

サンプル	妊娠カニクイザルNo.										
	#001	#004	#005	#007	#008	#009	#010	#012	#013	#014	#015
肺	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
肝臓	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
脾臓	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
腎臓	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
皮膚	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
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	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
鼠径部リンパ節	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)

(+); ウイルス遺伝子検出 (-); ウイルス遺伝子不検出

図4. 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

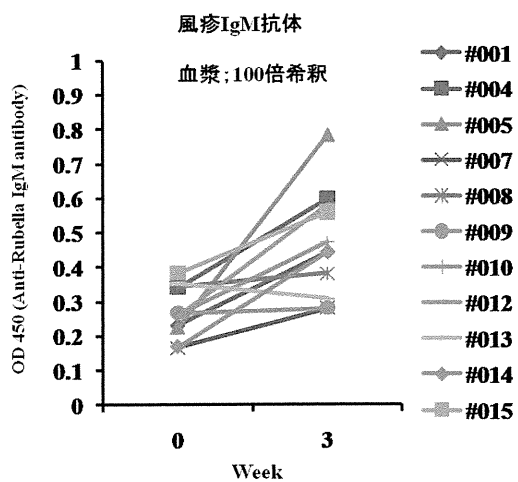


図5. ワクチンを接種した妊娠カニクイザルの免疫誘導

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

難病モデルを始めとする 60 系統の疾患モデルマウスについて、体外受精法を応用し、新鮮精子および凍結精子を用い、多くの系統で安定した技術を確立し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクから効率良く供給する体制を整備した。今後、一部の体外受精困難な系統の発生工学技術の開発を行う必要がある。

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り、ひいては国民の健康に貢献することが期待される。

昨年度は、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。その結果、繁殖能力が低い本系統を、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た。

本年度は、引き続き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として、実験動物研究資源バンクで保存・供給を行っている、60 系統の疾患モデルマウスについて、新鮮精子または凍結精子を用いた体外受精法を応用し、安定した保存技術の確立を目指した。

B. 研究方法

マウスは、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクに寄託もしくは保護預かりを依頼されたマウス 60 系統を用いた。

体外受精は次のように行った。同系統の雌マウス（C57BL/6、および BALB/c などブリーダー

より購入可能なマウスの場合は約 4 週齢を用いた。他の系統では利用可能な成熟雌マウスを用いた）に PMSG 5IU および hCG 5IU を 48 時間間隔で腹腔内投与し、hCG 投与 15 時間後に卵管膨大部より卵子を採取し、HTF 培養液 200 μ l 中に導入した。培養はすべて 5% CO₂、37°Cで行った。新鮮精子を用いる場合は、成熟雄 2 匹から精巢上体尾部精子を採取し、HTF 培養液 200 μ l 中に別々に加え、1-1.5 時間前培養し、濃度、活力の高い方を体外受精に用いた。前培養した精子懸濁液 3-5 μ l を採取した卵子に加えて媒精し、5 時間培養後、KSOM 培養液で 3 回洗浄し、KSOM 培養液中で翌日まで培養し、2 細胞期胚への発生率を体外受精率と見なした。精子凍結保存と融解は、R18S3 による常法により、FERTIUP 精子凍結保存液および FERTIUP 精子前培養培地を用いて行った。融解精子は、1 時間前培養後、精子懸濁液 10 μ l を上記と同様に卵子に加えて媒精し、培養後、2 細胞期への発生を観察した。なお、新鮮精子、凍結融解精子の媒精にあたっては、精子の死亡（不動）が多い場合や活力が弱く、濃度が低い場合は、媒精する精子量を適宜増やした。また、媒精後も受精状況を適宜観察し、卵丘細胞が十分に分散せず透明帯に強固に付着していたり、運動精子数が少ないと判断した場合は、その時点でさらに精子懸濁液を追加するなど、各系統マウスに最適化された媒精方法を適応した。

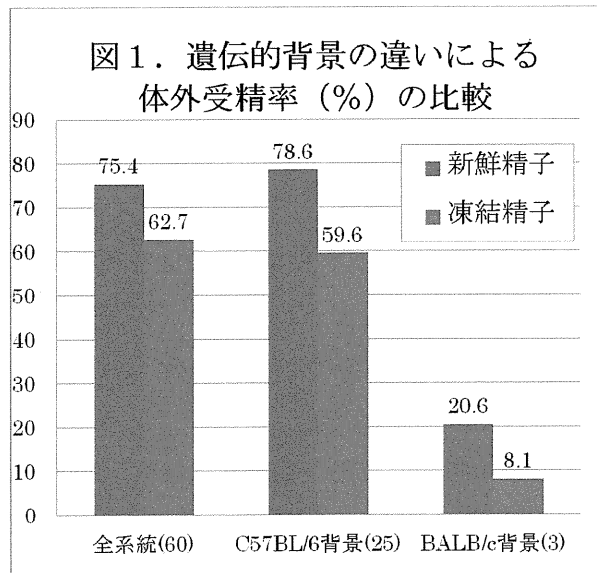
（倫理面への配慮）

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もしくは保護預かりを依頼された 60 系統の遺伝的背景系統は C57BL/6 が 25 系統で最も多く、BALB/c は 3 系統であった。その他 ICR、B6C3F1 などであった。全 60 系統において、新鮮精子を用いた場合の体外受精率は平均 75.4%であった。凍結-融解精子を用いた場合は平均 62.7%であり、約 13 ポイントの低下が見られた。60 系統のうち、C57BL/6

を遺伝的背景に持つ 25 系統においては、新鮮精子を用いた場合の体外受精率は平均 78.6%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均 69.6%であった。これは全体の平均とほぼ同じであった。一方、BALB/c を遺伝的背景に持つ 3 系統においては、新鮮精子を用いた場合の体外受精率は平均 20.6%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均 8.1%であり、非常に低い値を示した。(図 1. 参照)



D. 考察

現在、疾患モデルマウスの遺伝的背景系統として多用されている近交系は、C57BL/6 といわれており、実際に今回、我々の実験動物研究資源バンクに寄託や保護預かりの依頼があった 60 系統のうち、25 系統 (42%) が C57BL/6 であった。これら 25 系統のうち 1 系統を除いてすべて遺伝子改変動物 (ノックアウト、トランスジェニック等) であり、今回の我々の体外受精技術、精子凍結技術は、実用的なレベルであると考えられた。ただし、C57BL/6 背景の精子でも、系統によっては凍結-融解後に死骸が多く、塊となって絡まっていることがあったり、状態の悪いこともあるが、できるだけ生存精子のみを媒精に用いたり、精子量を適宜追加するなどの最適化が必要であった。また、雄については、約 18 か月齢であっても 91% の体外受精率が得られており、一方、9 週齢では 40% 程度に受精率が低下している例があった。このことから、個体差、系統差に十分配慮する必要があるとともに、より成熟した雄の利用が好ましいと考えられた。

