

1. 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏
強力な細胞性免疫を誘導する Ag85B 発現
弱毒エイズウイルスの防御免疫機構の解析
第 60 回日本ウイルス学会 大阪 2012 年
11 月 13 日－15 日

2. Tomotaka Okamura, Kazuhiro Matsuo, and
Yasuhiro, Yasutomi. Induction of protective
immune responses against pathogenic AIDS
virus infection in monkeys infected with
non-pathogenic AIDS virus carrying an
adjuvant molecule. 第 41 回日本免疫学会
神戸 2012 年 12 月 5 日－7 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

なし

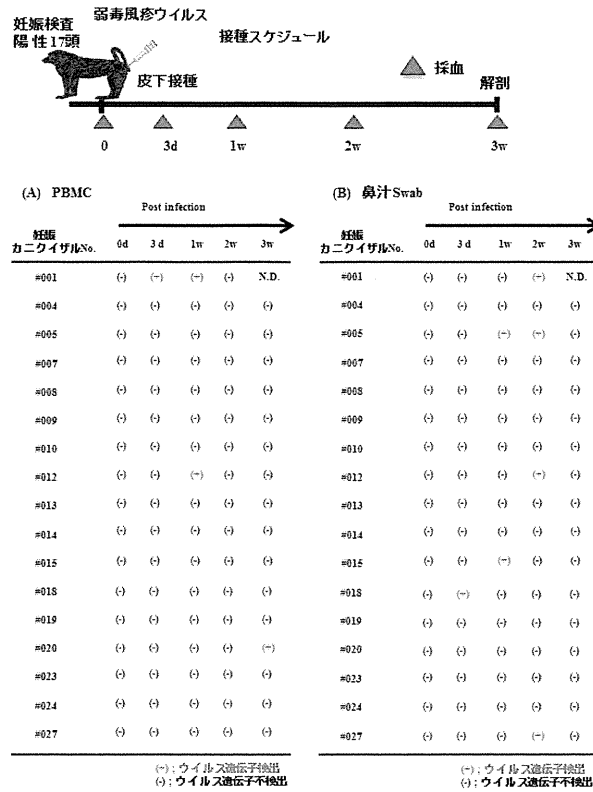


図 1. 弱毒風疹ウイルス接種後の妊娠カニクイザル PBMC(A)および鼻汁 Swab(B)を用いたウイルス遺伝子の検出

妊娠 カニクイザルNo.	胎盤	羊水	胎児
#001	(-)	(-)	(-)
#004	(-)	(-)	(-)
#005	(-)	(-)	(-)
#007	(-)	(-)	(-)
#008	(-)	(-)	(-)
#009	(-)	(-)	(-)
#010	(-)	(-)	(-)
#012	(-)	(-)	(-)
#013	(-)	(-)	(-)
#014	(-)	(-)	(-)
#015	(-)	(-)	(-)
#018	(-)	(-)	(-)
#019	(-)	(-)	(-)
#020	(-)	(-)	(-)
#023	(-)	(-)	(-)
#024	(-)	(-)	(-)
#027	(-)	(-)	(-)

(-): ウイルス遺伝子検出
(+): ウイルス遺伝子不検出

図 2. 妊娠カニクイザルにおける弱毒風疹ウイルスの胎児感染の検討

妊娠カニクイザルNo.

	#001	#004	#005	#007	#008	#009	#010	#012	#013	#014	#015	#018	#019	#020	#023	#024	#027
肺	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
肝臓	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
脾臓	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
腎臓	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
皮膚	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
下頸リンパ節	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
縦隔リンパ節	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
腋窩リンパ節	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
腸胃リンパ節	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
鼠径リンパ節	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+); ウイルス遺伝子検出 (-); ウイルス遺伝子不検出

図 3. 弱毒風疹ウイルス接種妊娠カニクイザルのウイルス生体内分布

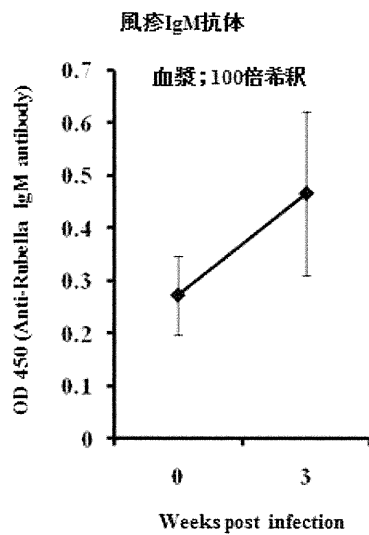


図 4. 弱毒風疹ウイルス接種後の抗風疹免疫誘導

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

難病研究や創薬に役立つことを目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの整備を進めており、今年度は難病モデルを始めとする 91 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認した。とくに、F1 交雑系を遺伝的背景とするマウス系統では凍結精子を用いても、安定して高い成績が得られた。一方、BALB/c など一部の系統では凍結精子の利用が困難で、今後の開発研究が期待される。

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。

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・供給を行っている新規 91 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、各系統の受精成績を収集し、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 91 系統を用いた。

体外受精は昨年度同様に次のように行った。同系統の雌マウスに PMSG および hCG により過排卵を誘起し、卵管膨大部より卵子を採取し、HTF 培養液中に導入した。培養はすべて 5% CO₂、37℃で行った。新鮮精子を用いる場合は、成熟雄 2 匹から精巣上体尾部精子を採取し、HTF 培養液中に別々に加え、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 μl 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。なお、受精率向上のための工夫として、媒精用の HTF ドロップをなるべく平たい形状にすることで、精子が卵子に接近しやすくした。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 μl 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。

マウス卵管への胚移植は、ソムノペンチル麻酔下に背部の皮膚、筋層を切開し、卵管を露出し、実体顕微鏡下で卵巣嚢を切開し卵管采からマウス胚を移植した。筋層を縫合糸にて縫合し、

皮膚切開部を小動物用スキングリップにて閉じた。手術後、麻酔から覚醒するまで、37℃のホットプレート上で保温した。移植胚数が少ない場合は、適宜ダミー胚（毛色で区別できるICRマウス胚など）を加えて移植した。

