

201307047A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 (H25-創薬-指定-009)

医科学研究に重要な霊長類資源の
繁殖・育成と疾患モデルの作製・解析

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 保富 康宏

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26年(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 (H25-創薬-指定-009)

医科学研究に重要な霊長類資源の
繁殖・育成と疾患モデルの作製・解析

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 保 富 康 宏

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26年(2014)年3月

目 次

I. 総括研究報告

医科学研究に重要な霊長類資源の繁殖・育成と疾患モデルの作製・解析

保富 康宏 ----- 1

II. 分担研究報告

1. ワクチン開発における霊長類を用いた基盤技術の開発

保富 康宏 ----- 3

2. 霊長類由来研究資源の保存技術の高度化

山海 直 ----- 7

3. ホルモン解析による繁殖技術の確立

下澤 律浩 ----- 12

4. 霊長類循環器疾患モデルの作製とその解析

揚山 直英 ----- 16

5. カニクイザルモデルを用いたウイルス感染症に関する研究

岡村 智崇 ----- 21

6. PTEN 抑制物質投与による霊長類誘起排卵数増加法の基礎的検討

鈴木 治 ----- 24

7. カニクイザルの MHC 遺伝子発現解析

高橋 一朗 ----- 31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 58

厚生労働科学研究費 創薬基盤推進研究事業
総括研究報告書

医科学研究に重要な霊長類資源の繁殖・育成と疾患モデルの作製・解析

研究代表者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

霊長類医科学研究センターのカニクイザルコロニーに対して、実験動物として創薬につながる霊長類資源の繁殖技術の向上、動物資源の高度化、および疾患モデルを検討し、医科学研究の基盤の構築を試みた。霊長類由来研究資源の保存技術の高度化のためにカニクイザル卵巣の凍結、移植を試み性周期の回帰の検討を行い、性周期の回帰を確認した。さらに若齢カニクイザルの排卵を血中ホルモン動態から排卵時期とのズレが確認された。個別の疾患に対する感受性と MHC の関係を明らかにするために SPF カニクイザル各 SIV を接種したところ、産地に差異はなく、MHC の解析を開始した。また、ワクチン開発における霊長類を用いた基盤的技術の開発のために呼吸器粘膜における病原体に対する反応を検討した。さらに遺伝的な循環器系疾患の基盤技術を確立するために MRI を用いた造影、心電同期や呼吸同期等の撮像法を樹立し、霊長類における心臓、肝臓等の病態を解析した。以上の事から霊長類を用いた資源高度化およびヒト疾患モデルへの対応を試み、霊長類資源の創薬への有用性が示唆された。

研究分担者

山海 直	医薬基盤研究所	霊長類医科学研究センター	主任研究員
下澤 律浩	医薬基盤研究所	霊長類医科学研究センター	主任研究員
揚山 直英	医薬基盤研究所	霊長類医科学研究センター	主任研究員
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
鈴木 治	医薬基盤研究所	難病・疾患資源研究部	主任研究員
高橋 一朗	医薬基盤研究所	難病・疾患資源研究部	主任研究員

A. 研究目的

創薬研究においては詳細な分子メカニズムの解析に続き、高度な動物実験により、効果や毒性の解析を行うことが必要である。さらに治験段階を迎えるには霊長類を用いた解析、検討は必須であり、その霊長類ももちろん実験動物として高度化されていなければならない。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターは我が国で唯一の医科学研究を目的とした霊長類センターであり、さらに 1,500 頭以上のカニクイザル系統を維持し SPF 化している世界で唯一の機関である。近年は当センターカニクイザルの全ゲノムシー

クエンスの解析にも成功している。本研究ではこれら高度な霊長類を用い、創薬につながる動物資源の繁殖技術の向上、動物資源の高度化および疾患モデルを検討し、医科学研究の基盤を構築することを目的とした。

B. 研究方法

分担報告書参照

C. 研究結果

以下の如く結果を得た。

1 1. 霊長類由来研究資源の保存技術の高度化 :カニクイザル卵巣の凍結、移植

を試み性周期の回帰の検討を行い、性周期の回帰を確認した。

2. カニクイザルのホルモン解析による繁殖技術の確立:若齢サル of 排卵を血中ホルモン動態から調べたところ、通常想定される排卵時期とのズレが確認された、通常の交配方式に適さない個体に対応する必要性が認められた。

3. カニクイザルの MHC 遺伝子発現解析:カニクイザルにおける MHC の検討を疾患にリンクしている発現を調べるために、サルエイズウイルス (SIV) に感受性、抵抗性を付与するであろう MHC のタイプの解析を行っている。

4. ワクチン開発における霊長類を用いた基盤的技術の開発:呼吸器粘膜における病原体に対する反応を検討するためにカニクイザル呼吸器粘膜に不活化および複製不能ウイルスを投与したところ炎症反応および免疫反応の差異が確認された。

5. 循環器疾患モデルの作製とその解析: MRI を用いた造影、心電同期や呼吸同期等の撮像法を樹立し、霊長類における心臓、肝臓等の病態を解析した。

6. カニクイザルモデルを用いたウイルス感染症に関する研究:SPF カニクイザル各 7 頭に SIV を接種したところ、産地に差異はなかった。

7. PTEN 抑制物質投与による霊長類誘起排卵数増加法の基礎的検討:カニクイザルでの排卵の上昇を期待し、PMSG と同時に PTEN 阻害剤 (bpV(pic), 30 μ g) を A/J マウスに投与すると非投与に比べ排卵数の増加傾向が認められ、カニクイザルへの基礎的データが得られた。

D. 考 察

霊長類を用いた医科学研究は世界中で推進され、世界的にも新規の霊長類センターの開設や既存の霊長類センターの拡大を行っている。これら霊長類を用いた研究の主たる目的は基礎医学から臨床医