系統数は少ないが BALB/c を遺伝的背景に持つ場合は、新鮮精子および凍結精子を用いた場合の体外受精率は C57BL/6 に比べてそれぞれ 58 ポイント、52 ポイント低下しており、非常に悪い成績であった。BALB/c 精子は、新鮮な精子でも生存精子が少なかったり、活力も悪い場合があ

り、媒精精子量を増加させても卵丘細胞が分散せずに透明帯に強く付着していることもあり成績は低かった。BALB/c を遺伝的背景とする以外の系統においても低受精率を示す系統は、異常卵や透明帯の膨化が頻繁に認められることもあり、低受精率の原因としては必ずしも精子側の問題ばかりではなく、卵子側の要素も検討すべきであろう。

今後、体外受精率の低い系統について、精子側、卵子側の要因についてさらに検討を加え、受精率の改善に向けた技術開発が必要であろう。さらに、体外受精によって得られた胚の凍結法や、実際に産仔を得るための胚移植法についても、各系統に最適化された発生工学手法の開発が期待される。以上、体外受精法を応用し、新鮮精子および凍結精子を用い、一部の系統を除く多くの系統で安定した技術を確立し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクから効率良く供給する体制を整備した。

E. 結論

難病モデルを始めとする 60 系統の疾患モデルマウスについて、体外受精法を応用し、新鮮精子および凍結精子を用い、多くの系統で安定した技術を確立し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクから効率良く供給する体制を整備した。今後、一部の体外受精困難な系統の発生工学技術の開発を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K. Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi- β -Valienamine on Murine GM1-Gangliosidosis. *Mol Genet Metab.* in press.
- 2) Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone h3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet.* Oct;7(10):e1002279, 2011.
- 3) Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 87(8):550-62, 2011.
- 4) Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai

T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. J Neurochem. 118(3):399-406, 2011.

- 5) Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Hum Mutat. 32(7):843-52, 2011.
- 6) 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. 60(2):193-6, 2011.

2. 学会発表

- 1) 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 - 第34回日本分子生物学会年会 横浜、2011年12月
- 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, 拡張型心筋症の動物モデル2種（マウスとハムスター）における心臓カルシニューリンの発現比較, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月
- 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, 雄への dehydroepiandrosterone 徐放剤投与がマウス体外受精へ及ぼす影響, 第104回日本繁殖生物学会大会, 盛岡, 2011年9月
- 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, シアル酸転移酵素過剰発現マウスの心筋症様心臓における Calreticulin の増加, 第58回日本実験動物学会総会, 東京, 2011年5月

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。本研究では各種ホルモン剤等の薬剤を事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している。昨年度の雄マウスに続いて本年度は、卵子採取前に 129X1 系雌マウスの皮下に徐放性ステロイド剤（Dehydroepiandrosterone、DHEA）を留置し、その後の体外受精率・胚発生率への影響を検討した。DHEA 投与は低用量（0.25 mg を 21 日間留置）で発生率に向上傾向がみられたものの高用量（1.5 と 5 mg）では抑制的であった。低用量でさらに用量の検討を行えば発生率向上が期待できると思われる。

A. 研究目的

動物資源の増産・系統保存には体外受精が汎用されるが、マウスの体外受精による受精率には大きな系統差があり（卵子：Suzuki et al. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8(6):975-980；精子：Kawai et al., 2006, *J Reprod Dev* 52(4):561-568）、深刻な問題となっている。

系統差の克服法として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。

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している。昨年度の雄への適用に続いて、本年度では雌への効果に注目し、昨年同様 Dehydroepiandrosterone (DHEA) の徐放性製剤の投与による卵子の体外受精能および体外発生能、血中ステロイド濃度、卵巣の各種ホルモン受容体発現量、および卵巣プロテオ-

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 129X1/SvJMsSlc (129X1 系) の雌マウスに DHEA の徐放性製剤 (21 日用, 総量 0.25, 1.5, および 5 mg, Innovative Research of America), または, 薬物量に対応したプラセボ (Placebo) を頸部皮下にイソフルラン麻酔下で専用の挿入用針にて挿入した。21 日後, これら雌を体外受精に用いた。

2) 体外受精および胚培養

体外受精用精子は採卵約 2 時間前に Slc:ICR 系雄マウス (12 週齢) の精巣上部尾部より採取し, TYH 培地 (三菱化学メディエンス) にて 1~2 時間培養後, ミネラルオイル (Sigma) で覆った TYH 培地小滴内へ 150 sperm/ μ L の濃度となるように添加した。DHEA もしくは Placebo 処置を施した雌マウスに 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。あらかじめ精子を投入した小滴内へ hCG 投与後約 16 時間に卵管膨大部より

卵子を採取した(この時点を媒精時刻とした)。約5時間後、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、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時間後の胚盤胞期への到達率を体外発生率とした。

3) 血中ステロイド濃度の測定

採卵時に得た血液から血漿を分離し、各群6匹のDHEA、プロジェステロン、テストステロン、エストラジオールの血漿中の濃度をEIAキット(Cayman Chemical)にて測定した。

4) 各種ホルモン受容体蛋白質の定量

採卵時に得た卵巣を使用時まで Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 内で冷蔵保存した。各実験群当たり4匹の卵巣から個体毎に ReadyPrep™ protein extraction kit (Total Protein 用, Bio-Rad) を用いて蛋白質を抽出し、各種ホルモン受容体の定量 Western blot 解析を行った。抽出した蛋白質(約1 µg)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FSHR抗体(1:10,000, 自家製ウサギ抗体)、抗AR抗体(1:1,000, Millipore, ウサギ抗体)、抗PR抗体(1:1,000, Epitomics, ウサギ抗体)、または抗ERα抗体(1:1,000, Santa Cruz, ウサギ抗体)と抗GAPDH抗体(1:100,000, Millipore, マウス抗体)を(略語は図4参照)、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軽鎖特異的抗体(1:100,000, 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)。全サンプルを等量混合した液を4段階の量でアプライして検量線を毎回作成し(検量線作成の詳細は文献3で報告)、各種ホルモン受容体とGAPDHのバンドの発光強度からGAPDHを内部標準としてホルモン受容体蛋白発現量を「受容体/GAPDH比」として求めた。

5) 卵巣蛋白質の2次元電気泳動

ReadyPrep™ protein extraction kit (Total Protein 用, Bio-Rad) を用いて抽出した卵巣蛋白質(約100 µg)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。

6) 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検討した。それら以外の数値の有意差についてはt検定(各用量毎にDHEA投与の有無で比較)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:DS23-40)。

C. 研究結果

1) DHEAの体外受精と胚発生への影響

受精率は調べた用量全てでPlacebo群に比べ有意差はなかった(図1A)。体外発生率は1.5 mg群で有意に低下したが、0.25 mg群ではDHEAによる発生率向上傾向が見られた