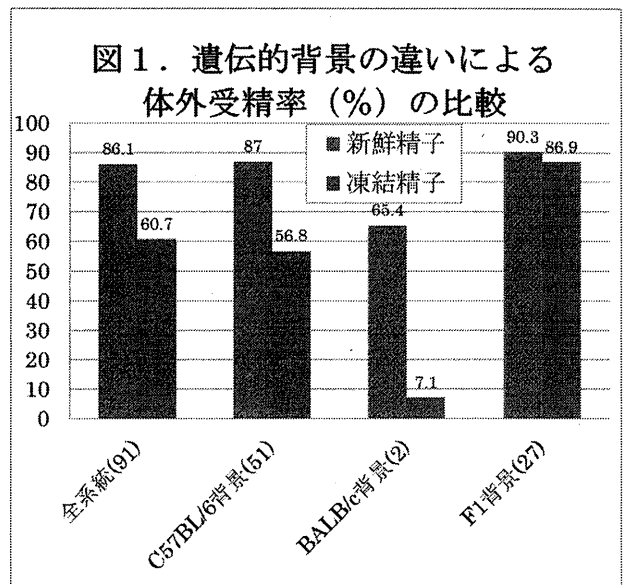
（倫理面への配慮）

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91系統の遺伝的背景系統はC57BL/6が51系統で最も多く、BALB/cは2系統であった。今回検討した系統の中で特徴的であったのは、C57BL/6とC3HのF1系統（B6C3F1）や129とC57BL/6とのF1系統（129xB6）などF1関連系統が27系統と多いことであった。全91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86.1%であった。凍結-融解精子を用いた場合は平均60.7%であり、約25ポイントの低下が見られた。91系統のうち、C57BL/6を遺伝的背景に持つ51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87.0%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均56.8%であった。これは全体の平均と類似した値であった。一方、BALB/cを遺伝的背景に持つ2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65.4%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均7.1%であり、非常に低い値を示した。一方、F1交雑系を遺伝的背景に持つ27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90.3%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均86.9%であり、C57BL/6系よりも良い成績を示した。（図1. 参照）

胚移植を行った74系統のうち、産仔を得ることが出来たのは69系統（93.2%）であった。



D. 考察

今回のマウスの遺伝的背景系統として特徴的であったのは、今まで通りC57BL/6が多く、昨年よりもさらに増大傾向を示していることであり、扱った系統の過半数を超え56%に達していたことである。さらに、F1交雑系を遺伝的背景として持つ系統が約30%と比較的多くを占めていた。これは、トランスジェニックマウスの背景系統として、近交系の代表格であるC57BL/6が好んで用いられる一方、受精卵や胚がin vitroでの操作に強いことからF1交雑系が効率良いトランスジェニックマウス作製に有用であるためであろう。今回の結果から、F1交雑系由来の精子は、凍結精子においても新鮮精子の場合とほぼ同等の約9割という高い受精率を示した。これは雑種強勢現象が精子の耐凍性に好影響をもたらした可能性が考えられた。

一方、BALB/cを背景とするマウス系統は、例数は少ないものの、特に凍結精子の体外受精率が約7%と非常に悪かった。今後の改良が待たれる。ただし、実験動物研究資源バンクとして、BALB/c背景のマウス資源を扱う場合は、新鮮精子を用いた体外受精で2細胞期胚を作製し、胚凍結を中心とした資源化を行うことで、効率良く安全に当該マウスの保存を行うことが可能であり、実際にわれわれ基盤研実験動物研究資源バンクでは実践しており成果を挙げている。

体外受精由来の産仔獲得について、胚移植成績は約93%と非常に高い。これは、体外受精で得られた胚が正常な発生能を持つことを示しており、胚数が少ない場合にはダミー胚を同時移

植したり、帝王切開のタイミングに工夫を払うなど多くの技術が各系統に適切に応用されている結果と考えられる。

さまざまな疾患モデルマウスを効率良く資源化し、研究者の要求に応じて迅速に高品質のマウスを分譲することで、難病研究や創薬に役立つことを目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの整備を進めており、今回の結果は、多くの系統では十分に安定した高レベルのマウス保存・供給体制が整備されていることを示している。今後、体外受精率の低い系統については、精子側のみならず、卵子側の要因についても検討を加え、受精率の改善に向けた技術開発を行う必要がある。以上、体外受精法を応用し、実際に寄託や保護預かりを受けたマウス 91 系統について、各系統に最適化され、安定した技術の確立をめざすとともに、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

難病研究や創薬に役立つことを目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの整備を進めており、今年度は難病モデルを始めとする 91 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た。とくに、F1 交雑系を遺伝的背景とするマウス系統では凍結精子を用いても、安定して高い成績が得られた。一方、BALB/c など一部の系統では凍結精子の利用が困難で、今後の開発研究が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. PLoS One. 2012;7(5):e37803. Epub 2012 May 25.

- 2) 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. 106:92-98, 2012.

2. 学会発表

- 1) 坂手龍一、高橋一朗、古江-楠田美保、松田潤一郎、小原有弘、川原信夫、保富康弘、増井徹「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、幹細胞、難病資源 -」第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡
- 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。「卵巣内 PTEN 関連蛋白質量のマウス系統間比較」第 105 回日本繁殖生物学会。2012 年 9 月 5 日～8 日。つくば
- 3) 小浦美奈子、斉藤賢一、河合晶子、中野正文、野口洋子、鈴木 治、松田潤一郎「クローズドコロニー-ddY マウスの中から発見されたてんかん様の症状を現すマウスについて」第 59 回日本実験動物学会総会。2012 年 5 月 24 日～26 日。別府
- 4) 小浦美奈子、河相晶子、中野正文、野口洋子、鈴木治、松田潤一郎「創薬・難病研究を支える医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」」第 59 回日本実験動物学会総会。2012 年 5 月 24 日～26 日。別府
- 5) 鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎。PCR によるヘアレスマウスの遺伝子型判定法。第 59 回日本実験動物学会総会。2012 年 5 月 24 日～26 日。別府

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

体外受精効率の低いマウス系統の存在はマウス増産の深刻な問題である。本研究では各種薬剤を事前に個体に投与することにより繁殖効率を向上させる方法を検討してきた。近年、精子形成におけるサーチュイン（Sirt1）の重要性が指摘されていることから、129X1系雄マウスの皮下に Resveratrol 徐放剤を留置し、その後の体外受精率・胚発生率への影響を検討した。Resveratrol 投与は低用量（0.1 mg を 21 日間留置）で胚発生率に向上傾向がみられたものの中用量（0.5 mg）では差が無く、高用量（1 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受精率向上が期待できると思われる。また、雌側の繁殖性改良策として PTEN 阻害剤の bpV(pic)による原始卵胞活性化誘導によって誘起排卵数が増えるかを A/J 系マウスで調べたところ、排卵数に増加傾向が見られたことから、原始卵胞の人為的活性化は誘起排卵数の上昇をもたらす有望な方法だと推察された。さらに細かな条件を検討すべきであろう。

