが, B6 系マウスの方が 129 系より有意に高かった (図 2)。

一方, 精巣上体における AR 蛋白質量は系統間, DHEA 投与の有無の間のどちらも有意差は見られなかった (図 3)。

3) 精巣プロテオーム比較

精巣蛋白質の 2 次元電気泳動像を比較したところ, DHEA の有無でスポットの分布に基本的に大きな差異はないようであるが, B6 系で placebo 投与群に比べ DHEA 投与群で明らかに増加するスポットが 1 つ見られた (図 4)。129 系については, そうした明確な差次的スポットは見られなかった (図 5)。

D. 考察

DHEA は, 南米の山芋から発見された栄養素で, その後の研究から哺乳動物の体内でもコレステロールより産生され, 代謝により雄では主にテストステロン, 雌では主にエストロジェンとなる物質である。それゆえ, DHEA 投与によって男性ホルモンであるテストステロンを増強することにより, 雄の繁殖性向上が望めるのではと考え, 本実験で試用してみた。なお, 採精時の雄の血清テストステロン濃度の ELISA による測定も試みたが, 溶血等の影響で正確には測れなかった。あくまでも参考値だが, Placebo 群は 100~150 pg/mL 程度, DHEA 投与群は 200~250 pg/mL 程度であった。

DHEA による雄マウスの体外受精能の向上効果は微妙なものであった (有意差は見られなかった)。若干の向上傾向は見られるので, DHEA の投与量の検討が必要と思われる。既報のように系統差の影響が大きく (B6 のほうが 129 よりも高率; 図 1), その系統差を変えうるほどの影響力は DHEA には無いようである。そもそもの系統差の原因として, B6 の方が 129 より精巣 AR 量が多く, (図 2), 精巣上体では差がなく (図 3), さらに B6 では DHEA に反応する精巣蛋白質の存在が示唆されるが (図

4), 129 系ではその蛋白質の存在が不明瞭である (図 5) ことから, 精巣, すなわち精子形成過程での男性ホルモンの利用のされ方に系統差があることが示唆された。

これまでは, 精子の体外受精能のマウス系統差は形態との関係が注目されてきたが, それ以外にステロイドホルモンの作用の系統差にも目を向けるべきと考えさせられるデータが得られたことは非常に興味深い。この着目点は, ヒト臨床でも注目すべきであろう。

E. 結論

本研究の結果から, DHEA による雄マウスの体外受精能の向上は有望だが, 用量などの検討が必須であることがわかった。なお, 精巣のアンドロジェン受容体の発現量やその作用の強さが受精能に影響する可能性も示唆され, この観点からマウスの系統を検索すると, 体外受精能を支配する機序の一つが明らかになると思われる。今後の課題として重要であろう。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. [Suzuki O](#), Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. *Exp. Anim.* (2011) 60(2) in press.

2) 学会発表

1. [Suzuki O](#), Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Sequence analysis of type VI collagen subunits in cardiomyopathic hamster hearts. *Experimental Biology 2010, Anaheim, CA, USA* (実験生物学 2010、2010 年 4 月 24 日~28 日)
2. [鈴木 治](#), 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎「マウス排卵誘起における hCG の血中動態」 第 57 回日本実験動物学会総会, 京都市, 2010 年 5 月 12 日~14 日
3. [Suzuki O](#), Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Heart

miRNA cloning in cardiomyopathic (J2N-k) and normal (J2N-n) Syrian hamsters.

GENETICS 2010: Model Organisms to Human Biology meeting, Boston, MA, USA (遺伝学 2010 ミーティング: モデル生物からヒト生物学へ, 2010 年 6 月 12 日~15 日)