学、創薬への発展を目的としたものであり、その成果も著しい。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターは我が国で唯一の医科学研究を目的とした霊長類センターであり、さらに 1,500 頭以上のカニクイザルの系統を維持し、SPF 化している世界で唯一の機関である。これらカニクイザル資源に関しては世界的にも評価が高く、近年は当センターカニクイザルの全ゲノムシーケンスの解析にも成功している。本研究ではこれらカニクイザルをさらに高度化し、創薬への利用の促進につなげることを試みている。

実験動物としての霊長類はそれ自体を SPF 等で高度化していくこと、さらにはモデル動物の作製や解析により、具体的な疾患への対応に対し高度化して有用性を高める必要がある。本研究ではこれらを同時に行い、創薬への有用性を氏名 s 多と考えられたが、さらなる疾患への対応が今後も継続されることが必要絵あると考えられた。

E. 結 論

カニクイザルを実験動物としての高度化を行い、創薬への有用性を示した。

F. 研究発表

分担研究報告書参照

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

ワクチン開発における霊長類を用いた基盤技術の開発

研究分担者：保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究要旨

経鼻投与ワクチンは近年、急速に開発が行われているが、その粘膜局所における解析はヒトと抗原認識機構が異なるマウス等以外ではほとんど行われていない。本研究ではカニクイザルに全粒子不活化インフルエンザウイルスを経鼻投与し、その変化を解析した。鼻粘膜では投与後6時間で炎症が認められ24時間後ではその炎症が消滅した。また、ウイルス抗原も6時間後にはマクロファージ等に粘膜固有層に伝達されていたが、24時間後には抗原は認められなかった。以上の事から粘膜投与ワクチンでは急性炎症を誘発し、抗原が取り込まれ、24時間以内にはその反応が消滅していると考えられた。

A. 研究目的

近年、急速に研究、開発が行われている経鼻投与ワクチンは粘膜免疫を誘導することから、その効果に期待が寄せられている。しかしながらその局所反応や免疫系の認識機構の解明はヒトと構造や抗原認識機構が異なるマウス等で行われているのが大半である。カニクイザルはヒトに極めて近い鼻腔内の構造をもっており、ヒトと同様マウス等で抗原認識に重要な組織である NALT も保持していない。本研究ではヒトに類似の構造を持つカニクイザルにおいて粘膜ワクチン投与時における病理学的変化と抗原の認識について検討し、ヒト経鼻投与ワクチンへの新たな知見を与えることを目的とした。

B. 研究方法

カニクイザル (6~11歳、2.8~3.5kg) を麻酔投与下、仰臥位で固定後、鼻腔より不活化全粒子インフルエンザウイルスを滴下し、10分間保持した。投与後0時間(コントロール)6時間、24時間後に解剖を行い、ホルマリン固定の後、HE染色にて鼻粘膜の病理的解析を行った。また、抗ウイル

スモノクローナル抗体、抗マクロファージ抗体 (Iba1) および DAPI による免疫組織化学染色を行った。

(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

鼻粘膜にウイルス液滴下後6時間で既に炎症像が認められるが、その炎症は24時間後では消滅していた (Fig.1)

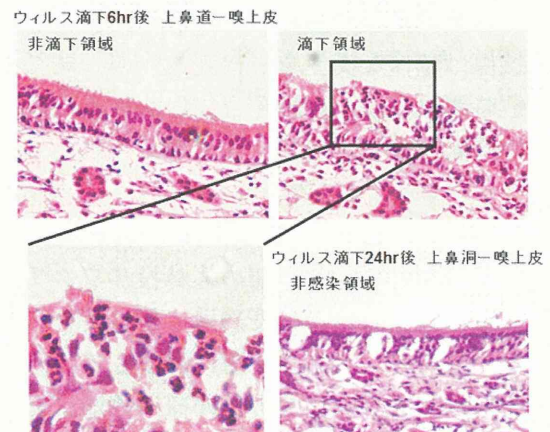


Fig. 1ウイルス液滴下後の組織変化

この時のウイルス抗原は上皮細胞に強く認められ、一部は固有層のマクロファージに取り込まれていた (Fig. 2)。

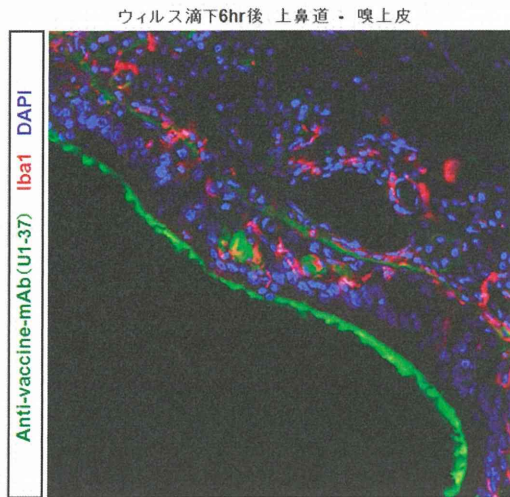


Fig. 2 ウイルス液滴下後のウイルス抗原およびマクロファージ

また、24時間後ではウイルス抗原は認められなかった (Fig. 3)。

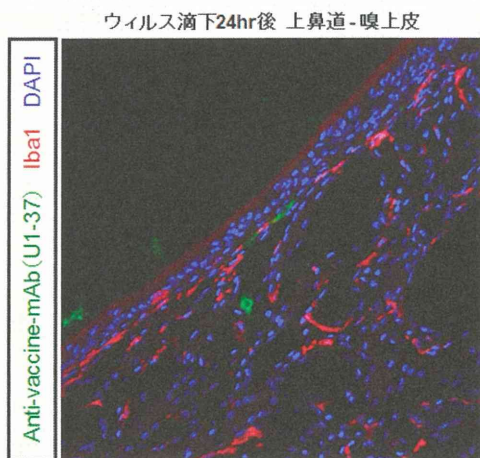


Fig. 3 ウイルス液滴下後のウイルス抗原およびマクロファージ

以上の事より経鼻投与におけるワクチン抗原は急速な炎症を引き起こすが、非常に短時間であり、鼻粘膜上皮における抗原も短時間で吸収、消失すると考えられた。

D. 考察

インフルエンザを初め経鼻投与ワクチンは呼吸器等の粘膜免疫誘導に優れていることから研究、開発が急速に進歩している。実験動物を用いた解析も同様に急速に進歩し多くの報告がなされている。しかしながら、マウス等の実験動物は呼吸器粘膜にお