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）、低率系統の繁殖は深刻な問題となっている。

低受精率の克服法として、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。近年、精巣におけるサーチュインの重要性が指摘されていることから（McBurney ら *Mol Cell Biol* 23: 38-54, 2003; Coussens ら, *PLoS One* 3:e1571, 2008）、Sirt1 活性化剤の一種、Resveratrol を雄マウスに事前に投与して精巣内の Sirt1 発現を促すことにより精巣上体精子の体外受精効率の向上が望める

かを検討した。一方、雌マウスにおいても性腺刺激ホルモンに低反応の系統が問題である。卵胞発育とホルモン要求の関係から排卵誘起を考えると、卵胞は前胞状卵胞（Preantral follicle）への発育に性腺刺激ホルモンは必要とせず、発育するに従い FSHR が発現して FSH（PMSG など）に反応する能力を徐々に獲得し、しかるのち卵胞刺激ホルモン（FSH や PMSG など）の投与によって胞状卵胞への発達が促され、黄体化ホルモン（LH や hCG）により排卵が誘起される。すなわち「性腺刺激ホルモンに反応しうる卵胞の数（＝前胞状卵胞数）」が「排卵誘起で得られる卵子の数」の上限となる。もし前胞状卵胞が全く形成されていなければ、いくら性腺刺激ホルモンを投与しても誘起排卵は生じないということになる。よって、いかにして前胞状卵胞数を確保するかが、効率の良い排卵誘起には必須である。しかし、今までこの視点は全く考慮されてこなかった。近年、原始卵胞の活性化機構が注目されており（Li ら, *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 10280-10284, 2010）、Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) が原始卵胞の活性化を抑制的に制御している。

本研究では PTEN の阻害剤の一種 Dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (V) (略称: bpV(pic)) の投与により原始卵胞の活性化を促して前胞状卵胞の増加を促し, その後性腺刺激ホルモンを併用するという新規の排卵誘起法によって誘起排卵数が増加するかを調べた。

B. 研究方法

1) Resveratrol 徐放剤の投与

9 週齢の 129X1/SvJmsSlc (129X1 系) の雄マウスに Resveratrol の徐放性製剤 (21 日用, 総量 0.1, 0.5, および 1 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, これら雄マウスを Slc:ICR 雌と共に体外受精に用いた。

2) PTEN 抑制剤を併用した過排卵誘起の試み

PTEN 阻害剤として Dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (V) (略称: bpV(pic)) を用いた。bpV(pic) (Enzo) をリンゲル液に溶解して 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3mg/mL の 3 種の濃度のリンゲル溶解液を調製した。これらを 1 匹当たり 0.1mL 投与することにより, 1 匹当たり bpV(pic)をそれぞれ 3 μg , 30 μg , 300 μg の 3 種の投与量を設定した。

誘起排卵に低反応な系統として A/J マウスを用い, 3 用量の bpV(pic)投与群および対照群 (リンゲル液のみ) で注射後の卵巣の変化を経時的に観察した。すなわち, 28 日齢の A/J マウス 10~11 匹に bpV(pic)を投与し, 毎日 2 匹ずつ, 1~4 日目に卵巣を採取し, 卵巣重量と体重の測定 (

図 3) および蛋白質解析 (

図 4) を行った。

次に上記で得られた結果から, 4 つの条件を設定し (図 5), bpV(pic)と性腺刺激ホルモンの併用による誘起排卵への効果を調べた。PMSG を投与する日を 28 日齢の日とし, その前に設

定した日付に bpV(pic)を所定の用量投与後, PMSG を投与し, その 48 時間後に hCG を投与後, 得られた卵子の数や Slc:ICR 雄を用いた体外受精での受精率・発生率を体外受精にて確認した (図 6)。

3) 体外受精および胚培養

体外受精用精子は採卵約 2 時間前に精巣上体尾部より採取し, TYH 培地 (三菱化学メディアエンス) にて 1~2 時間培養後, パラフィンオイル (Zenith Biotech.) で覆った TYH 培地小滴内へ 150 sperm/ μL の濃度となるように添加した。採卵用雌には 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, 発生用培地 (KSOM/aa (Zenith Biotech.) + 1 mg/mL BSA (Sigma)) の小滴に胚を 3 回移すことによって洗浄し, パラフィンオイルを覆った発生用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 24 時間後の 2 細胞期への発生率を受精率, 媒精 96 時間後の胚盤胞期への到達率を体外発生率とした。

4) 蛋白質の定量 Western blot 解析

採精時に得た精巣, または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 匹の精巣または卵巣から個体毎に ReadyPrep™ protein extraction kit (Total Protein 用, Bio-Rad) を用いて蛋白質を抽出し, 各種蛋白質の定量 Western blot 解析を行った。抽出した蛋白質 (約 0.5 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 Sirt1 抗体 (1:10,000, CST, マウス抗体), 抗 Androgen Receptor (AR) 抗体 (1:10,000, Epitomics, ウサギ抗体), または抗 Müllerian Inhibiting substance (MIS, anti-Müllerian hormone, AMH と呼ばれる) 抗体 (1:10,000, Santa Cruz, ヤギ抗体) と抗 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (1:50,000, Millipore, マウス抗体) を, 二次抗体 (Jackson Immunoresearch) として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 抗体および抗ヤギ抗体 (1:20,000) および Peroxidase ラベル抗マウス IgG 軽鎖特異的抗体 (1:50,000) を用いて免疫染色を行った。視覚化には化学発光 (ECL plus, GE もしくは Pierce) 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, 目的蛋白質と GAPDH のバンドの発光強度から GAPDH を内部標準として目的蛋白質発現量を「目的蛋白質 / GAPDH 比」として求めた (検量線作成法については Exp Anim 60: 193-196, 2011 を参照)。

5) 統計処理

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正規性を Shapiro-Wilk 検定で, 等分散性を Levene 検定で確認した後, 各用量で薬物投与の有無の間の差を分散分析により判定した。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: DS24-37 および DS24-39)。

C. 研究結果

1) Resveratrol の体外受精と胚発生への影響

Slc:ICR 由来卵子と Resveratrol 群もしくは Placebo 群の雄由来精巣上体精子との受精率

(図 1A) と体外発生率 (図 1B) は調べた用量全てで有意差はなかったが, Placebo 群に比べ Resveratrol 群において 0.1 mg で上昇傾向, 1.0 mg で下降傾向が見られた。