(図 1B)。卵巣重量, 体重, 卵巣体重には差異がなかったが, 1 匹当たりの平均排卵数は用量が増加すると有意に低下した (図 2)。

2) 血中ステロイド濃度への影響

Placebo 群に比べ DHEA 群は用量の上昇に伴い血中 DHEA 濃度が上昇する傾向があり (有意差なし), 血中テストステロン濃度は 1.5 mg 群と 5 mg 群で DHEA 群が有意に高かった。一方, 血中プロジェステロン濃度と血中エストラジオール濃度は DHEA 群と Placebo 群の間での用量でも有意差はなかった (図 3)。

3) 各種ホルモン受容体蛋白質発現への影響

総じて有意差が見られなかったが (図 4), FSHR の蛋白質発現量は全用量で Placebo 群より DHEA 群で高い傾向が見られた。ステロイド受容体は, 低用量の 0.25 mg 群のみ上昇傾向が見られた。

4) 卵巣プロテオームへの影響

採卵時の卵巣の二次元電気泳動像を比較したところ, 明確な差異はなかった (図 5)。

D. 考察

DHEA は代謝により雌では主にエストロゲンとなる物質である。それゆえ, DHEA 投与によって女性ホルモンであるエストロゲンを増強することにより, 雌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。

母体への DHEA 徐放剤投与による卵子の体外受精能の向上効果は微妙なものであった (図 1)。低用量で若干の向上傾向は見られるが, 高容量では抑制的であった。血中テストステロン増加が悪影響を及ぼした可能性がある (図 3B)。産婦人科領域では DHEA の 4 ヶ月, 75 mg/day の経口投与により妊娠率が上昇したとの報告がある (Barad ら, 2007 など)。これをヒトの体重が 50 kg として単純に今回の実験系 (21 日間徐放投与) へ換算すると約

0.8 mg / 21 days となることから, 本実験で用いた 5 mg や 1.5 mg ペレットは多すぎで, 0.25 mg ペレットは少なすぎる可能性がある。これらのことから DHEA 投与による繁殖性の向上効果は有望であるものの用量 (特に低用量での効果) を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究の結果からマウス母体への DHEA 投与による卵子の体外受精能・胚発生能の向上は低用量で有望だが, 高用量では抑制的であることがわかった。用量の検討が必須である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 87(8):550-562, 2011.
2. Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. PLoS Genet 7(10):e1002279, 2011.
3. 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. 60(2):193-196, 2011.

2) 学会発表

1. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Elevated O-GlcNAcylation of ATP synthase β subunits

in cardiomyopathic hearts in Syrian hamsters, Experimental Biology 2011, Washington, DC, USA, 2011 年 04 月

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, シアル酸転移酵素過剰発現マウスの心筋症様心臓における Calreticulin の増加, 第 58 回日本実験動物学会総会, 東京, 2011 年 5 月
3. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Sequence analysis of the ovarian Kiss1 cDNA in the Mongolian gerbil and Syrian hamster, ENDO 2011: The 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, Massachusetts, USA, 2011 年 6 月
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, 雄への dehydroepiandrosterone 徐放剤投与がマウス体外受精へ及ぼす影響, 第 104 回日本繁殖生物学会大会, 盛岡, 2011 年 9 月
5. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Increase of calreticulin in hearts of cardiomyopathic mice with sialyltransferase transgenes, 2011

AALAS National Meeting, San Diego, California, USA, 2011 年 10 月.

6. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Effects of dehydroepiandrosterone on androgen receptor protein expression in testes and epididymides in two strains of mice, 2011 annual meeting of the American Society for Cell Biology, Denver, Colorado, USA, 2011 年 12 月
7. **鈴木 治**, 小浦 美奈子, 野口 洋子, 山田-内尾 こずえ, 松田 潤一郎, 拡張型心筋症の動物モデル 2 種 (マウスとハムスター) における心臓カルシニューリンの発現比較, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月
8. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Effects of dehydroepiandrosterone on sperm fertilizability in vitro and testicular gene expression, 38th Annual Conference of the IETS, Phoenix, Arizona, USA, 2012 年 1 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

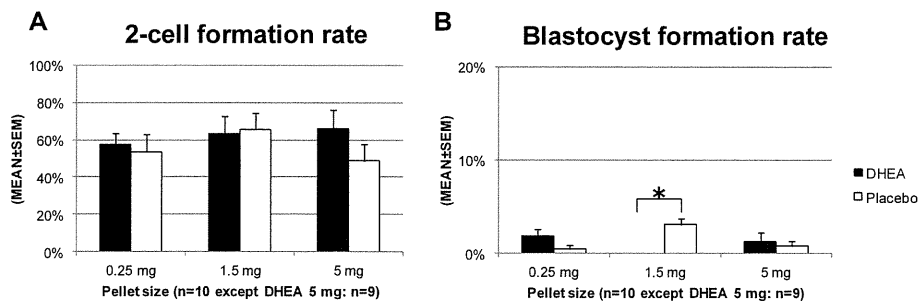


図 1. 129X1/SvJmsSlc の過排卵誘起卵子を用いた体外受精成績 (平均±標準誤差, n=10, DHEA 5 mg 群のみ n=9)。DHEA 群(■)は 0.25, 1.5, もしくは 5 mg の DHEA 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より, Placebo 群 (□) は全く DHEA を含まない同形同大の徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より得た卵子で体外受精を行った。媒精後 24 時間での 2 細胞期への発生率 (A, 受精率に相当), 媒精後 96 時間での胚盤胞への発生率 (B, 体外発生率に相当) を求めた。角度変換後, 供試卵子数で重み付けした 1 要因分散分析によると, 受精率については調べた用量全てで Placebo 群に比べ有意差はなかったが, 体外発生率については, 1.5 mg 群で有意に低下した ($p < 0.05$)。0.25 mg 群では DHEA による発生率向上傾向が見られた ($p \approx 0.11$)。

