

ヒトに比べ血球が小さい事が示唆された。また、MCH もヒトに比べ低い値を示し、アカゲザルと比較しても更に低い値を示していることから、カニクイザルではより低色素性の赤血球となっていることが示唆された。

年齢に関しては RBC count、HGB、HCT で正の相関、MCV、MCH で負の相関が認められ、有意差検定でも RBC count、HGB、HCT は年齢が増加するに従い増加し、MCV、MCH で有意に低下する加齢性の変化が認められた (図 3)。これらは他の霊長類でも同様の結果が報告されており、加齢に伴い体内水分含有量の低下が起こり、血液濃縮様の状態を呈している事が示唆された。

心疾患との関連：

最後に、今回データを得た個体より、心疾患の病歴の有無を基に比較を行ったところ、血液ガス項目では、 pCO_2 、 HCO_3std 、B. E. (vt)、 $ctCO_2$ 、全血球計算項目では W-MCR、W-MCC で差が認められた。特に、 pCO_2 では正常群の平均値が 35.72 ± 6.88 であるのに対し、心疾患群では 38.15 ± 4.62 で、有意な差が認められ、これらは、心機能低下と関連した pCO_2 の上昇が認められるヒトの心疾患例の報告とも一致しており、心機能低下の症状を良く反映している結果であると推察される。また、B. E. (vt)、 $ctCO_2$ 、 HCO_3std でも心疾患群が高値を示す傾向が認められた。これらは心疾患群がアルカローシスに傾いていることを示し、心臓の循環機能の低下により換気能力が低下する心疾患の特徴に一致している。これらのことからカニクイザルの血液ガス基準値は循環器疾患モデルの解析に有用である事が示唆された。

E. 結論

本研究の結果よりカニクイザルにおける血液ガスおよび全血球計算の基準値が樹立された。さらに加齢に伴う変化が認められる項目があり、加齢性モデルとしての可能性が示唆された。また、ヒトとの違いや相同性が明らかとなった。さらに心疾患モデルの病態が反映された結果であることも示唆された。すなわち、これらの基準値および結果はサルを用いた循環器疾患研究に有益であると共に、サル自体の健康管理にも役立つものである。今後は循環器疾患モデルとの関連性の詳細な解析等を通し、さらなる霊長類資源の可能性を模索したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto Y, Hiramatsu Y, Ageyama N, Sato S, Kanemoto S, Sato Y, Sakakibara Y. Cardiopulmonary Bypass Induces Recruitment of Bone Marrow-Derived Leukocytes to the Lungs in Monkeys. *Ann Thorac Surg.* 97: 617-622. 2014.
- 2) Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y, Mineno J. CD4(+) T Cells Modified by the Endoribonuclease MazF Are Safe and Can Persist in SHIV-infected Rhesus Macaques. *Mol Ther Nucleic Acids.* 3:e168. 2014.

2. 学会発表

- 1) 藤城康世, 鯉江洋, 柴田宏昭, 岡林佐知, 片貝祐子, Boran Osman, 金山喜一, 保富康宏, 揚山直英: 再生医療評価系としてのカニクイザル MSC を用いた細胞標識の解析、第 61 回日本実験動物学会総会、北海道、2014 年 5 月 15-17 日。

- 2) 森谷忠生, 平松祐司, 古垣達也, 茂木芳賢, 縮共恭一, 山本純偉, 金本真也, 後藤行延, 揚山直英, 松下昌之助, 榊原謙: カニクイザルを用いた体外循環モデルの確立、第52回日本人工臓器学会大会、北海道、2014年10月17-19日.
- 3) 藤城康世, 岡林佐知, 鯉江洋, 金山喜一, 保富康宏, 揚山直英: カニクイザルに認められた肝細胞癌の生前MRI診断を実施した一例、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日.
- 4) 中山駿矢, 鯉江洋, 金山喜一, 片貝祐子, 山海直, 揚山直英: カニクイザルにおける血液ガスおよび全血球計算基準値の確立に関する研究、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日.
- 5) オスマン ボラン, 鯉江洋, 岡林佐知, 藤城康世, 金山喜一, 揚山直英: 霊長類における心拍変動およびアドレナリン受容体の加齢性変化、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日.
- 6) Yasuyo Fujishiro, Hiroshi Koie, Hiroaki Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Kiichi Kanayama, Yasuhiro Yasutomi, Naohide

Ageyama. Enhanced magnetic resonance imaging of Spontaneous Occurring Hepatocellular Neoplasia in Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation, Vietnam, 2014年10月14-17日.