2) Sirt1 および AR 受容体蛋白質発現への影響

精巣での Sirt1 蛋白質の発現に有意差はなかったものの, どの用量でも Resveratrol 投与群の方が高い傾向が見られた (図 2A)。増加率は 1.0 mg 群で若干低い傾向が見られた。

一方, 精巣での AR 蛋白質の発現量は Placebo 群に比べ Resveratrol 群において 0.1 mg で上昇傾向, 0.5 mg で有意に下降 (p=0.004), 1.0 mg で下降傾向が見られた (図 2B)。

総合してみると, 両蛋白質発現量は Resveratrol 低用量で上昇傾向, 高用量で抑制傾向であった。

3) bpV(pic)の投与量と死亡率

bpV(pic)を 3 用量投与したところ, 300 µg 投与した群は 11 匹中 2 匹 (18%) が翌日までに死亡したが, 残りは実験期間中生存した。他の用量, および対照群 (リング液のみ) では死亡個体はいなかった。

4) bpV(pic)投与後の卵巣体重比および AMH 量の変化

bpV(pic)投与群および対照群の卵巣体重比は (

図 3), 対照群は徐々に卵巣体重比が低下していき, 3 µg/head 投与群では 2 日目に, 30 µg/head 投与群では 2 日目以降に高い値があった。300 µg/head ではあまり変化は無かった。

卵巣 MIS 蛋白質発現量は (

図 4), 対照群は徐々に卵巣 MIS 含量が低下していき, 3 µg/head 投与群では 3 日目以降に, 30 µg/head 投与群と 300 µg/head 投与群では 2 日目以降に卵巣 MIS 含量が上昇していた。

5) bpV(pic)と性腺刺激ホルモンを併用した過

排卵誘起と受精率、発生率

上記結果から、bpV(pic)の 300 µg/head 投与は多すぎることで、3 µg/head 投与群では3日目以降に、30 µg/head 投与群では2日目以降に卵巣 MIS 含量が上昇する（すなわち卵胞発育が盛んになる）ことなどから、bpV(pic)の投与量を3ないし30 µg/head とし、30 µg/head 投与 (Day 0) の後の Day 1 と Day 2, 3 µg/head 投与 (Day 0) の後の Day 3 と Day 4 に PMSG を打ち始め排卵誘起するという4つの実験群を設定した。

排卵誘起の結果は、30 µg の Day 1 および 3 µg の Day 3, Day 4 で排卵数の分布が対照群に比べ bpV(pic)投与群の方が上にシフトする傾向、すなわち、排卵数の増加傾向が見られた。30 µg の Day 2 ではむしろ排卵数が減少傾向を示した (図 5)。

30 µg の Day 1 および 3 µg の Day 3 では受精率 (2-cell への発生率, 図 6A) および発生率 (胚盤胞への発生率, 図 6B) に bpV(pic)投与群と対照群の間に有意差は無かったが、30 µg の Day 2 および 3 µg の Day 4 では有意に bpV(pic)投与群が低かった。

D. 考察

本研究では、雄マウスへの試みとして、resveratrol の精巣上体精子の体外受精能への影響、雌マウスへの試みとして PTEN 抑制剤による誘起排卵数増加効果について検討した。

雄個体への Resveratrol 徐放剤投与による精巣上体精子の体外受精能の向上効果は軽微であった (図 1)。低用量で若干の向上傾向は見られるが、高用量では抑制的であった。精巣内サーチュイン (Sirt1) の増加は 1.3 倍程度で (図 2A), 確かにサーチュインの増加が誘導されたが、受精能との関連は弱いと考えられる。文献的にはサーチュインが存在しないと重篤な精子形成異常を来すが、サーチュインが既に相当量存在する場合は増加させても効果は変わらないということであろう。これらのことから Resveratrol 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。

予備実験的な試みであったが、雌個体への PTEN 阻害剤投与は、排卵数の上昇を来す有望な方法だと考えられた (図 5)。卵巣組織の観察は今回出来なかったが、PTEN 阻害剤の投与は卵巣内 MIS の上昇させることから (

図 4), 確かに原始卵胞の活性化を生じさせると考えられ、前胞状卵胞の形成が盛んになっていると思われた。その結果、PMSG と hCG による過排卵誘起により、対照群に比べ排卵数が多い傾向を見ることが出来た。bpV(pic)と PMSG の投与間隔と誘起排卵数の関係を見てみると、MIS 産生が高くなる前に PMSG を投与した方が良いように思われる。なぜなら 30 µg の Day 2 群のように排卵数が少ない上に受精率・発生率が下がり、最終的な胚数が減ってしまっていた。このようにタイミングがずれる、特に遅れてしまうと排卵数増加効果は薄く、また発生率も悪いようである (図 6)。

本研究では PTEN 阻害剤は 1 種類しか使っていない。いろいろな阻害剤が入手可能であるので、さらなる検討を行い、より効率の良い誘起排卵増加法を調べるべきであろう。

E. 結論

本研究の結果からマウス雄個体への Resveratrol 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。一方、雌個体への PTEN 阻害剤と性腺刺激ホルモン併用による誘起排卵数増加は予備実験的な結果だが、有望な方法であると思われた。さらに諸条件を検討すれば非常に効果的な手段になると期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Iwata Y, Suzuki O, and Watanabe S.
Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator of muscle damage. *Muscle and Nerve* 47(3):372-378, 2013.

2) 学会発表

1. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Altered neddylation in the heart of a mouse model for cardiomyopathy. *Experimental Biology* 2012. 平成 24 年 4 月 21 日～25 日. San Diego, CA, USA
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. PCR によるヘアレスマウスの遺伝子型判定法. 第 59 回日本実験動物学会総会. 平成 24 年 5 月 24 日～26 日. 別府
3. 小浦美奈子, 斉藤健一, 河相晶子, 中野正文, 野口洋子, 鈴木治, 松田潤一郎. クローズドコロニー-ddY マウスの中から発見されたてんかん様の症状を現すマウスについて. 第 59 回日本実験動物学会総会. 平成 24 年 5 月 24 日～26 日. 別府
4. 小浦美奈子, 河相晶子, 中野正文, 野口洋子, 鈴木治, 松田潤一郎. 創薬・難病研究を支える医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」. 第 59 回日本実験動物学会総会. 平成 24 年 5 月 24 日～26 日. 別府
5. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Effects of dehydroepiandrosterone on female reproduction in mice. *ENDO* 2012. 平成 24 年 6 月 23 日～26 日. Houston, TX, USA
6. 鈴木治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. 卵巣内 PTEN 関連