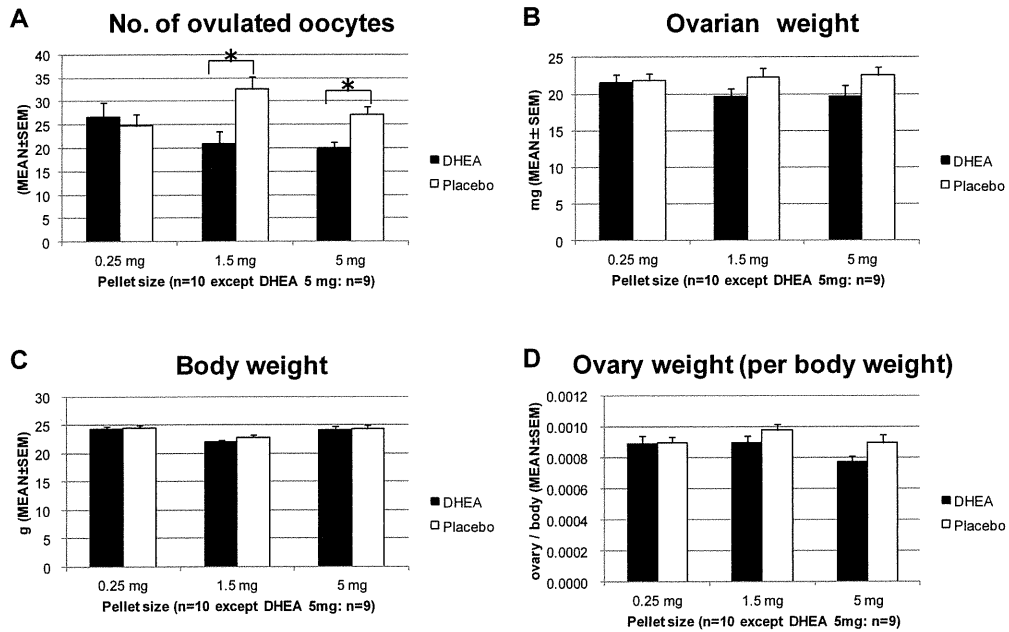


図 2. 1 匹当たりの平均排卵数 (A), 卵巣重量 (B), 体重 (C), および卵巣体重比 (平均±標準誤差, n=10, DHEA 5 mg 群のみ n=9)。DHEA 群(■)では 1.5 と 5 mg 群で Placebo 群 (□) に比べ有意に排卵数が低下した ($p < 0.05$)。卵巣重量, 体重, および卵巣体重比にはどの用量でも DHEA 群と Placebo 群との間で有意差はなかった。

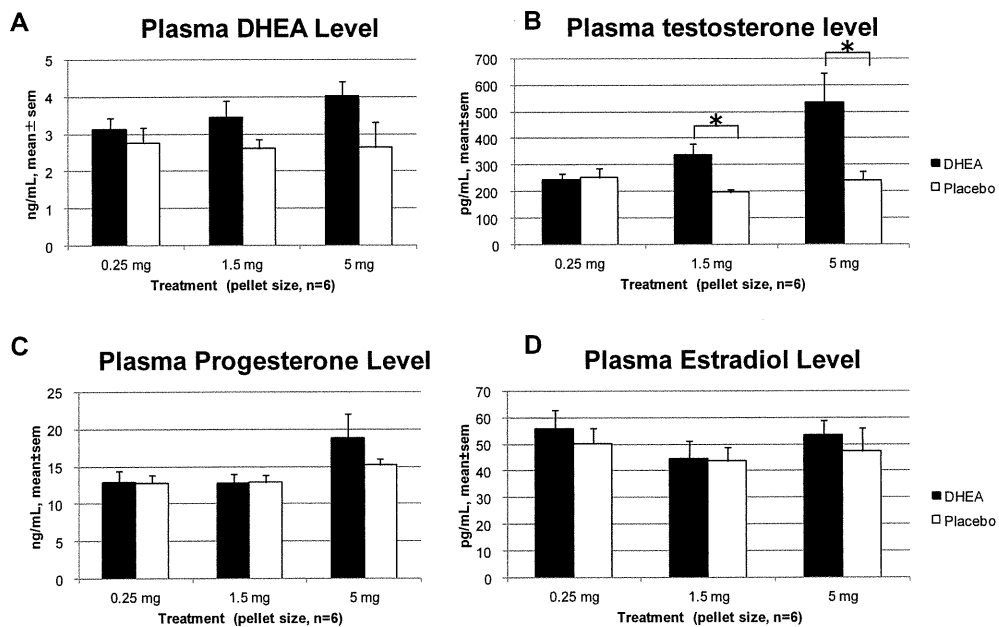


図 3. 採卵時の血中ホルモン濃度 (平均±標準誤差, n=6)。Placebo 群 (□) に比べ, DHEA 群(■)で用量の上昇に伴い血中 DHEA 濃度 (A) が上昇し (ただし, 有意差なし), 血中テストステロン濃度 (B) は 1.5 mg 群と 5 mg 群で DHEA 群が有意に高かった ($p < 0.05$)。血中プロジェステロン濃度 (C) と血中エストラジオール濃度 (D) は DHEA 群と Placebo 群の間でどの用量でも有意差はなかった。

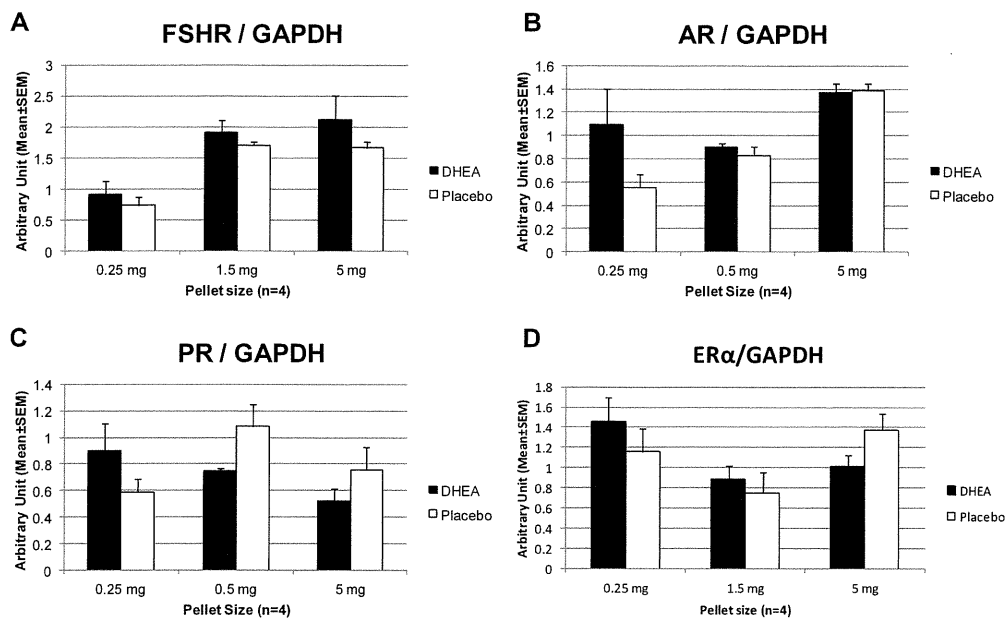


図 4. 採卵時の卵巣における各種ホルモン受容体の定量 Western Blot 解析 (平均±標準誤差, n=4)。総じて有意差は見られなかったが (t-検定), 卵胞刺激ホルモン受容体 (FSHR, グラフ A) の蛋白質発現量は, 全用量で Placebo 群 (□) より DHEA 群 (■) で高い傾向が見られた。アンドロゲン受容体 (AR, グラフ B) は, 0.25 mg 群のみ上昇傾向が見られた。プロゲステロン受容体 (PR, グラフ C) とエストロゲン α 受容体 (ER α , グラフ D) については, 0.25 mg 群で上昇傾向があるが, 用量の増加とともに抑制傾向が見られた。