ける抗原の認識機構が異なり、ヒトとの比較が困難である。カニクイザルはヒトと類似の構造をもち、抗原認識機構においても、極めて類似の機構であると考えられる。本研究ではヒトでは知見を得ることが出来ない感染初期における抗原発現や局所の変化がカニクイザルにおいて検討され、呼吸器等の粘膜感染の病態研究や今後も開発が進むであろう粘膜投与ワクチンにおいて多くの治験を与えると考えられた。

E. 結論

経鼻投与ワクチンの粘膜での病態解明は霊長類で多くの知見が得られると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. Vaccine in press
- 2) Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. Proc.Natl.Acad Sci. USA in press
- 3) Wada T, Kohara M, Yasutomi Y.DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. Vaccine 2013;31;5968-5974.
- 4) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M,

- Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. *PLoS One*. 2013 8(7): e66614
- 5) Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation*. 2013 85:131-139.
- 6) Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y, Aonuma K. Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013, 27:413-424.
- 7) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*. 2013 Jun;94(Pt 6):1318-24.
- 8) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Arch Virol*. 2013,158:1209-20.
- 9) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother*. 20139(2) 283-290.
- 10) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect*. 2013 5:56-65.
2. 学会発表
- 1) Watanabe K, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with recombinant vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed mycobacteria-specific immunity. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 2) TSUJIMURA Yusuke, YASUTOMI Yasuhiro. The recognition mechanisms of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, in vivo 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 3) 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩. BCGウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン第3回感染症若手フォーラム 長崎 2014
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月10日-12日
- 5) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 産地別SPFカニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究第27回日本エイズ学会 熊本 2013年11月20 - 22日
- 6) 保富康宏 インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT細胞 (Th) の病態への関与 「シンポジウム：もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」第

54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月
8-9日 倉敷

- 7) 保富康宏 教育講演：「ワクチン開発の
ストラテジー：HIVワクチン・結核ワクチ
ン開発の経験から」 ワクチン開発に必要な
研究を取り巻く環境の重要性 第17回日
本ワクチン学会 2013年11月30日-12月1
日 津

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

霊長類由来研究資源の保存技術の高度化

分担研究者 山海 直 独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、
主任研究員

研究要旨

カニクイザルは様々な医科学研究に用いられている。その研究資源の確保のため、繁殖・育成技術を向上させる意義は大きい。また、疾患モデルを構築することでより使用範囲を広げることが可能となり、基礎データの蓄積により得られたデータの解析を補助することができる。本研究では、霊長類資源の保存、繁殖技術の向上を目的として、1) 霊長類由来研究資源の開発・保存技術の高度化、2) カニクイザル胎児由来 DNA 解析による雌雄判定技術の高度化、3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析という課題に取り組んだ。また、疾患モデルの開発を目的として4) 新規疾患モデルの作成を目指した子宮内膜症誘発研究を実施した。

A. 研究目的

1) 霊長類由来研究資源の開発・保存技術の高度化

今回、凍結保存された卵巣の移植後の状況を検索した。卵巣はメスの生殖細胞である卵細胞を保有し受精可能な状態に成熟させる臓器である。性ホルモン分泌という内分泌機能も有しており、次世代を残すための重要な臓器である。その卵巣の保存技術の開発はメス生物資源の長期保存が可能となるだけでなく、ヒトへの臨床応用が考えられる。これまでにカニクイザルの卵巣まるごとの保存、融解した卵巣の移植実験を行い、本技術が研究資源の保存に応用できる可能性を見出してきた。ここでは約6年前に移植した個体の卵巣が機能について月経を指標として検索した。

2) カニクイザル胎児由来 DNA 解析による雌雄判定技術の高度化

母体血中の胎児由来セルフリーDNA は、胎児疾患の検出と雌雄判定等に有用である。PCR 法による遺伝子の検出において、Y 染色体に存在する *SRY* (Sex determining region Y) はシングルコピー遺伝子であるため、Y 染色体を持たない母体の血中を循環している胎児 DNA の検出限界の決定で利用されることが多い。いくつかの遺伝子を組み合わせることで、母体血清中の胎児 DNA をより高い感度と特異性で定量されると期待される。今回、感度と特異性を改良する目的で、Y 染色体上の *TSPY* (testis-specific

protein, Y-linked) 領域内で高頻度に反復している *DYS14* 配列の増幅を試みた。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

研究用サル類の繁殖コロニーを保持するうえで、繁殖効率を向上させる意義はきわめて大きい。大規模繁殖コロニーにおいて、いかに効率よく初産を経験させるかが大きな課題の一つとなっている。そこで、初産に焦点をあてて基礎データを解析した。また、性成熟しているにも関わらず妊娠しない個体が存在することからその要因の一端を明らかにすることを目的とした実験を行った。

4) 新規疾患モデルの作成を目指した子宮内膜症誘発研究

マウス・ラットなどの小動物の性周期はヒトと異なり、子宮内膜症の実験動物モデルとしては様々な観点から限界があるといえる。ヒトと同様の月経周期を有するサル類では、これまでにヒヒを用いた子宮内膜症誘因に関する成果が報告されている。今回、実験動物としての基礎データが豊富なカニクイザルを対象として子宮内膜症の誘因を試みた。