4. 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田内尾こずえ、松田潤一郎「シリアンハムスター卵巣凍結保存における卵巣サイズの影響」 第 103 回日本繁殖生物学会総会、十和田市、2010 年 9 月 2 日~4 日
5. 小浦美奈子、島かおる、中村和臣、野口洋子、鈴木 治、鈴木和男、亀岡洋祐、松田潤一郎。急速進行性糸球体腎炎モデル SCG/ThpNkc マウスの繁殖及び腎炎の発症状況について。 第 44 回日本実験動物技術者協会総会、旭川 2010 年 9 月 3,4 日。
6. 中村和臣、小浦美奈子、野口洋子、鈴木 治、松田潤一郎。 BALB/c 凍結胚における個体復元率の改善。 第 44 回日本実験動物技術者協会総会、旭川、2010 年 9 月 3,4 日
7. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. O-GlcNAcylation of heart proteins in cardiomyopathic (J2N-k) and normal (J2N-n)

Syrian hamsters. 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Atlanta, GA, USA (第 61 回アメリカ実験動物学会年次総会, 2010 年 10 月 10 日~14 日)

8. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Elevated O-GlcNAcylation of heart proteins in cardiomyopathic transgenic mice with St3gal2 transgene. 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Philadelphia, PA, USA (第 50 回アメリカ細胞生物学会年次総会、2010 年 12 月 11 日~15 日)
9. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Effect of ovarian size on the viability of cryopreserved Syrian hamster ovaries. 37th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Orland, FL, USA. (第 37 回国際胚移植学会年次総会、オーランド、2011 年 1 月 8 日~12 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

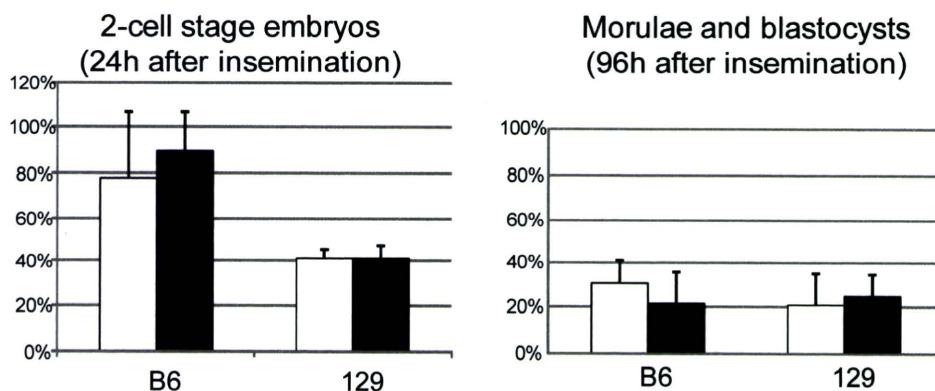


図 1. C57BL/6NCrSlc (B6) と 129X1/SvJmsSlc (129) の精巣上体精子を用いた体外受精成績 (平均±標準偏差, n=4)。placebo 群 (□) は全く DHEA を含まない徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より、DHEA 群 (■) は総量 5 mg の DHEA 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より得た精子で体外受精を行った。媒精後 24 時間での 2 細胞期への発生率 (受精率)、媒精後 96 時間での桑実胚と胚盤胞への発生率 (体外発生率) を求めた。どちらの系統でも、受精率、体外発生率について DHEA の有無で有意差はなかった (角度変換後、供試卵子数で重み付けした 1 要因分散分析による)。