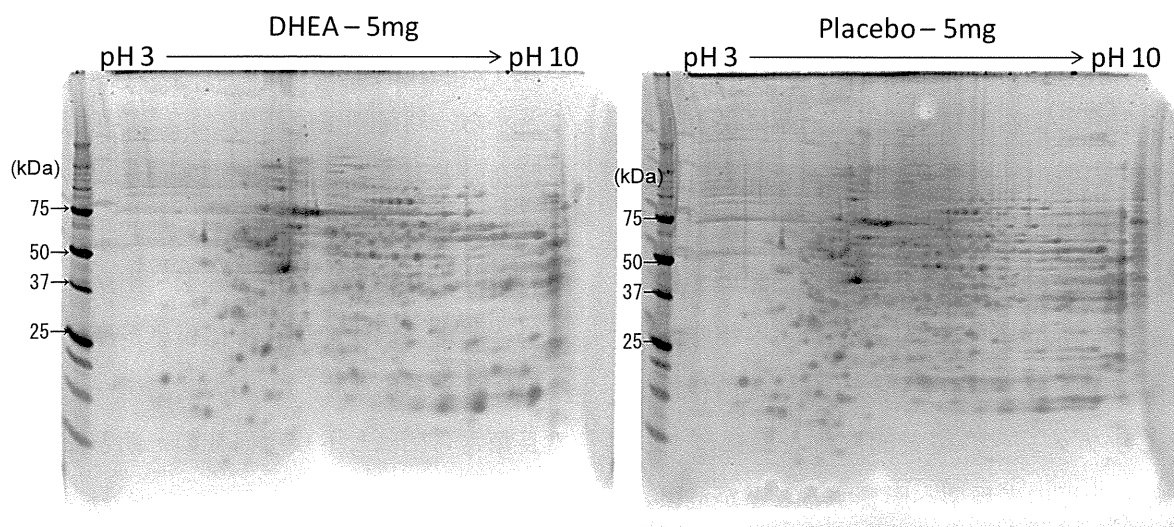


図 5. 5 mg 群の卵巣プロテオーム比較。左が DHEA 群由来で右は Placebo 群由来。各群 4 例ずつ行ったうちの 1 例ずつを示す。1 次元目は pH3-10 の等電点電気泳動 (横方向)。2 次元目は 4-12% Bis-Tris ゲルと MES SDS バッファーによる SDS-PAGE (縦方向)。明瞭な差次的スポットは見つけれなかった。分子量マーカーはプレジジョン Plus スタンダード (Bio-Rad)。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

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 難病・疾患資源研究部 研究員

研究要旨

周産期医療研究推進のため、ヒトに近い霊長類を利用することが必須であることは言うまでもないが、霊長類を用いた研究には多大な研究費、研究期間を要するため、並行して齧歯類を利用することが効率的である。特にマウスは遺伝的に均一な系統が多く存在すること、良好な繁殖効率、短い妊娠期間、遺伝子変化が容易等、汎用性が高いことが知られており、マウスを利用した基礎的データが霊長類さらにはヒト疾患解明へ大いに貢献することが知られている。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、母体疾患がどのように産仔表現型へ影響するのか明らかにする。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ことが期待される。

A.研究目的

疾患による不妊、妊娠・出産による母体疾患の悪化、母体疾患が産児に与える影響は問題となっているが、その機序については不明な点が多い。不妊治療においては、体外受精などの発生工学的手法が駆使され、解決されることが多いが、胚培養の行程によりゲノムへの後天的修飾をおよぼし、後々産児の表現型へ影響することが危惧されている。さらに母体疾患が産児にどのような影響をおよぼすかは不明な点が多く、詳細な解析を必要としている。

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

ことや様々な疾患モデルマウスが存在することから、周産期医療研究において利用価値が高いと考えられる。マウスを利用した体外受精をはじめとする発生工学的手法が産児に与える影響、さらに妊娠・出産による母体疾患の病態変化、母体疾患が産児表現型に与える影響についての基礎データは霊長類さらにはヒト疾患研究の一助となり得る。

そこで本研究では難治性疾患であるネフローゼモデルマウス（ICGN 系統）および全身性エリテマトーデス（SLE）モデルマウスである *lpr/lpr* 系統を用いて、不妊治療が産仔に与える影響、母体疾患が産仔表現型に及ぼす影響および妊娠・出産による母体

における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。

全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウス：C57BL/6J-lpr/lpr および正常コントロールである C57BL/6J を日本エスエルシーより購入した。

<ネフローゼマウス産仔の作出>

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 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 (ET 群)。また自然交配で ICGN マウス産仔を作出した (Control 群)。両群とも産仔は 12 週齢にて供試した。(図 1 参照)

<SLE マウス産仔の作出>

雌性 C57BL/6J-lpr/lpr (SLE モデル) および雌性 C57BL/6J-lpr/+ (正常マウス) と雄性 C57BL/6J-lpr/lpr を交配し、産仔を作出した。lpr (Fas) の genotyping を行い、C57BL/6J-lpr/lpr 産仔を供試した。SLE マウス由来の産仔を SLE 群、正常マウス由来の産仔を Normal 群とし、20 週齢のオス・メス、各群 8 匹ずつ供試した。(図 2 参照)

<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)、コレステロール(T-CHO)、尿素窒素 (BUN) を富士ドライケム 7000V にて測定した。

<抗 ds-DNA 抗体検査>

抗 ds-DNA 抗体検査キット (レビス) を用いて、SLE マウス血清中の抗 ds-DNA 抗体価を測定した。

<RNA 抽出および Real Time PCR>

ICGN マウス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 I 型コラーゲン、TGF- β 1、TNF- α 、MCP-1 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 染色およびシリウスレッド染色を行い、観察した。また ICGN マウスについては免疫染色にて myofibroblast マーカーである α -smooth muscle actin (ASMA) を検出し、線維化の進行度を確認した。

C.研究結果

今年度は不妊や流産のリスクが高い難治性疾患であるネフローゼ症候群および全身性エリテマトーデス(SLE)に焦点を絞り、不

妊治療や母体疾患が産仔表現型に与える影響について精査を行った。

まずネフローゼモデルを用い、不妊治療で実施される体外受精が産仔の表現型にどのように影響するのか検討した。動物実験計画は図1に示したように、体外受精により作製した ICGN マウス 2 細胞期胚を偽妊娠雌性 ICGN マウス卵管に移植を行って得た産仔 (ET 群) と自然交配により得られた産仔 (Control 群) の 12 週齢雄性マウスの表現型を比較した。

体重・腎重量：表1に示したように、体重は Control 群に比し、ET 群が重い傾向にあった。これは ET 群が腹水、全身性浮腫を呈していたことに起因すると考えられる。そのため腎重量/体重比は ET 群の方が低値となっている。

血清生化学検査：表2に示したように、血清中のアルブミン (Alb)、クレアチニン (CRE)、尿素窒素 (BUN)、コレステロール (T-CHO) を測定した結果、ET 群の方が低アルブミン血症、高 BUN、高脂血症の傾向にあり、ネフローゼの進行が加速していることが示唆された。