B. 研究方法

1) 霊長類由来研究資源の開発・保存技術の高度化

約6年前に5頭のカニクイザルから卵巣を摘出し、まるごと凍結した。1ヶ月の間、

液体窒素中で保存し、その卵巣を融解して元の個体に移植した。

凍結は微弱エネルギーを負荷した環境でマイナス 30℃までプログラムフリーザーを用いて低下させ、その後、液体窒素に入れるという手法で実施した。融解は、37℃のお湯に浸漬することで行い、その卵巣を大腿の骨格筋内あるいは腎皮膜下に移植した。移植した 5 頭のうち 4 頭で比較的早期に月経が出現することを確認しており、性ホルモンの動態からも凍結融解卵巣が機能していることを見出した。これらの個体は現在も外見上問題なく生存しており、今回、月経の状況より卵巣機能について検索した。

2) カニクイザル胎児由来 DNA 解析による雌雄判定技術の高度化

マルチコピー配列である *DYS14* とシングルコピー遺伝子の *SRY* は、マルチプレックス定量 PCR で検出した。PCR による検出は妊娠 5、12、22 週の妊娠カニクイザルの血漿から DNA を抽出して行った。胎児性別判定は出産時に外陰部の形態により確認した。今回の定量結果はリアルタイム PCR で行い、常染色体上のシングルコピー遺伝子である *NQO1* (*NADPH: quinone oxidoreductase*) の定量結果と比較した。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

当センターでは 3 あるいは 4 歳の月経が認められるメスは、妊娠させることを目的としてオスと同居させている。これらのメス個体の妊娠成績を解析した。また、オス 1 頭が 2 頭のメスと 1 日おきに同居する交配方法（隔日同居）を設定し、雌雄同居の翌日にメスの膣スメアを顕微鏡で観察した。すなわち、膣スメア中の精子の有無により交尾の成否を確認した。実験には 6 セット計 12 頭（経産 4 頭、未経産 8 頭）のメスカニクイザルを用いた。

4) 新規疾患モデルの作成を目指した子宮内膜症誘発研究

全身麻酔下でカニクイザルの下腹部正中を切開して開腹し子宮を露出させた。子宮の一部を切除して子宮筋層とともに子宮内膜を採取した。筋層を少し残して子宮内膜をトリミングし数箇所の腹壁に縫合した。さらに細切した子宮内膜を腹腔内に散布した。これらの処置は黄体期に実施した。術

後、疼痛緩和を目的としてブプレルノフィンを投与した。術後は毎日の個体観察を行い、定期的に血液検査、MRI および腹腔鏡下の観察を実施して、病態を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を得て実施した。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。

C. 研究結果

1) 霊長類由来研究資源の開発・保存技術の高度化

まるごとの卵巣を凍結、そして融解後移植した 5 頭のカニクイザルは、移植後、約 6 年経過しているにも関わらず、月経が認められる個体が存在することが明らかとなった。直近 3 年間に確認された月経の回数はそれぞれ、13、8、3、3、1 回であった。

2) カニクイザル胎児由来 DNA 解析による雌雄判定技術の高度化

定量 PCR によって、*NQO1*、*SRY*、*DYS14* のコピー数が、絶対定量として測定された。セルフリーDNA の絶対定量の平均コピー数は、血漿中で 2.24×10^4 コピー/ml で、妊娠初期と後期での違いは認められなかった。セルフリーDNA 中の、*DYS14* 配列の検出は *SRY* よりも 10 倍の高感度であった。さらに、*SRY* と *DYS14* の PCR 反応あたりで検出されたコピー数を比較すると、*DYS14* は *SRY* よりもより多く検出されることが明らかとなった。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

室内繁殖コロニーのカニクイザルは 5 あるいは 6 歳のときに多くが初めての妊娠することがわかった。また、そのとき妊娠しなかった個体においてもオスとの同居を継続することで妊娠する個体は存在するが、10 歳くらいになっても一度も妊娠できない個体も存在することが明らかとなった。さらに、5、6 歳で妊娠した個体は月経周期あたりのオスとの同居回数が 4 回以内で妊娠していた。

隔日同居を行ったメスの膣スメアを観察した結果、8 頭の未経産メスではほとんど精子が確認できず、4 頭の経産メスでは月

経周期に関わらない交尾の成立が認められた。

4) 新規疾患モデルの作成を目指した子宮内膜症誘発研究

誘因処置後、食餌の摂取量および体重減少は認めなかった。1か月後の腹腔鏡下の観察において、使用したすべての個体で縫合した子宮内膜が生着していることを確認した。また、縫合部位以外に小さな病変を認めた個体もいた。また、移植片の生着のみならず嚢胞形成を認めた個体も存在した。

D. 考察

1) 霊長類由来研究資源の開発・保存技術の高度化

ヒトにおいて、様々な手法で卵巣凍結が試みられている。融解、移植後、その卵巣から採取した卵を用いて子どもを得たという報告があるが、移植した卵巣の機能が失活するという課題が残っている。これまで試みられてきた方法は、卵巣を薄くスライスするものが多い。今回、用いた方法はまるごとの卵巣の凍結保存である。理論的には、大きな塊の凍結は困難と考えられているが、凍結時に磁場を暴露することで、凍結するときの液体成分の膨張が抑えられることを確認している。

移植後、約6年経過しており、それぞれの個体の生殖年齢も配慮する必要があるかも知れないが、直近3年間に月経が13回確認できた個体が存在する意味は大きい。ただし、カニクイザルの月経周期は約28日ということ考えるとこの個体も規則正しい月経が認められたとは言い難い。今後、性ホルモンの動態とあわせて解析する必要があると考えている。