蛋白質量のマウス系統間比較. 第 105 回日本繁殖生物学会大会. 平成 24 年 9 月 5 日～8 日. つくば

7. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Analysis of the *Hr* gene in a hairless mouse strain (HR). 63rd AALAS National Meeting. 平成 24 年 11 月 4 日～8 日. Minneapolis, MN, USA
8. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Relationship of testicular androgen receptor protein expression with in vitro fertilizability of epididymal sperm in mice. 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 平成 24 年 12 月 15 日～19 日. San Francisco, CA, USA
9. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Reduced superovulation efficiency by high-dose treatment of dehydroepiandrosterone in mice. 2013 IETS Annual Conference. 平成 25 年 1 月 18 日～22 日. Hannover, Germany
10. Osamu Suzuki. High blood testosterone reduces superovulation efficiency in mice. 2nd Congress on Steroid Research. 平成 25 年 3 月 10 日～12 日. Chicago, IL, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 1. 特許取得

鈴木治, 岩田裕子. 筋傷害の簡便検査方法および筋傷害検査用キット. 特許第 49974412 号. 平成 24 年 5 月 25 日登録。

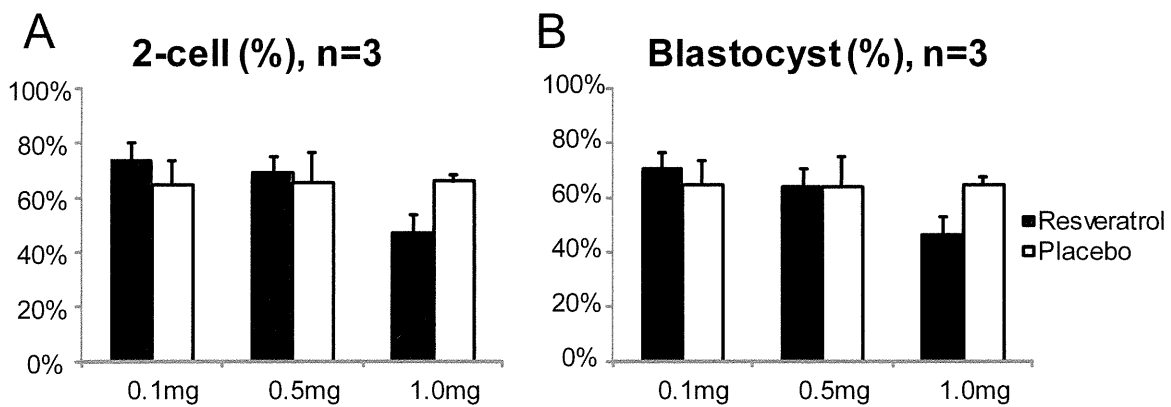


図1. 129X1/SvJmsSlc の精巣上体精子を用いた体外受精成績 (平均±標準誤差, n=3)。卵子は Slc:ICR 由来である。Resveratrol 群(■)は 0.1, 0.5, もしくは 1 mg の Resveratrol 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より, Placebo 群 (□) は全く Resveratrol を含まない同形同大の徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より得た精巣上体精子で体外受精を行った。媒精後 24 時間での 2 細胞期への発生率 (A, 受精率に相当), 媒精後 96 時間での胚盤胞への発生率 (B, 体外発生率に相当) を求めた。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・発生率ともに調べた用量全てで Placebo 群に比べ有意差はなかったが, Resveratrol 群において 0.1mg で上昇傾向, 1.0mg で下降傾向が見られた。

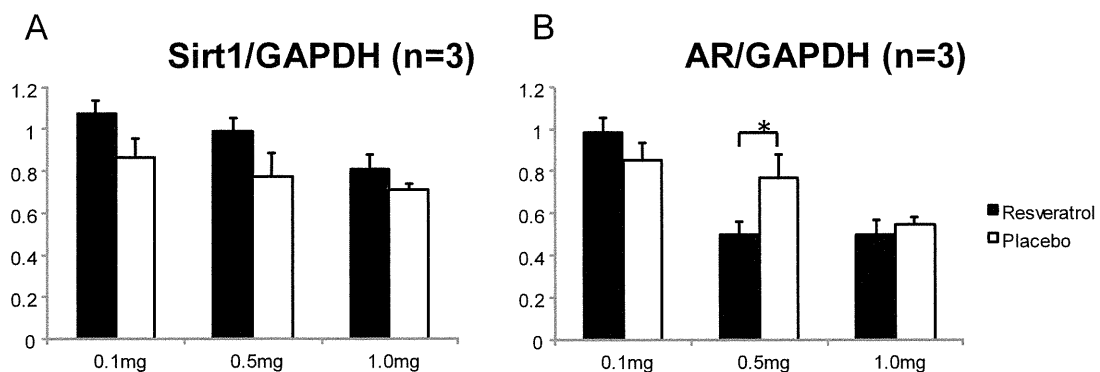


図2. 精巣に発現している Sirt1 (A) および Androgen Receptor (AR, B) 蛋白量 (平均±標準誤差, n=3)。内部標準として Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を使用した。Sirt1 は全ての投与群で Resveratrol 群(■)が Placebo 群 (□) に比べ上昇傾向を示した。AR は Resveratrol 群が Placebo 群に比べ 0.1mg で上昇傾向, 0.5mg で有意に低下 ($p=0.004$), 1.0mg で下降傾向が見られた。