腎組織の Real Time PCR 解析：細胞外マトリックス成分である I 型コラーゲン (COL1)、コラーゲンの産生を亢進する増殖因子である TGF- β 1、炎症に関わるサイトカインである TNF- α 、同様に炎症に関与するケモカインである MCP-1 の発現解析を行った (図3)。Control 群に比し、ET 群の方が COL1、TGF- β 1 の産生が亢進していることがわかり、線維症が重篤化して

いることが示唆された。一方、炎症に関与する TNF- α についても ET 群の方が亢進していることがわかった。

病理組織化学解析：PAS 染色で観察すると ET 群、Control 群ともに炎症細胞の浸潤があるが、ET 群の方が浸潤の程度が重篤であり、病態進行の加速に深く関与していることが示唆された。一方、線維化に深く関わる myofibroblast マーカー α -smooth muscle actin の免疫染色を行ったところ、Control 群に比し、ET 群の方が染色されている尿細管間質細胞が多く、線維症がより進行した状態であることがわかった。これは炎症に関与するサイトカインの亢進、炎症細胞浸潤が一因となっている可能性があり、さらなる解析が必要である。

ネフローゼマウスの解析により、不妊治療で実施される体外受精が新生児の表現型、病態進行に密接に関係することが示唆された。

次に SLE マウスを用い、母体疾患が新生児表現型に与える影響について検討した。SLE マウスとして FAS に変異をもつ C57BL/6-lpr/lpr マウスを利用した。動物実験計画は図2に示したように、FAS 変異をホモで持つメス SLE マウスから産まれた産仔 (SLE 群) およびヘテロでもつ正常マウスから産まれた産仔 (Normal 群) を自然交配により作出した。どちらの群も FAS 変異をホモで持つ共通の遺伝子型の C57BL/6-lpr/lpr マウスである。20 週齢のオス・メス、各群 8 匹ずつ供試した。

体重・脾臓重量：体重は SLE 群の方が重い

傾向にあった。脾臓重量は雄性マウスについては、どちらの群とも同程度であったが、雌性マウスは SLE 群の方が優位に重い傾向があった。

血清生化学検査：Alb, BUN は 2 群間で差がなかった。一方、Cre は SLE 群の方が高い傾向にあり、若干腎機能が低下していることが示唆された。

抗核抗体解析：ELISA にて血清中の抗 dsDNA 抗体を測定した。Normal 群は dsDNA 抗体陰性であったが、SLE 群では陽性であり、特に雌性マウスの dsDNA 抗体価が高かった。自己免疫疾患には性ホルモンが深く関与しているため性差があり、特に SLE 等の自己免疫疾患に罹患する患者は 9 割以上、女性であることが知られている。

以上の SLE マウスを用いた研究結果から、母体疾患が産仔の病態進行に大きな影響を与えることが示唆された。

D. 考察

今年度は難治性疾患である難治性ネフローゼ症候群モデルマウス (ICGN 系統) および SLE モデルマウス (C57BL/6-lpr/lpr 系統) を利用し、不妊治療や母体疾患が産仔表現型に与える影響について検討を行った。

まず体外受精で作出した ICGN 胚を偽妊娠雌性 ICGN マウス卵管に移植を行い、得た産仔と自然交配で得た産仔の病態を比較した結果、表現型に大きな差が認められた。体外受精由来の産仔の方が炎症や線維症が

重篤化し、ネフローゼの進行が速いことが明らかとなった。このことは体外受精といった胚培養の行程を含むことで、エピジェネティックな変化が生じることを示唆している。難治性疾患による不妊の解決策として体外受精は有効な手法に変わりないが、新生児の表現型には注意を払う必要があると考えられる。

また母体疾患も産仔表現型に大きな影響をおよぼすファクターである。本年度は SLE モデルマウスを用いて、母体疾患が産仔にどのような影響を及ぼすのか検討を行ったところ、やはり母体疾患が産仔の病態進行を加速させることが明らかとなった。このことから妊娠・授乳期間に母体疾患を悪化させず、いかにコントロールするかが新生児の健康状態に重要であることが示唆された。

以上の結果より、産仔の遺伝子型は同じであるにも関わらず、不妊治療や母体疾患が産仔の表現型を変化させうることが明らかとなった。このことはエピジェネティックな変化が疾患の進行に大きく影響することを示唆している。来年度以降、さらに詳細な解析を進めるとともに、他の疾患モデルについても検討し、メカニズムの解明を目指したい。

E. 結論

ネフローゼマウスおよび SLE マウスを用いた本研究により不妊治療や母体疾患が産仔表現型に多大な影響を与える可能性が明らかとなった。今後、ネフローゼ・SLE

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霊長類を用いた研究への応用、ヒト周産期疾患研究の一助としたい。

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. *Current Aging Science*, 2011; 4(2): 118-127.
2. 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*. 2011; 60(2): 193-196.
3. Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1, 3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011; 87(8): 550-562.
4. Kumagai A, Horike N, Satoh Y, Uebi T, Sasaki T, Itoh Y, Hirata Y, Uchio-Yamada K, Kitagawa K, Uesato S,

Kawahara H, Takemori H, Nagaoka Y. A Potent Inhibitor of SIK2, 3, 3', 7-Trihydroxy-4'-Methoxyflavon (4'-O-Methylfisetin), Promotes Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26148.

5. 里 直行・武田 朱公・内尾-山田こずえ・楽木 宏実、森下 竜一 「認知症の病態進行におけるインスリン抵抗性の役割」*実験医学* 5月号, p1250-1255, 2011年(和文総説)

2.学会発表

1. 里 直行、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、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"□第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月21日、札幌(口頭)
2. 里 直行、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、楽木 宏実、森下 竜一□"糖尿病がアルツハイマー病の後天的危険因子である機序"□第52回日本神経学会学術大会、2011年5月19日、名古屋(口頭)
3. Sato N, Takeda S, Ueda M, Yu H, Moriguchi A, Uchio-Yamada K, Rakugi H, Morishita R.□"CHANGE IN PLASMA BETA-AMYLOID LEVEL AFTER GLUCOSE LOADING : A POSSIBLE BIOMARKER FOR ALZHEIMER DISEASE"□AAIC (Alzheimer Association International Conference) 2011, 2011 July 18, Paris (口頭)