2) カニクイザル胎児由来 DNA 解析による雌雄判定技術の高度化

母体血中の胎児由来 DNA が循環しており、オス特異的 DNA を検出することで、雌雄判定が可能となる。これまでにリアルタイム PCR では非常に高い感度と特異性を認め、妊娠5週の個体において100%の確立で雌雄判定が可能であることを実証している。今回の研究により、DYS14 はきわめて高感度で検出できることが確認された。現在は妊娠5週以降の個体で検証しているが、着床後何日目で検出可能か検証したい。着床

後、胎盤が形成され、その直後から微量な胎児由来 DNA が母体の血中を循環している可能性があるが、どのような経路、機序でこのようなことが起きているかは明らかになっていない。また、胎児由来 DNA が母体血中を循環することによってどのような意味があるのか、生物学的な意味を解明することは重要である。動物実験ではオス特異的な DNA の検出が実験系として構築されたが、遺伝子関連疾患の検出や機序解明を目的とした研究を進展させるためには、さらなる基礎技術の開発研究を継続しなければならない。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

室内繁殖コロニーのカニクイザルの多くが5あるいは6歳のときに初めて妊娠するという興味深い結果が得られた。月経の発現はより若くして認められるが、月経の発現だけでは生理学、社会学、あるいは行動学的に完全な性成熟を迎えたとは言えないのかも知れない。また、月経周期あたり4回程度で妊娠に至る個体が多いということは、繁殖効率を考えたシステムを構築するうえで有用なデータである。この4回の月経周期の間にメスが生理学的に成熟するのか、複数回オスと同居することで社会的な成熟を迎えるのかを明らかにしていくことは生物学的にもたいへん意義あるものと考えている。

隔日同居を行った実験では、明確に妊娠経験がある個体で膣スミア中の精子が確認されている。すなわち、妊娠経験がある個体のほうが未経産個体とくらべて交尾が成立し易いといえる。この結果は、妊娠という経験が生殖器の機能に影響し、交尾が成立している可能性がある。あるいは、妊娠経験が社会学、行動学的に生殖行動に関する学習に関連しているのかもしれない。今回用いた個体はすべて定期的なメンスを確認しており、3ヶ月にわたり隔日同居を行っている。すなわち、3回の排卵時期が含まれていることになるが、その排卵時期とは関係なく交尾が成立しているという結果はサル類の特性を示していると考えられる。すなわち、妊娠する可能性がない時期においても交尾を行っていることになり、交尾行動が社会性を構築することに関連していることを示唆している。

4) 新規疾患モデルの作成を目指した子宮内膜症誘発研究

子宮内膜症はヒトの婦人科領域の疾病として多くの研究者が治療法の開発研究に取り組んでいる。しかし、未だ明確な発症要因もわかっていない疾病であり、画期的な成果があがっていない。このような研究を進展させるためにも、優れた動物モデルが必要とされており、月経周期を有するサル類でのモデル作成が望まれている。これまでに、ヒヒを用いた子宮内膜症の誘発実験が報告されていたが、その他のサル種での詳細な報告はない。今回、カニクイザルを用いて高率に子宮内膜を腹壁に定着させることができた意義は大きい。また、縫合により子宮内膜を移植した部分以外にも、小さな病変を確認している。これは腹腔内に散布した子宮内膜が定着した可能性が高く、より自然発症に近い状況と言えるかも知れない。今回は、1年以内の観察で評価しているが長期観察により、このような病態がどのように変化していくか観察していく必要があるだろう。本手法により、子宮内膜症の発症過程の解析が可能となり、また、治療薬の効果の評価も可能になる可能性がある。

E. 結論

今回、霊長類資源の保存、繁殖、疾患モデルに関する研究を実施し、以下の4つの結論を得た。

1) 磁場暴露環境下で凍結したカニクイザルのまるごとの卵巣を融解し移植後の卵巣の機能を月経発現より確認した。移植後、約6年が経過しているにも関わらず、月経が確認できる個体が存在することが明らかになり、本凍結法が塊、すなわち組織や臓器の凍結にも応用できる可能性が示唆された。

2) カニクイザルの母体血中に存在するオス胎児由来DNA解析を試みたところ、DYS14がSRYよりもさらに高感度で検出できることが確認された。本研究は、様々な胎児DNAを母体血中から検出するための手法の開発の可能性を示すものである。

3) カニクイザルの初産に焦点をあてた解析を行ったところ、5、6歳で初めて妊娠する可能性が高いことがわかった。また、

未経産メスはオスと同居しても交尾しないことが多く、明らかに経産歴があるメスが交尾しやすいという結果を得た。その交尾時期は月経周期と関連がないことも多いということが明らかになった。

4) カニクイザルの子宮内膜を腹壁に縫合あるいは散布したところ、高率に生着することが確認された。カニクイザルを用いた子宮内膜症誘発が可能となり、子宮内膜症モデルと成り得る可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Hatori, N. Shimozawa, L. Yasmin, H. Suemori, N. Nakatsuji, A. Ogura, K. Yagami, T. Sankai

Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in neural differentiation from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells

Comparative Medicine (in press)

2. 学会発表

(国際学会)

M. Iwamoto, S. Yazaki, T. Oishi, K. Inoue, A. Ogura, T. Sankai

Production of transgenic cynomolgus monkey embryos using interspecies somatic cell nuclear transfer
The 10th Annual Meeting of Asian Reproductive Biotechnology Society (ARBS) (Hochiminh, Viet Nam)
August 19-25, 2013

J. Otsuki, L. Yasmin, Y. Nagai, A. Lopata, T. Sankai

The influence of ooplasmic volume on pronuclear development
69th American Society for Reproductive Medicine Annual Meeting (ASRM) (Boston, U.S.A.) August 12-17, 2013

(国内学会)

根津幸穂、西本(垣内)綾子、林 修次、加藤淳彦、伊藤恒夫、岡林佐知、Lubna Yasmin、満下淳地、根東 攝、山海 直、今野 良

カニクイザルにおける子宮内膜症外科的誘因モデルの作出

第 35 回エンドメトリオーシス学会（鹿児島）2014 年 1 月 25、26 日

持田菜穂子、長谷川昭子、山海 直、細田容子、荻野 舞、柴原浩章

カニクイザル卵巣における卵胞発育調節因子の発現解析について

Expression of follicle growth regulating factor in monkey ovarian tissue with immunohistochemical analysis