- 7) Yuko Katakai, Syunya Nakayama, Hiromi Ogawa, Mayuko Tanaka, Akio Hiyaoka, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Yasuhiro Yasutomi. Age-related changes on hematological, serum biochemistry and blood gas parameters in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation, Vietnam, 2014年10月14-17日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

表 1. 雌雄における体重および年齢の平均値

	頭数	体重 (kg)		年齢	
		平均値 (範囲)		平均値 (範囲)	
雌	44	3.64±1.09 (1.10 - 6.18)		21.36±9.39 (2 - 35)	
雄	20	5.74±1.02 (3.88 - 7.58)		17.05±8.94 (8 - 32)	

表 2. 主要血液ガス項目の臨床学的意義

項目名		臨床学的意義
ガス交換能力の指標	pCO ₂	二酸化炭素分圧 肺胞換気量の指標で、高値を示した場合は換気不十分、低値では過換気であることを示す。
	pO ₂	酸素分圧 血液の酸素化能力の指標であり、大気圧や外気酸素濃度などの環境要因、肺胞の換気量、拡散能、シャントなどの肺胞におけるガス交換能力により左右される。
	O ₂ SAT (SpO ₂)	酸素飽和度 血中 Hb と酸素の結合割合。PaO ₂ と相関する (酸素解離曲線)。
	ctCO ₂	血中 CO ₂ 濃度 血中の溶存二酸化炭素濃度を示す。ctCO ₂ の増加は換気不全を意味する。
酸塩基平衡の指標	pH	水素イオン濃度 水素イオン量を示す。アカゲザルの場合、7.45±0.04 以内が正常との報告がある。
	Anion GAP	Cl ⁻ 、HCO ₃ ⁻ 以外の陰イオンの総量。これらは通常測定されない陰イオンで、正常の場合は磷酸イオン・硫酸イオンなどが含まれる。特殊な病態では、乳酸・ケトン体なども含まれる。
	HCO ₃ std	標準重炭酸イオン 重炭酸イオンの指標で、腎臓における酸塩基平衡を示す。高値を示した場合は代謝性アルカローシス、低値では代謝性アシドーシスとなる。HCO ₃ に関しては呼吸性にも値が変化する。
B. E. (vt)	Base Excess in vitro Base Excess は Buffer base の正常値からの偏移の度合いを示す。正の値は塩基の過剰 (代謝性アルカローシス) を、負の値は塩基の欠乏 (代謝性アシドーシス) を示す。	