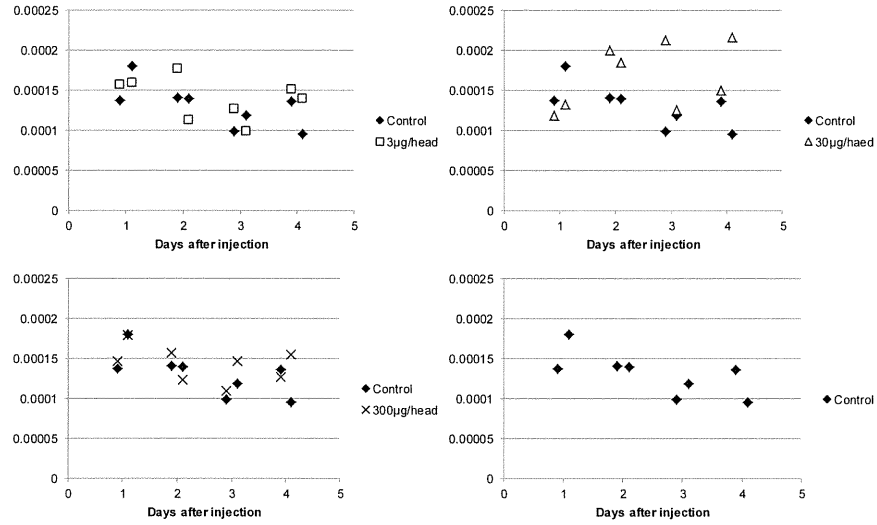


図 3. bpV(pic)投与後の卵巣重量体重比 (n=2, 個々のデータを表示)。bpV(pic)またはリンゲル液 (対照) を 28 日齢 A/J 系雌マウスに投与後 (Day 0), Day 1 から Day 4 まで毎日 2 匹毎に卵巣を採取して秤量し, 体重を測定した。対照群のみを (◆, リンゲル液のみ) を右下に示し, 対照群と比較しやすいように対照群のデータと共に用量毎の bpV(pic)群(□: 3 µg/head, 左上; △: 30 µg/head, 右上; ×: 300 µg/head, 左下)のデータを示した。対照群は徐々に卵巣体重比が低下していくが, 3 µg/head 投与群では 2 日目に, 30 µg/head 投与群では 2 日目以降に高い値があった。300 µg/head ではあまり変化は無かった。

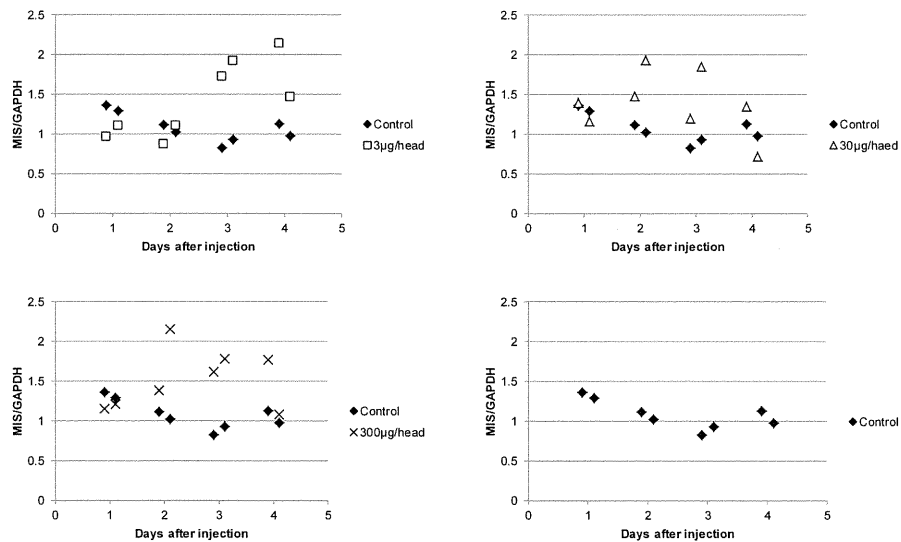


図 4. bpV(pic)投与後の卵巣 Müllerian inhibiting substance (MIS) 蛋白質量の変化 (GAPDH を内部標準とする; n=2, 個々のデータを表示)。MIS の量は発育卵胞数の尺度と言われており, 原始卵胞の活性化の指標と見ることが出来る。対照群のみを (◆, リンゲル液のみ) を右下に示し, 対照群と比較しやすいように対照群のデータと共に用量毎の bpV(pic)群(□: 3 µg/head, 左上; △: 30 µg/head, 右上; ×: 300 µg/head, 左下)のデータを示した。対照群は徐々に卵巣 MIS 含量が低下していくが, 3 µg/head 投与群では 3 日目以降に, 30 µg/head 投与群と 300 µg/head 投与群では 2 日目以降に卵巣 MIS 含量が上昇する傾向を示した。

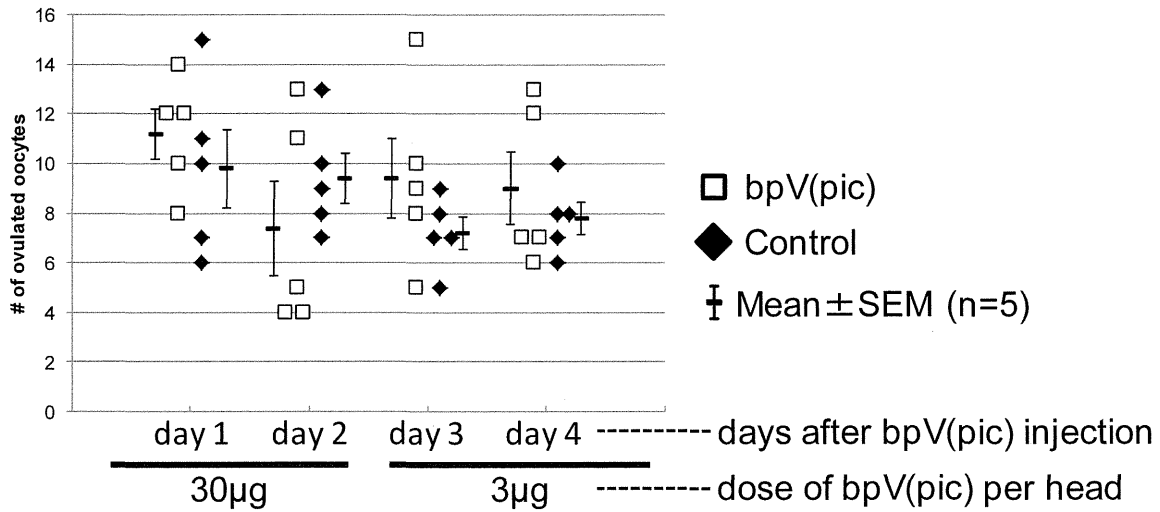


図 5. bpV(pic)を併用した過排卵誘起 (n=5)。各実験群の個体毎の排卵数の分布および平均±標準誤差を示す。左 2 群は bpV(pic)を 30 µg, 右の 2 群は 3 µg を投与した (対照はリンゲル液のみ)。bpV(pic)投与 (Day 0) のあと, 示した日から PMSG と hCG による誘起排卵を行った。30 µg の Day 1 および 3 µg の Day 3, Day 4 で排卵数の分布が対照群 (◆) に比べ bpV(pic)投与群 (□) の方が上にシフトする傾向, すなわち, 排卵数の増加傾向が見られた (ただし有意差無し)。30 µg の Day 2 ではむしろ排卵数が減少傾向を示した。