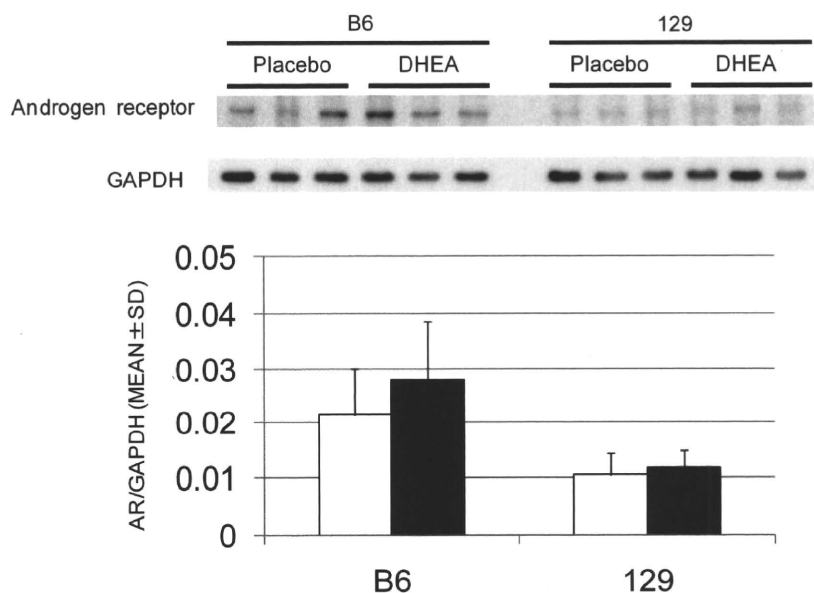


図2. 精巣 AR 蛋白質の定量 Western Blot 解析 (平均±標準偏差, n=3)。placebo 群 (□) は全く DHEA を含まない徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より, DHEA 群(■)は総量 5 mg の DHEA 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より得た精巣から蛋白質を抽出した。系統間に有意差があったが, DHEA 処理の有無の間には有意差はなかった (2 要因分散分析による)。

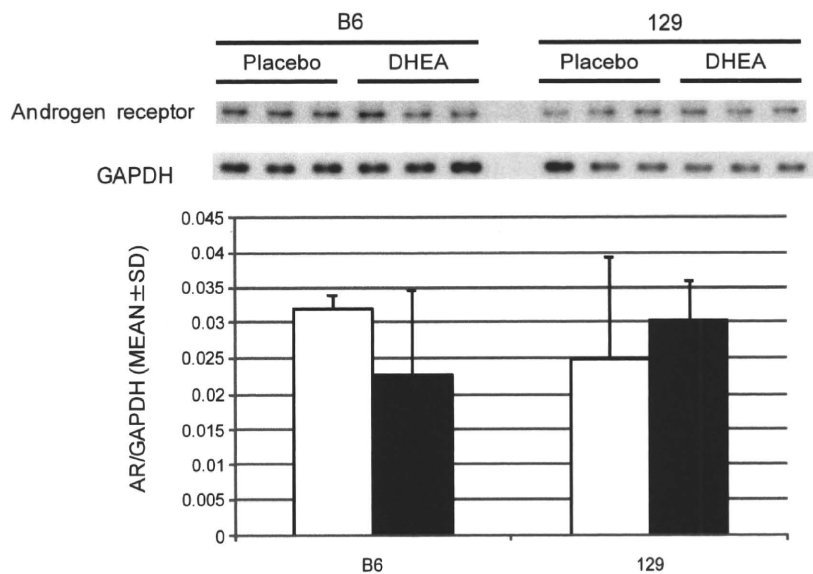


図3. 精巣上体 AR 蛋白質の定量 Western Blot 解析 (平均±標準偏差, n=3)。placebo 群 (□) は全く DHEA を含まない徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より, DHEA 群(■)は総量 5 mg の DHEA 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より得た精巣上体から蛋白質を抽出した。系統間, DHEA 処理の有無の間とも有意差はなかった (2 要因分散分析による)。