第 54 回日本卵子学会（東京）2013 年 5 月 25 日

吉田麻衣子、小山高正、山海 直

室内飼育環境下におけるカニクイザルのパートナー選択の特性

Characterization of choosing mating partner of cynomolgus monkeys in laboratory breeding colony

第 60 回日本実験動物学会（つくば）2013 年 5 月 15-17 日

Lubna Yasmin、高野淳一郎、永井 泰、大月純子、山海 直

Taqman PCR 法と Southern blot hybridization 法を用いた妊娠カニクイザル血清中胎児由来 DNA の検出

Fetal DNA detection from pregnant cynomolgus monkeys by Taqman PCR and Southern blot hybridization

第 60 回日本実験動物学会（つくば）2013 年 5 月 15-17 日

吉田麻衣子、小山高正、山海 直

飼育カニクイザルによるオスのパートナー選択実験

第 73 回日本動物心理学会（つくば）2013 年 9 月 14-16 日

3. その他

山海 直

IVF J NEWS 2013, No. 56

内容：卵巣まると保存の現状と課題

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

カニクイザルのホルモン解析による繁殖技術の確立

分担研究者 下澤 律浩

独)医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、主任研究員

研究要旨

本研究では創薬研究等に貢献するカニクイザルにおいて、動物資源の高度化、疾患モデルの開発や維持のために、繁殖技術の基盤を強化する意義は大きい。そこで、生殖ホルモン動態から排卵時期を調べたところ、従来の繁殖方法である月経後 11-14 日の雄との同居期間に排卵が生じると推定された未経産雌の割合が 48.9% (23/47) であった。一方、経産雌においては、同居期間中の雄との同居の割合は 64.3% (9/14) であり、これは有意に未経産雌と比較し有意に高かった。現状の雄との同居期間である月経後 11-14 日を月経後 11-18 日に変更することで、同居期間に排卵する未経産個体の割合は 48.9% (23/47) から 63.8% (30/47) に上昇する。未経産個体においては、月経後 11-18 日の 7 日間に雄との同居が効率的に妊娠を得る一つの有効な手段であると考えられた。

A. 研究目的

独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターは我が国で唯一の医科学研究を目的とし、1,500 頭以上のカニクイザルのコロニーを維持し、SPF 化している。このカニクイザルの中には、拡張型心筋症あるいは網膜黄斑変性症のようなヒト疾患モデルとして貴重な家系も存在する。しかしながら、当センターのサルは設立以来、約 30 年以上外部からカニクイザルは導入されておらず、室内環境に馴化されて来た。設立時に採用された繁殖方法が妥当であるか否かを再確認する必要がある、現状に即した繁殖技術の確立が必要である。

本研究ではこのような創薬研究に貢献するカニクイザルにおいて、動物資源の高度化、疾患モデルの開発や維持のために、現状に即した繁殖技術の基盤を強化する意義は大きい。そこで、具体的には生殖ホルモン動態を調べ、排卵時期を明らかにすることで、現状に即した繁殖方法に応用する基盤を構築することを目的とする。当センターのようなクローズドコロニーの飼育環境下にあるカニクイザルの排卵時期は調べられていない。排卵時期を明らかにすることで、カニクイザルの効率的かつ計画的な繁殖・維持に貢献すると考えられる。

B. 研究方法

本研究は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で飼育管理されているカニクイザルを用いて実施した。今後のコロニー維持を担う比較的若い妊娠経験のない5-6才の未経産雌を選抜し、生殖ホルモンの定期的なモニタリングを行い、その排卵時期を調べる。なお、詳細な方法は以下に記す。また比較のために、妊娠経験のある8-21才の経産個体についても同様に調べた。

当センターの主な繁殖方法は、月経初発後の11日目の午後から14日の午前までの3日間に雄との1対1同居である。基本的にこの同居期間に排卵が生じなければ、例えば交配が行われたとしても妊娠は成立しない。そこで、雄との同居期間中に排卵が起こっているか否かを調べるするために、血中エストラジオール (E2) を測定した。月経後およそ8日目から適時、血液を採取し、分離した血清中の E2 値を蛍光酵素免疫装置 (AIA-360) で測定した。一般的に、排卵は E2 のピーク値の翌日に生じる。E2 値については 100 pg/ml 以上の差が生じた時にピークを過ぎたものと判断した。また、排卵する頃に分泌量が上昇する妊娠の維持に必要なホルモンであるプロゲステロン (P4) も同様に測定した。

(倫理面への配慮)

カニクイザルを使用するにあたり独立行政法人医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を受けている。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。

C. 研究結果

従来の繁殖方法である雌雄同居期間 (月経後 11-14 日) に排卵が推定できた未経産個体の割合は 48.9% (23/47)、およびそれ以後 (月経後 15-24 日) に排卵した割合は 31.9% (15/47) であった (図 1)。一方、経産個体において、月経後 11-14 日に排卵が推定できた割合は 64.3% (9/14)、およびそれ以後 (月経後 15-24 日) の割合は 28.6% (4/14) であった (図 1)。雌雄同居期間に推定された排卵の割合において、未経産個体は経産個体と比べ、有意に低かった ($p < 0.05$)。また、P4 においては、排卵時期に上昇することから、E2 および P4 の両者を測定することで、排卵時期が判断しやすくなることも確認できた。

未経産および経産個体の残りの個体については、約 2 週間ホルモンの測定を行ったが、排卵を推定できなかった。その割合は、それぞれ 19.1% (9/47) および 7.1% (1/14) であり、前者は有意に高かった ($p < 0.05$)。