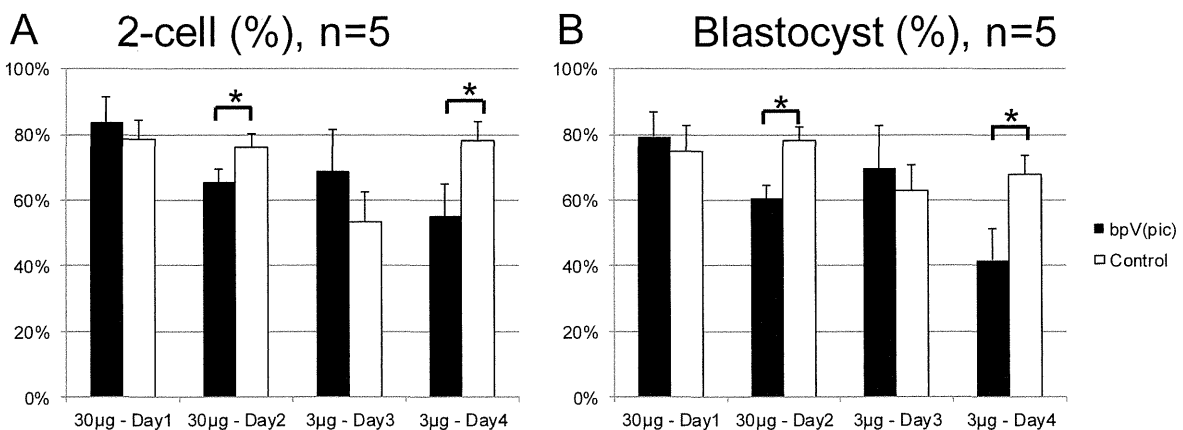


図 6. bpV(pic)投与後に得られた卵子の受精率と発生率への影響 (平均±標準誤差, n=5)。30 µg の Day 1 および 3 µg の Day 3 では受精率 (2-cell への発生率) および発生率 (胚盤胞への発生率) に有意差は無かったが, 30 µg の Day 2 および 3 µg の Day 4 では対照群 (□) に比べて有意に bpV(pic) 投与群 (■) が低かった。

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重要であるが、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、並行してマウス等の齧歯類モデルを利用することが不可欠である。特にマウスは遺伝的に均一な近交系系統が多く存在すること、良好な繁殖効率、短い妊娠期間、遺伝子改変が容易等、汎用性が高いため、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貢献することが期待できる。本研究において本年度は難治性ネフローゼ、全身性エリテマトーデスといった難病の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精査した。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

重篤な疾患による不妊、妊娠・出産による母体疾患の悪化、母体疾患が産児の健康状態に与える影響等は知られているが、残念ながらその機序については不明な点が多い。不妊の解決策として発生工学的手法を利用することが一般的であるが、胚培養の行程はゲノムへ後天的修飾をおよぼすことが報告されていることから、後々産児の表現型へ影響することが危惧される。さらに母体疾患が胎児・産児にどのような影響をおよぼすかは不明な点が多く、詳細な解析が不可欠である。

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胚操作技術が確立されていること、遺伝子組換えが可能であるため多様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。さらに実験動物バンクから様々な疾患モデルマウスを入手可能であることも利点である。疾患モデルマウスを利用し、発生工学的手法が産仔表現型に与える影響、さらに妊娠・出産による母体疾患の病態変化、母体疾患が産仔表現型に与える影響について解明することで、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、昨年度に続き、難治性ネフローゼモデルマウス（ICGN 系統）を用いて、母体疾患が産仔表現型に及ぼす

影響を明らかにするため、主に炎症に関与する分子の解析を行った。

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。

<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、GG 群) 卵管および ICR マウス (n=4、RG 群) 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。(図 1 参照)

<抗 ds-DNA 抗体検査>

抗 ds-DNA 抗体検査キット (レビス) を用いて、ネフローゼマウス血清中の抗 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、腎尿細管傷害マーカーである Kim-1, usag-1 および自己免疫疾患で発現が亢進する ifi202b、炎症に関与するサイトカインである IFN- γ , IL-13、炎症細胞マ

ーカーである CD3 (T 細胞), CD20 (B 細胞), F4/80 (マクロファージ)、CD80 (M1 マクロファージ), CD206 (M2 マクロファージ) の発現解析を行った。すべて GAPDH 比をとり、雄性 RG 群を基準とした。

<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、半月体を形成している糸球体を数えた。さらに免疫染色にて、T 細胞のマーカーである CD3、B 細胞のマーカーである B220 およびマクロファージのマーカーである F4/80 を検出し、炎症の程度を精査した。

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。本研究で使用したネフローゼモデル ICGN マウスは、腎糸球体を原発とする疾患を主体としているが、加齢とともに自己免疫疾患様の症状を呈することが最近明らかとなった。そこで腎病変に加え、全身性エリテマトーデス (SLE) の症状についても検討した。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。

病理組織化学解析: PAS 染色標本を観察し、

半月体を形成している糸球体をカウントした。GG群に比し、RG群において半月体形成率が顕著に高いことがわかった(図2)。免疫染色の結果、RG群、GG群ともに尿細管間質にT細胞、B細胞の浸潤があるが、RG群の方がより多くの浸潤細胞が観察され、炎症が重篤化していることが示唆された(図3)。一方、マクロファージマーカーであるF4/80の免疫染色を行ったところ、両群ともに尿細管間質、糸球体周辺にマクロファージの浸潤が観察されたが、大きな差は認められなかった。また両群ともメスの方がより多くマクロファージが浸潤していることが分かった。

腎組織の Real Time PCR 解析: まず尿細管の傷害マーカーである kim-1 および usag-1 の発現を調べた(図4)。RG群に比し、GG群の方がこれらの分子の発現が亢進していることが分かり、尿細管のダメージはGG群の方が重篤であることが示唆された。続いて炎症に関与するサイトカインである IFN- γ および IL-13 の発現を解析した(図4)。Th1 サイトカインである IFN- γ は RG 群の方が有意に高く、Th2 サイトカインである IL-13 は雌性 RG 群で発現が亢進していることが分かった。さらに炎症細胞のマーカーである CD3(T細胞)、CD20(B細胞)、F4/80(マクロファージ)、CD80(M1マクロファージ)、CD206(M2マクロファージ)の発現解析を行った。CD3、CD20について、RG群において発現が亢進しており、F4/80については両群に差がないが、どちらの群も雌性において発現量が高いことが

分かった。マクロファージについて、さらに詳細な検討を行ったところ、M1マクロファージCD80発現量はRG群の方が有意に高いが、M2マクロファージCD206発現量は雄性については両群間に差がないが、雌性はRG群の方が高いことが分かった。炎症を悪化させるM1マクロファージマーカーがRG群で亢進していることから、RG群では尿細管間質において重篤な炎症が惹起されており、病態進行を加速させていることが示唆された。さらに自己免疫疾患で発現亢進することが知られる ifi202b の発現を調べたところ、雌性RG群においてのみ顕著に発現が亢進していることがわかった。