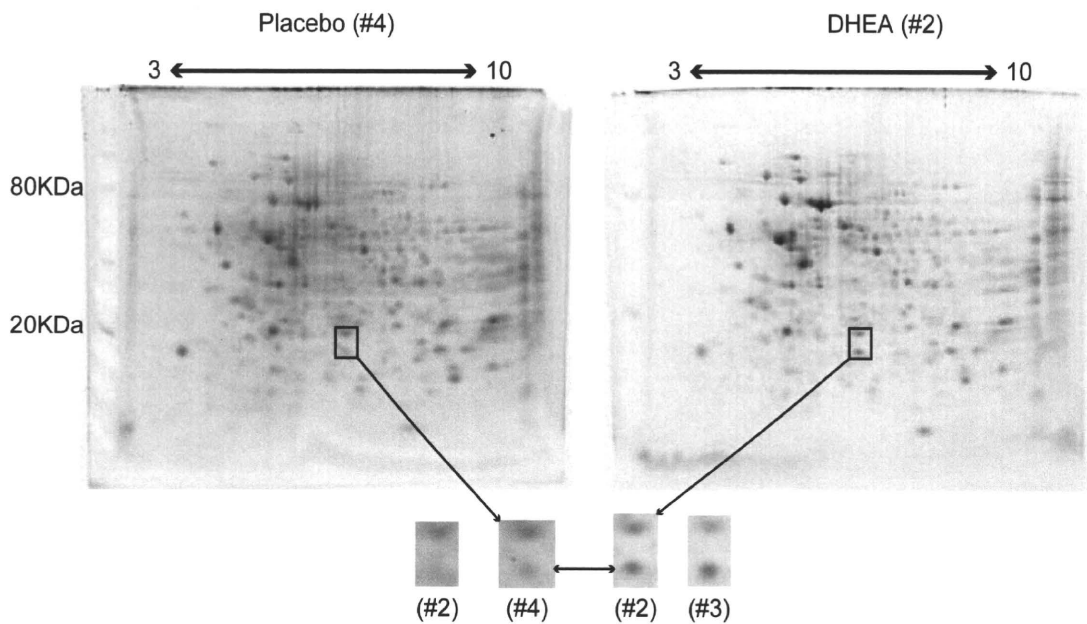


図4. B6系マウスの精巣プロテオーム比較。左が Placebo 投与個体で右は DHEA 投与個体(#は個体番号)。1次元目は pH3-10 の等電点電気泳動 (横方向)。2次元目は 4-12% Bis-Tris ゲルと MES SDS ランニングバッファーによる SDS-PAGE (縦方向)。pI7 付近で 15kDa のスポットが placebo 群に比べ DHEA 群で濃かった(周囲のスポット, 特に 20kDa のスポットを基準に比較;各群 2 個体分の拡大図も下段に示した)。

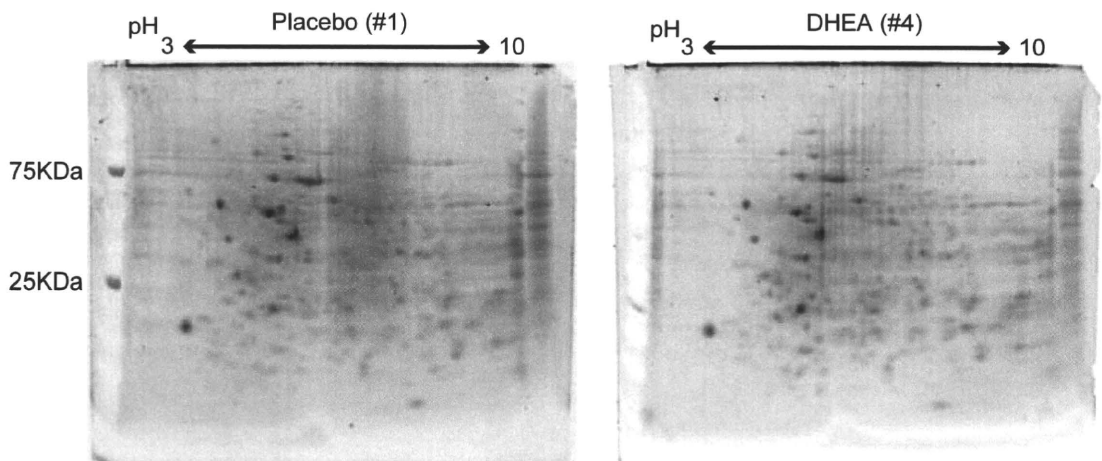


図5. 129系マウスの精巣プロテオーム比較。左が placebo 投与個体で右は DHEA 投与個体(#は個体番号)。1次元目は pH3-10 の等電点電気泳動 (横方向)。2次元目は 4-12% Bis-Tris ゲルと MES SDS バッファーによる SDS-PAGE (縦方向)。B6 系マウスで見られた差次的スポットは 129 系では不明瞭であった。