図1 ネフローゼモデル実験群

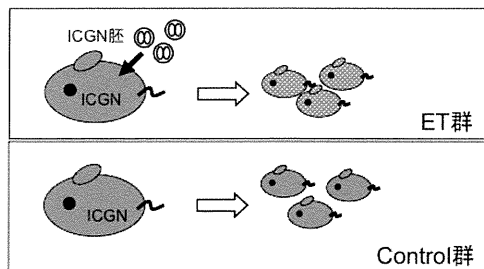


図2 SLEモデル実験群

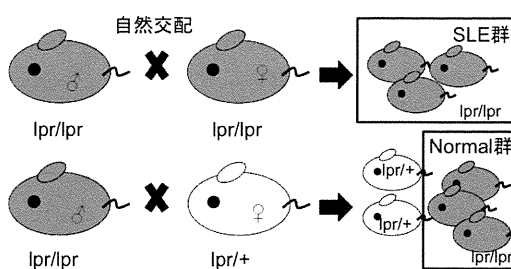


表1 ネフローゼマウス体重および腎重量

	12週齢体重(g)	腎重量(g)	腎重量/体重比
ET群	28.80±2.19	0.42±0.03	1.47±0.14
Control群	27.63±2.21	0.45±0.04	1.64±0.10

表2 ネフローゼマウス血清生化学検査

	Alb	Cre	BUN	T-CHO
ET群	1.16±0.27	0.22±0.11	55.66±14.03	241.4±71.6
Control群	1.30±0.33	0.36±0.05	47.12±13.03	176.0±37.6

図3 ネフローゼマウス腎の Real Time PCR 解析結果

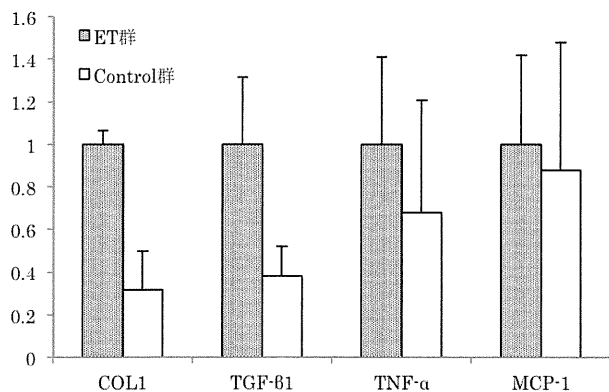


図4 ネフローゼマウス腎の免疫組織化学解析 (α -smooth muscle actin 検出)

ET 群

Control 群

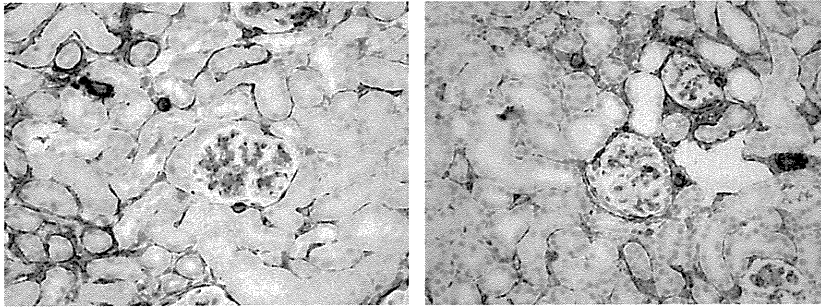


図5 SLE マウスの体重および脾臓重量

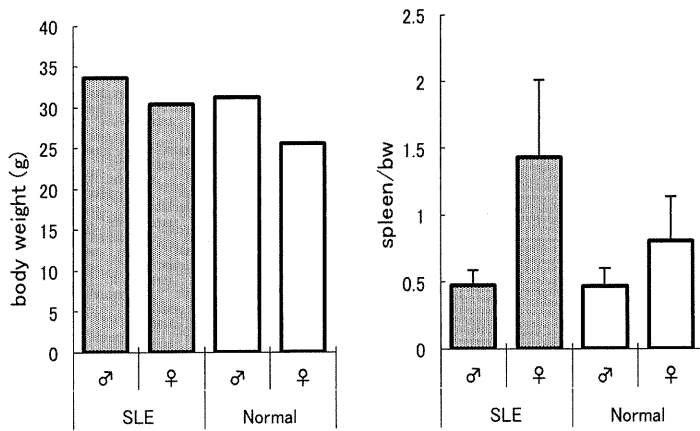


図7 SLE マウス dsDNA 抗体価

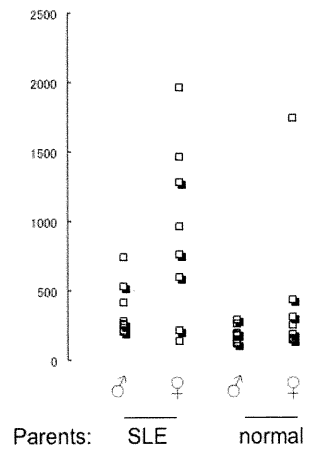
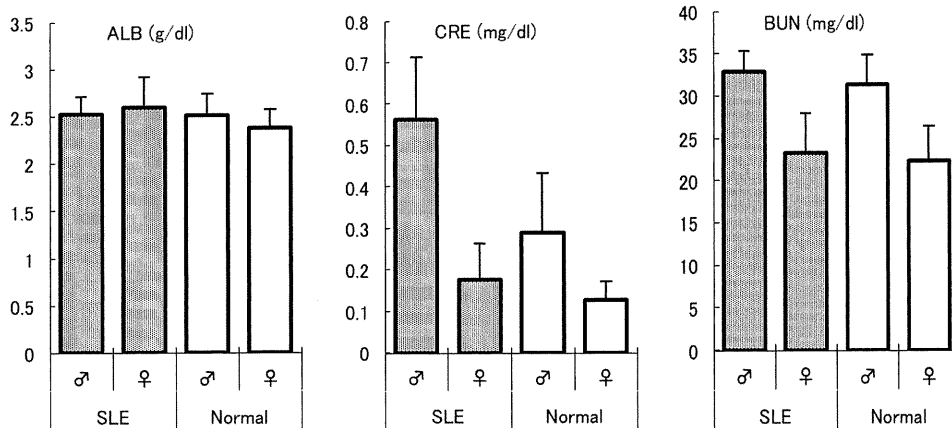


図6 SLE マウスの血清生化学検査



周産期疾患の解析と繁殖技術の開発のためのカニクイザル MHC class-I のタイピング解析

分担研究者 高橋一郎 (医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部)
分担研究者 亀岡洋祐 (医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部)

研究要旨

周産期疾患の解析と繁殖技術の開発のためのカニクイザルのMHC class-Iのタイピング解析の整備を目的として、MHC class-Iのタイピングの解析法を確立し、医薬基盤研究所霊長類医学研究センターで飼育管理されている1家系5頭のカニクイザルのリンパ球で発現している MHC class-I の解析を行った。MHC class-Iのタイピングには Locus A はMAS、Locus B は MBS のプライマーを用いた。カニクイザルにおいて MHC class I Locus A および Locus Bそれぞれから、複数種の発現がみられ複雑ではあるが、これを組み合わせて用いることにより飼育管理に使用することは可能であると考えられる。

これらの結果から周産期疾患の解析と繁殖技術の開発のための有用な研究ツールを整備・拡充できた。

A. 研究目的

アカゲザルを中心としてマカクザルのMHC class-Iのタイピングおよびゲノム配列の整備が進められているが、カニクイザルに対するこれらの解析および情報の整備が遅れており、独立行政法人医薬基盤研究所が有するカニクイザルを用いた周産期疾患の解析と繁殖技術の開発のための遺伝子解析などに支障が生じていた。そこで我々はカニクイザルのMHC class-Iのタイピングによる解析を試みた。