抗核抗体解析: ELISAにて血清中の抗dsDNA抗体を測定した(図5)。GG群は12週齢の時点でdsDNA抗体陰性であったが、RG群では陽性であり、特に雌性マウスにdsDNA抗体が高い傾向があった。(自己免疫疾患には性ホルモンが関与しているため性差があり、SLE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。) dsDNA抗体の解析結果は腎組織における Real Time PCR 解析結果(IL-13, ifi202bの発現)と合致しており、雌性RG群において、SLE様の症状が重篤化することが分かった。本研究でのデータは、母体の表現型により、自己免疫疾患様の症状が悪化すること可能性、病態進行機序には雌雄差があることを示唆している。

本研究での解析により、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および SLE モデルとして利用可能な ICGN 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 ICR マウスおよび ICGN マウス卵管に移植を行い、生まれた産仔の病態を比較した結果、表現型に違いが認められた。まず ICR マウスから生まれた RG 群は ICGN マウスから生まれた GG 群に比し、糸球体半月体形成率が高いこと、尿細管間質の炎症が重篤化している傾向があり、急速進行性糸球体腎炎様の症状が認められた。さらに血清中の抗 dsDNA 抗体についても 12 週齢の時点での RG 群において、検出され、SLE 様の症状もより早く顕れることが明らかとなった。もともと ICGN マウスは慢性腎炎モデルとして使用されてきており、12 週齢において RG 群で確認された重篤な炎症像が顕れることはないため、ICR マウスへの胚移植操作により、大きく表現型が変化することが示唆された。一方、尿細管傷害マーカーの発現は GG 群が有意に高く、尿細管での病態進行については ICGN マウス母体から生まれた産仔の方が重篤化することが示唆された。タンパク尿のレベルは RG 群の方が重篤であるため、GG 群においてどのような機序で尿細管がより傷害を受けるのか、さらなる解析が必要である。

ICGN マウスはネフローゼモデルとして非常に有用であることが知られているが、遺伝的に均一なコントロールマウスが存在しないことがデメリットの一つである (closed colony で維持する ICR マウス系統由来で、ICGN マウスは複数の変異遺伝子を持つため)。母体-産仔間の研究を行うためには、胚操作が必須であり、自然交配だけの実験系を組むことができない。また既存の腎疾患モデルマウスは稀有で、同様の実験を行える表現型を呈するマウスモデルもないため、現在、ICGN マウスの複数の原因遺伝子領域を持つコンジュニック系統を作製し、自然交配により母体-産仔間のクロストークを研究する実験系を樹立中である。

昨年度までに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を明らかとしてきた。このことと本年度の研究結果を併せて考えると、胚培養の行程によるエピジェネティックな変化に加えて、母体疾患による産仔ゲノムへの後天的修飾が産仔表現型に大きく影響していることが示唆された。

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、新生児の表現型に注意を払う必要があると考えられる。また妊娠・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疾患や発育の鍵となることが示唆される。また一般的にマウスバンク事業において、凍結胚を融解、正常マウス卵管へ移植し、生まれた産仔を分譲しているが、

産仔の表現型に留意する必要性が示唆された。

今年度の研究結果より、産仔の遺伝子型は同じであるにも関わらず、母体疾患が産仔の表現型を変化させ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様々な疾患の進行に大きく影響することを示唆している。

E. 結論

疾患モデルマウスを用いた本研究により母体疾患が産仔表現型を変化させることが分かった。さらに資源事業において、胚培養、母体の違いによって産仔の表現型が変化することに留意し、品質管理を行うことが重要であることも示唆された。今後、様々な疾患モデル動物について検討することが重要であり、マウスでの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なることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kinohara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. PLoS One. 2013;8(1): e54122.
2. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Yu H, Moriguchi A, Rakugi H, Morishita R.

Oral glucose loading modulates plasma β -amyloid level in alzheimer's disease patients: potential diagnostic method for Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 2012; 34(1): 25-30.

3. 山本 美江、内尾-山田 こずえ、高野 薫、小倉 淳郎、浅野 敏彦、中川 雅郎「ICR系マウスの遺伝子資源としての有用性」 岡山実験動物研究会会報 第 28号、p59-62、2012年

2. 学会発表

1. 里 直行、森-植田 茉莉、田中 稔久、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山 繁雄、武田 雅俊、樂木 宏実、森下 竜一「アルツハイマー病APP Tgマウス脳における糖尿病によるタウ・リン酸化の促進」 脳心血管抗加齢研究会2012、2012年11月18日、大阪（口頭）
2. 里 直行、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、湯 久浩、守口 篤、樂木 宏実、森下 竜一「糖負荷試験における血中 β アミロイド測定—アルツハイマー病診断補助法としての可能性」 脳心血管抗加齢研究会2012、2012年11月18日、大阪（口頭）
3. 里 直行、森-植田 茉莉、田中 稔久、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山 繁雄、武田 雅俊、樂木 宏実、森下 竜一「糖尿病はAPPトランスジェニックマウス脳においてタウのリン酸化を促進する」 第31回日本認知症学会学術集会、2012年10月26-28日、つくば（口頭）

4. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、湯 久浩、守口 篤、樂木 宏実、森下 竜一「糖負荷後血中A β 値の変動とそのアルツハイマー病診断指標としての応用」VAS-COG JAPAN 2012、2012年9月8日、東京（口頭）
Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "Old APPxob/ob mice showed highly increased level of tau phosphorylation in brain" Neuroscience 2012, October 15, 2012, New Orleans（ポスター）
5. 里 直行、森-植田 茉莉、田中 稔久、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山 繁雄、武田 雅俊、樂木 宏実、森下 竜一「糖尿病によるアルツハイマー病トランスジェニックマウス脳におけるタウのリン酸化の促進」VAS-COG JAPAN 2012、2012年9月9日、東京（口頭）
6. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "Roles of beta-amyloid and insulin resistance in the interaction between diabetes mellitus and Alzheimer's disease" Gordon Research Conferences, Neurobiology of Brain Disorders Chair: Jie Shen, Vice Chair: Joachim J. Herz Stonehill College, August 5-10, 2012（口頭）
7. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "The mechanisms by which diabetes mellitus increases the risk of Alzheimer's disease" Keystone Symposia, Aging and Diseases of Aging, October 25, 2012, Tokyo（ポスター）
8. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M,