疾患モデルマウスの妊娠母体の病態解析と産仔の表現型への影響に関する研究

分担研究者： 内尾こずえ （独）医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究員

研究要旨

創薬・疾患研究推進のためには、ヒトに近い霊長類を用いることが重要であることは言うまでもないが、遺伝子改変マウス等を利用した基礎的解析データも大いに貢献することが広く知られている。マウスを用いる利点は、遺伝的に均一な標準系統が多く存在すること、発生工学的手法が利用可能、良好な繁殖効率、短い妊娠期間など汎用性が高いことである。本研究において周産期疾患病態解明のため、疾患モデルマウス妊娠期の病態を解析し、産仔への影響および発現型を明らかにする。本研究での成果は、霊長類を用いた研究の一助となるとともにヒト周産期疾患の病態解明に貢献する。

A.研究目的

近年、発生工学的手法が発展し、マウスは凍結胚保存、凍結胚の融解・移植を経て生体を安定的に得る技術が確立されている。しかしながら体外受精、胚培養および胚移植レシピエント雌マウスの母体環境が産仔の表現型に影響を及ぼすことが示唆されており、特に疾患モデルマウスの場合、自然交配であっても母体の病態進行レベルが産仔の表現型に影響を及ぼすことが知られている。

多くの難病は、不妊や妊娠・出産のリスクについて考慮する必要がある。例えば難病である全身性エリテマトーデス（SLE）は圧倒的に女性に多い疾患であり（男女比1:9）、出産可能な年齢で発症することが多い。子供へのSLE発症リスクへの影響につ

いても正確なデータが存在しないのが現状である。他の疾患についても同様に、妊娠・出産による母体の病態進行・母体疾患が子供の表現型にどのように影響するのか、未だ解明されていない。

今年度、難病の一つである難治性ネフローゼ症候群について検討を行う。ネフローゼは腎不全に至ると透析・腎移植といった負担の大きな治療に依存することになる重篤な疾患であるが、病態進行機序が明らかになっておらず、さらには妊娠・出産が疾患に与える影響についても不明な点が多い。また実験動物を用いた研究で妊娠中の母体に低タンパク飼料を摂取させるとその産仔の腎ネフロン数が減少することがわかっており、母体の栄養状態が産仔の腎機能に大きく影響することが示唆されている。そこ

で母体のネフローゼが産仔腎機能にどのように影響するのか精査するため、医薬基盤研究所にて維持しているネフローゼモデルマウス (ICGN 系統) を用いて、母体病態が産仔表現型に及ぼす影響および妊娠・出産による母体腎疾患病態進行について精査した。

B.研究方法

<供試動物>

自然発症ネフローゼモデルマウス：医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにて維持している ICGN 系統を利用した。

正常マウス：日本クレアより ICR 系統を購入した。

<体外受精・胚移植・産仔の解析>

体外受精により作製した ICGN マウス 2 細胞期胚をガラス化法 (EFS 法) にて凍結保存した。融解した ICGN 胚を偽妊娠雌性 ICR マウス (n=4) および ICGN マウス (n=4) 卵管に 20 個ずつ (右卵管に 10 個、左卵管に 10 個) 移植を行い、産仔を得た。ICR マウスから生まれた産仔を RG 群、ICGN マウスから生まれた産仔を GG 群とした。産仔は 12 週齢にて供試した。

<母体および産仔の血清生化学検査>

血清中のアルブミン (ALB)、クレアチニン (CRE)、グルコース (GLU)、コレステロール (CHO)、トリグリセライド (TG)、尿素窒素 (BUN)、アミラーゼ (AMY) を富士ドライケム 7000V にて測定した。

<RNA 抽出および Real Time PCR>

RG 群・GG 群・G 群の母体およびその産仔腎組織から total RNA を抽出後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems: ABI) を用いて、cDNA を合成した。TaqMan Gene Expression Assays (ABI) により細胞外マトリックス成分 (I 型コラーゲン・III 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ラミニン)、TGF- β 1、TNF- α の発現解析を行った。