B. 研究方法

1. RNA サンプルの調整:

カニクイザル1家系5頭より全血を得、末梢白血球を分離後 LPS 添加培地にて白血球を増殖させるため 1 晩培養し RNA mini-prep kit (QIAGEN) を用いて RNA を調製した。

2. cDNA の調整および増幅:

上記 RNA 試料を使い Random hexamer をプライマーとして 1 本鎖 cDNA を合成し、MHC class I タイピングプライマー MAS (MHC type I Locus A), MBS (MHC type I Locus B) (Boyson et.al) を用い PCR (変性 94°C・アニーリング 60°C・伸長

72°C) 反応を行った。増幅を確認後 PCR 産物を直接ベクターにクローニング (TA cloning) し大腸菌を形質転換した。クローニングされたクローンをランダムに 10 数個以上分離し、塩基配列をシーケンサー(ABI・ジェネティックアナライザ)で決定した。

C. 研究結果

1. MHC class-I のタイピング解析:

図 1 は使用したカニクイザル1家系5頭の家系を示す。個体 A, B, C, D, E は図に示すとおりである。各個体のリンパ球で発現している MHC class I Locus A, および B より発現しているクローンを 10 個ずつ全塩基配列を調べると各 Locus から複数個の遺伝子が発現していることが判明した。

2. カニクイザル家系内で発現している遺伝子のクラスタ解析:

図2に Locus A および Locus B から発現している遺伝子クローンのクラスタ解析を行った結果を示す。A Locus, B Locus それぞれにおいて、A,B,C,D,E と書かれているものは、各個体より発現しているクローンを示している。個体によっては一つの Locus から2個以上のクローンの発現

があるものがあつたが、それぞれが、親個体より遺伝してきていることが示された。

D. 考察

カニクイザル MHC class-I のタイピング解析では Locus A および Locus B でいずれもアカゲザル MHC class I と近縁でありアカゲザルで使用されている遺伝子プライマーが使用できることが明らかになっている。MHC class-I 領域のゲノム DNA を直接解析することは、遺伝子構造が複雑なため不可能に近いが、発現しているクローンを解析することは、ゲノム DNA を解析するよりは、労力が少なくすむ。しかし単純に1つの遺伝子に対して対立遺伝子が一つというわけにはいかず、ここに免疫系の複雑さがある。データベース化して家系管理するには、膨大な量の塩基配列決定を行わなくてはならず、家系解析するのは、有用ではあるが、目的を持って絞り込みを行わなければ、利用できるデータベースとはならない。これらの解析によって描かれた系統樹から考察されることは、今後さらに MHC class-I のタイピングの家系数を増やす必要があるということである。

E. 結論

今回解析した MHC class-I のタイピング結果から家系による免疫情報の遺伝解析が可能となることが予想できた。MHC class I はウイルス感染防御に対して重要な役割を持っていることが報告されているので、MHC class I の発現解析を感染症と結び付けて解析し、実験動物としてカニクイザルの価値を高めるのに一役かえるのではないかと考えられる。今後ウイルス感染と MHC class I の発現の関係を調べ、有用なデータベースを作成することが重要と思われる。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

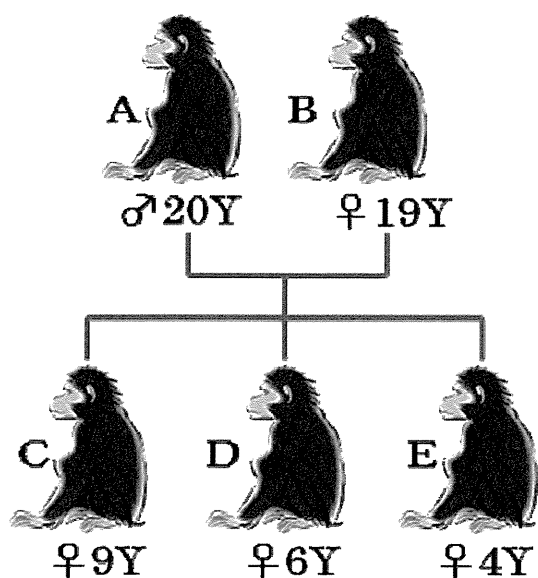


図1. カニクイザル1家系5頭

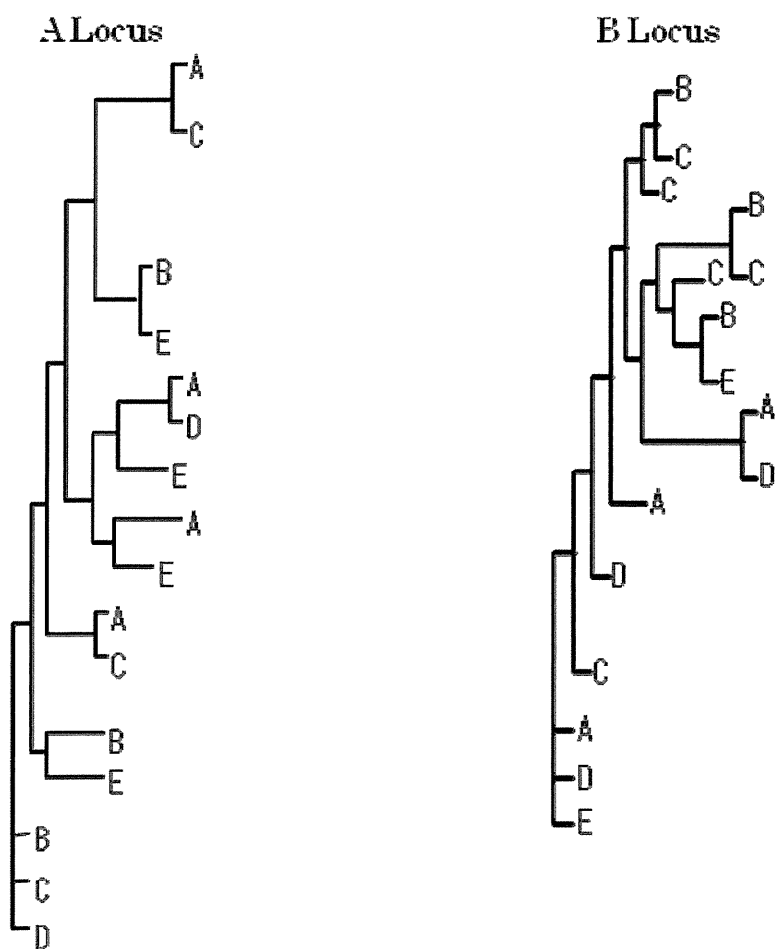


図2 カニクイザル1家系5頭において発現している MHC class I Locus A, および Locus B のクラスター解析の結果。