D. 考察

従来の繁殖方法である月経後 11-14 日の同居期間に、排卵が生じると推定された未経産雌はおよそ半数であることが明らかになった。一方、経産雌においては、同居期間中の雄との同居は 6 割に達し、これは未経産雌の場合と比べ、有意に高かった。このような現状は、今後のコロニーマネジメントに対し、負の影響を及ぼす。つまり、

未経産個体の不妊が多くなれば、それだけ実験に供給できる個体が削減され、コロニーの肥大化に至る恐れがあるからである。そのようなことに対処するために、雌の排卵時期と雄との同居を同期させ、交配する状況を作り、妊娠を得る必要がある。単に、長期に同居しても妊娠が得られないことも観察されていることから、排卵時期の短期間の雌雄同居は妊娠を得るための効率的な飼育管理に貢献するものと考えられる。以上から、現状の3日間同居（月経後11-14日）ではなく、7日間同居（月経後11-18日）のように同居期間を延長することで、同居期間に排卵する個体の割合は48.9%（23/47）から63.8%（30/47）に上昇することから、有効な繁殖方法になるものと考えられる。

また、未経産雌においては、排卵が推察できない個体が19.1%で観察され、経産個体と比べ有意に高い割合であることが確認された。排卵が推察できない個体のホルモンを測定した性周期の次の月経が長期に認められないことも確認される。これがどのような原因で生じているかを明らかにすることで、繁殖不適個体として抽出し、排除することで、繁殖用コロニーのスリム化、つまり無駄な個体の維持および交配を行わないことで、より安定した個体供給に繋がると考えられる。

カニクイザルの初潮は3-4才に確認される。このようなことから今回調べられた5-6才の未経産雌においては、若すぎることから性周期が安定していない可能性が考えら

れる。排卵時期が推定できなかった個体が2割近くも存在したことはこの考えを支持する一つの理由である。一方、経産雌については、8-21才と年齢的に性周期が安定している可能性がある。そのため、未経産個体と比べ、経産個体は月経後11-14日の間に排卵が推定される個体が有意に高く、また、排卵を推定できなかった個体が有意に低い要因であると思われる。しかし、未経産個体において、早期に繁殖するか否かの判断はコロニーのスリム化には必要である。このような観点から、特に若い未経産個体においては、月経後11-18日の7日間に雄と同居することが、効率的に妊娠を得る一つの有効な手段であると考えられた。

E. 結論

今後の繁殖コロニーを担う若い未経産雌において、従来考えられていた排卵時期が延びていることが確認された。これは繁殖効率を大きく低下させる要因の一つであることから、コロニーのスリム化の観点からも、繁殖方式の変更を行う必要性が大いにあることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nobuhiro Shimozawa, Ryoichi Ono, Manami Shimada, Hiroaki Shibata, Ichiro Takahashi, Hiroyasu Inada, Tatsuyuki Takada, Tetsuya

Nosaka, Yasuhiro Yasutomi. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation*, 85:131-139, 2013.

2) Masanori Hatori, Nobuhiro Shimozawa, Lubna Yasmin, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Atsuo Ogura, Ken-ichi Yagami, Tadashi Sankai. Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in neural differentiation from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells. *Comparative Medicine*, *in press*.

2. 学会発表

1) 下澤律浩、藤城修平、水上喜久、阿部朋行、花園豊. カニクイザル初期胚を用いた ES 細胞

の特性に関する検討. 第 54 回日本卵子学会、2013 年 5 月、東京.

2) 冷岡昭雄、成田勇人、前島正雄、東郷 睦、小野文子、下澤律浩. 血中ホルモンの測定による人工授精時期の検討. 第 60 回日本実験動物学会、2013 年 5 月、茨城県つくば市.

3) 木村展之、岡林佐知、小野文子、上田直也、下澤律浩、保富康宏、柳澤勝彦. Retromer の加齢性局在変化と Dynein 機能障害との関係. 第 32 回日本認知症学会、2013 年 11 月、長野県松本市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