<病理組織化学解析>

腎組織を 10%ホルマリンにて 24 時間固定後、パラフィン包埋した。3 μ m の切片を作製し、PAS 染色を行い、観察した。

C.研究結果

今年度はネフローゼ症候群に焦点を絞り、母体疾患および産仔の表現型について精査した。実験計画は図 1 に示したように、融解した ICGN 胚を偽妊娠雌性 ICR マウスおよび ICGN マウス卵管に移植を行い、産仔を得た。ICR マウスから生まれた産仔を RG 群、ICGN マウスから生まれた産仔を GG 群とした。

産仔数：胚移植により生まれた平均産仔数は RG 群 11.75 匹、GG 群 4.25 匹であった。産仔数に差があるのは、母体の body size に原因があると推察できる。RG 群の ICR マウスの平均体重が 39.39g であるのに対し、ICGN マウスは 26.14g である。また GG 群の産仔数は ICGN マウスの自然交配の産仔数と同等である。

母体の表現型：GG 群の親マウスである経産 ICGN マウスと同週齢の未經産 ICGN マウスとの病態を比較すると、同程度であり、妊娠・出産による顕著な病態進行は認められなかった。

産仔の表現型：以下の項目について解析した。

体重

3週齢および12週齢での体重測定した結果を表1に示した。3週齢時には、RG 群に比し、GG 群が低体重であったが、12週齢時にはほぼ同等となった。

血清生化学解析結果

産仔の血清生化学解析の結果を表2に示した。GG 群に比べ RG 群はアルブミンが低く、BUN・クレアチニンが高いことが分かった。

遺伝子発現解析

Real Time PCR により、腎における細胞外マトリックス成分（I型コラーゲン・III型コラーゲン、IV型コラーゲン、ラミニン）、TGF- β 1、TNF- α の発現解析を行った。その結果、細胞外マトリックス成分およびその産生亢進に関わる TGF- β 1は RG 群に比べ、GG 群が高発現であった。一方、炎症に関わる TNF- α は GG 群に比べ、RG 群の方が高発現であった。（図2）

病理組織化学解析結果

PAS 染色により RG 群は尿細管間質への炎症細胞の浸潤が重篤であること、一部の糸球体に半月体が観察された（図3）。

以上の結果から、母体のネフローゼが産

仔の腎病変進行に大きな影響を与えることが示唆された。

D.考察

今年度は難病の一つである難治性ネフローゼ症候群モデルマウス ICGN 系統を利用し、母体疾患が産仔表現型に与える影響および妊娠・出産による母体疾患の進行について検討を行った。融解した ICGN 胚を偽妊娠雌性 ICR マウスおよび ICGN マウス卵管に移植を行い、得た産仔 RG 群および GG 群の病態解析を行った結果、表現型に大きな差が認められた。血清生化学検査の結果、RG 群の方が低アルブミン、高クレアチニン、高 BUN であった。さらに病理検査の結果、RG 群において尿細管間質への炎症細胞浸潤、糸球体半月体の出現が認められたこと、ならびに遺伝子発現解析結果においても RG 群において TNF- α の発現が高く、炎症が進行していることがわかった。一方、GG 群は細胞外マトリックス成分の発現が亢進しており、線維症進行が顕著であった。GG 群は自然交配で維持している ICGN マウスの表現型と比較すると同傾向であったが、GG 群の方が線維化が急速に進んでいることが分かった。以上の結果より、産仔の genotype は同じであるにも関わらず、母体の違いが産仔の phenotype を変化させることがわかった。本研究においては、体外受精・胚移植といった手技が含まれており、胚培養によるエピジェネティックな変化も影響しているが、母胎環境・授乳によるエピジェネティックな変化が大き

く影響することが示唆された。驚くべきことに正常メスマウスから生まれた RG 群の病態がより重篤であった。ネフローゼ患者にとって高タンパク食摂取が腎に負担をかけることも知られており、今回の研究で用いた ICGN マウスにとって、正常メスマウスの母胎環境および母乳に含まれるタンパク量が過度であった可能性が考えられる。来年度以降、さらに解析を進めるとともに、他の疾患モデルマウスを用いた研究を行うことで、メカニズムの解明を目指したい。

E. 結論

ネフローゼマウスを用いた本研究により母体疾患が産仔の表現型に大きく影響することが明らかになった。今後、ネフローゼだけではなく様々な疾患について検討することが重要であり、小動物での精密な研究結果を蓄積することでヒト周産期疾患研究に貢献したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato N, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Fujisawa T, Rakugi H, Morishita R. Role of Insulin Signaling in the Interaction Between Alzheimer Disease and Diabetes Mellitus: A Missing Link to Therapeutic Potential. *Curr Aging Sci.* 2011 (印刷中)
2. Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T,

Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni AB, Furukawa K, Ishii S. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human $\{\alpha\}1,4$ -galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem.* 149(2): 161-170, 2011

3. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. Diabetes accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta desposition in Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(15): 7036-7041, 2010

2. 学会発表

1. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、楽木 宏実、森下 竜一 □ 「Diabetes accelerates memory dysfunction via cerebrovascular dysfunction in an Alzheimer mouse model with diabetes」 □ 第 18 回日本血管生物医学会学術集会、2010 年 12 月 3 日、大阪（口頭）
2. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、湯 久浩、守口 篤、楽木 宏実、森下 竜一 □ 「糖代謝が血中 β ・アミロイド蛋白 ($A\beta$) 量に与える影響の検討：アルツ

- ハイマー病の新規診断指標への応用」□
第 18 回日本血管生物医学会学術集会、
2010 年 12 月 2 日、大阪（ポスター）
3. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、
楽木 宏実、森下 竜一□「糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスにおける脳血管病態と脳内インスリンシグナルの変化」□第 29 回日本認知症学会総会、2010 年 11 月 5-6 日、名古屋（ポスター）
 4. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、
湯 久浩、守口 篤、楽木 宏実、森下 竜一□「全身糖代謝が血中 A β 値に与える影響とその診断的応用についての検討」□第 4 回関西中部認知症研究会、2010 年 9 月 18 日、大阪（口頭）
 5. 里 直行、武田 朱公、内尾・山田 こそえ、
楽木 宏実、森下 竜一□「アルツハイマー病と糖尿病の相互的病態修飾：Possible pathological interaction between diabetes mellitus and Alzheimer disease」□Neuro 2010（第 33 回日本神経科学大会）、2010 年 9 月 3 日、神戸（口頭）
 6. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、
篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一□「アルツハイマー病病態における血管性危険因子の役割：糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスの解析から：Role of vascular risk factors in the pathogenesis of Alzheimer disease: Analysis of novel mouse models of Alzheimer disease with diabetete」□Neuro 2010（第 33 回日本神経科学大会）、2010 年 9 月 2 日、神戸（口頭）
 7. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、
楽木 宏実、森下 竜一□「Mechanistic interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus」□第 1 回日本血管性認知障害研究会（VAS-COG Japan 2010）、2010 年 8 月 28 日、東京（口頭）
 8. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、
湯 久浩、守口 篤、楽木 宏実、森下 竜一□「Elevation of plasma A β level by glucose loading: possibility of diagnostic tool for Alzheimer disease」□第 1 回日本血管性認知障害研究会、2010 年 8 月 28 日、東京（口頭）
 9. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、
澤田 京子、國枝 孝典、篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一□「アルツハイマー病と糖尿病の相互的病態修飾機序の解明：糖尿病合併アルツハイマー病モデル動物の確立とその病態解析」□包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2010 年 7 月 29 日、札幌（ポスター）
 10. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、
澤田 京子、國枝 孝典、篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一□「全身糖代謝が血中アミロイド β 蛋白濃度に与える影響の検討：糖負荷後血中 A β 値の変動を利用した新たなアルツハイマー病診断指標の探索」□包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2010 年 7 月 29 日、札幌（ポスター）
 11. 武田 朱公、里 直行、内尾 こそえ、澤田 京子、國枝 孝典、篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一「糖尿病は脳血管障害と脳