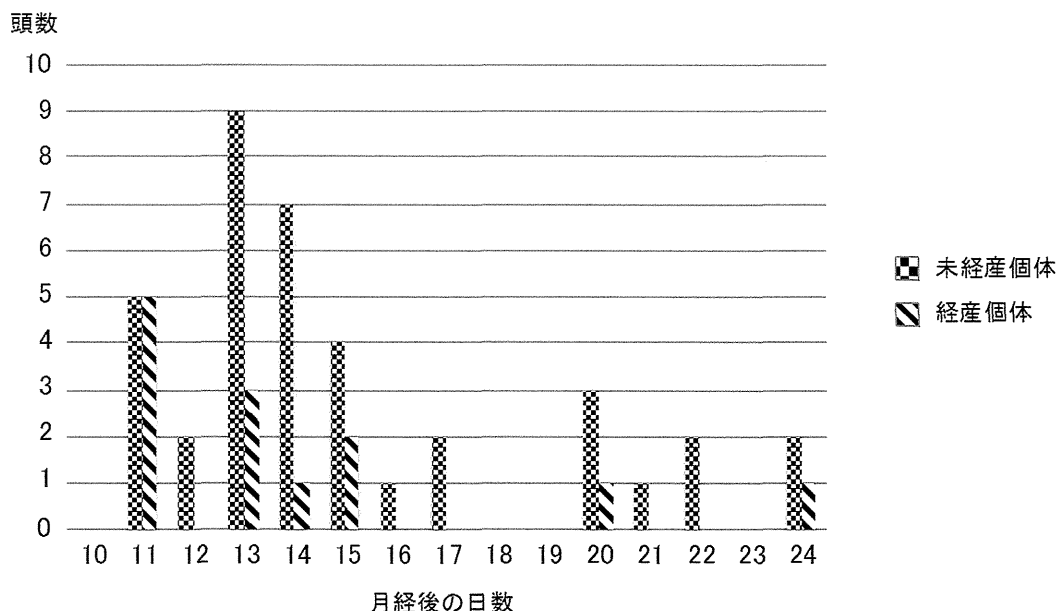


図1. 推定された排卵時期

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

霊長類循環器疾患モデルの解析に関する研究

研究分担者 揚山直英 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 主任研究員

研究要旨

近年、再生医療研究等の必要性が高まるに伴い、ヒトと近縁な霊長類の各種疾患モデルを用いた研究が増加する傾向にある。しかしながら、未だヒト病態を忠実に反映した霊長類の循環器疾患モデルの報告は少ない。こうしたことから、霊長類循環器疾患モデルを構築し、その詳細な解析を行うことで、心臓病態学、生物資源研究のみならず医科学研究や厚生労働行政への貢献が大いに期待される。今回は、MRI を用いて心電図同期や呼吸同期、造影 MRI 等の撮像法を樹立し、霊長類における心臓および肝臓病態の解析を行った。その結果、拡張型心筋症個体においては心臓壁運動のびまん性低下、また肝腫瘍個体においては造影効果による腫瘍描写に成功した。さらに、病理組織学的検索においてもそれらの所見を裏付け、心筋の線維化領域を抽出する事にも成功した。これらの結果は霊長類循環器疾患および肝疾患がヒト病態を忠実に反映し、モデルとしての可能性を示唆するものである。さらにこれらの解析を通し樹立された画像診断を用いた評価系が今後、霊長類疾患モデルの安全性・有効性評価等に有用なツールとして役立てられることが示唆された。今後はさらなる解析を通し、霊長類資源としての可能性を模索する予定である。

A. 研究目的

循環器疾患は世界各国で大きな問題となっており、その病態解明、新規診断・治療法開発研究は極めて重要である。しかしながら、未だヒト病態を忠実に反映した霊長類の循環器疾患モデルの報告は少ない。こうしたことから、霊長類において循環器疾患個体を構築し、その詳細な解析を行う事ができれば、心臓病態学、生物資源研究のみならず医科学研究や厚生労働行政への貢献が大いに期待される。

再生医療・遺伝子治療・創薬研究などにおいては霊長類を用いた有効性・安全性評価の需要が今後ますます増え続ける事が予想される。それら評価の方法としてはイメ

ージング技術を用いた評価系が最適である事から、霊長類における画像診断を樹立することが必須となる。

そこで今回我々は、MRI を用いた心電図同期や呼吸同期および超常磁性酸化鉄微粒子 (SPIO) 投与による撮像法を駆使し、霊長類における心臓および肝臓における病態の詳細な解析を試みた。

B. 研究方法

これまで、カニクイザル繁殖コロニーにおいて超音波、心電図、X 線、各種血液検査などにより樹立されている拡張型心筋症モデルを対象として、3T-MRI を用い、心電図および呼吸同期撮像法を用いた Cine-MRI

を撮像することにより、心臓壁運動の評価を行った。さらに同検査等により確認された肝腫瘍が疑われる個体においては呼吸同期撮像法および超常磁性酸化鉄微粒子 (SPIO) 投与による造影 MRI を行う事によって腫瘍病変部の抽出を行った。さらに、これら個体から得られた心臓および肝臓の病理組織学的検索を行いそれぞれの MRI 所見と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を受け、さらに法律第105号「動物の愛護および管理に関する法律」、文科省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」、霊長類医科学研究センターの指針である「サル類を用いた実験の詳細」を遵守して遂行した。動物の取扱は全て麻酔下で行う等、苦痛の排除に努め、動物飼育管理にも万全の配慮を行い実験を実施した。

C. 研究結果

拡張型心筋症

対象となるカニクイザルは心拍数が早く (平均 150bpm 程度)、呼吸が浅いため麻酔濃度や同期スピードなどの調整が必要ではあったが、3T-MRI において心電図および呼吸同期撮像を適応することによって Cine-MRI の画像を得る事に成功した。それらを用いて拡張型心筋症個体二頭の撮像を行った結果、正常個体と比較していずれも明らかな左心室壁運動のびまん性の低下が認められた (図 1)。これはこれまで得られた超音波、心電図、X 線、各種血液検査などとも一致し、左室機能不全の病態を忠実に描写しているものである。さらに、死亡した一頭の病理組織学的検索において認め

られた左室心筋の全周性の線維化層の所見は MRI 所見を支持するものであった。また、これら病理組織標本から線維化面積を抽出することにも成功した (図 2)。

肝腫瘍

呼吸同期撮像法および SPIO 投与による造影 MRI により、肝臓短軸断の T2 強調画像において腫瘍組織と正常組織のコントラスト増強効果を得る事が出来、右葉左葉に広く分布する肝腫瘍の局在診断を行う事に成功した (図 3)。これは正常な肝臓に存在するクッパー細胞が SPIO を貪食することによって MRI による信号が低下し、クッパー細胞が存在しない腫瘍病変部の信号がより強調されて抽出される造影効果によるものであり、霊長類の肝腫瘍個体で初めて造影 MRI の所見を得ることに成功した。また、肝臓の病理組織学的検索では肝細胞に強い異型性と浸潤性を認め、低分化の肝臓原発悪性腫瘍所見が示された。

D. 考察

拡張型心筋症

心電図および呼吸同期撮像法を用いた Cine-MRI により認められたびまん性の左心室壁運動低下は拡張型心筋症の病態である心不全状態を忠実に再現するものである。さらに病理組織学的検索から得られた全周性の線維化層とそれら MRI 所見が一致する事から本モデルがヒト病態を忠実に反映する事が示唆された。これらのことから本モデルがヒトのモデルとして有用な生物資源である事が示唆された。さらに、線維化面積を抽出する事に成功したことから、拡張型心筋症モデルや心筋線維化を伴う循環器疾患の新たな病態定量評価の可能性が示唆された。