「Hongo, T. , Hiroshige, T. and Toyota, J. 標準生理学. 第6版. 医学書院」参照

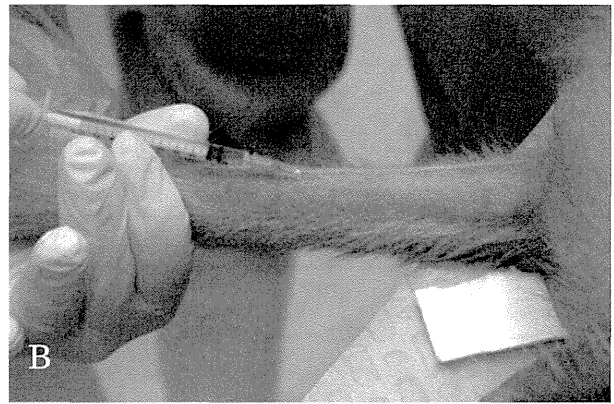


図 1. カニクイザルにおける動脈血採取

大腿動脈(A)および尾動脈(B)の何れの部位から採取した動脈血も全ての項目で同一の値を示す事が確認された。

表 3. 血液ガス検査項目および平均値

検査項目	平均	SD	MAX	MIN
pH	7.39	0.08	7.49	6.99
pCO ₂	36.67	6.00	50.90	9.70
pO ₂	89.91	12.69	122.20	57.20
Na ⁺	148.11	4.43	154.00	127.00
K ⁺	3.80	0.48	5.06	2.71
Ca ⁺⁺	1.21	0.07	1.40	1.04
HCO ₃ act	21.30	3.39	25.00	15.20
HCO ₃ std	22.80	4.00	28.80	6.60
B. E. (vv)	-4.04	4.16	1.20	-10.20
B. E. (vt)	-2.16	5.34	4.80	-27.20
ctCO ₂	23.38	4.90	30.80	2.60
Ca ⁺⁺ (7.4)	1.21	0.06	1.40	1.07
O ₂ SAT	96.49	1.58	98.60	91.00
Cl ⁻	107.13	3.42	115.00	89.00
Anion GAP	18.04	6.26	30.90	0.50

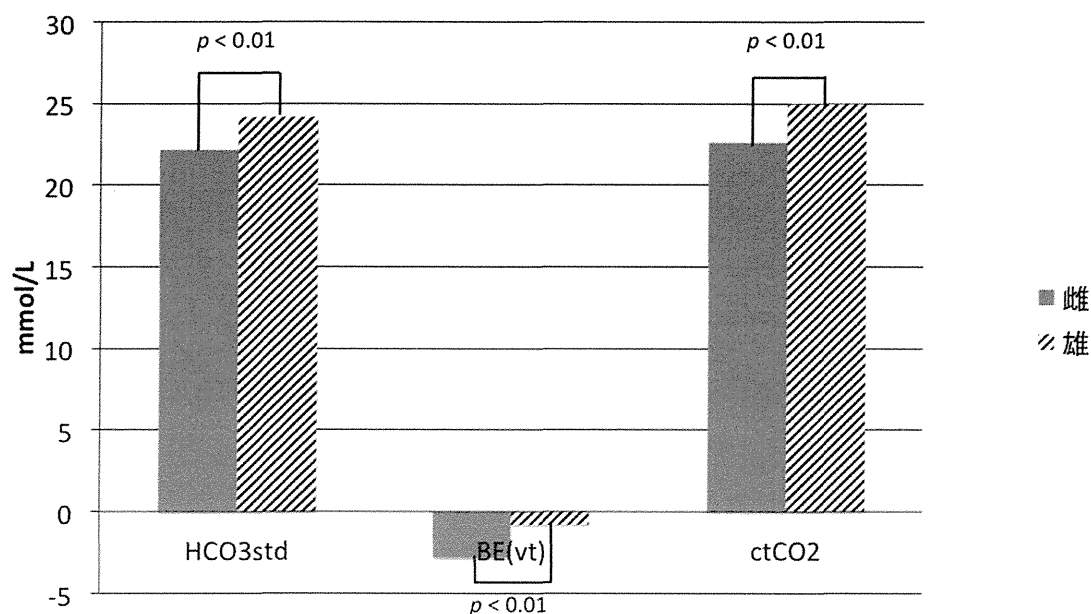


図 2. HCO₃、B. E. (vt)、ctCO₂ の雌雄比較

血液ガス検査項目の雌雄に関する比較では HCO₃std、B. E. (vt)、ctCO₂ において有意な差が認められた。

表 4. 全血球計算検査項目および平均値

検査項目		平均	±SD	MAX	MIN
WBC	×10 ² /μl	82.86	26.40	146	29
RBC	×10 ⁴ /μl	649.64	100.15	880	380
HGB	g/dl	12.56	1.79	16.2	7.2
HCT	%	43.69	5.85	59.1	26.8
MCV	f1	67.64	4.59	79.1	59
MCH	pg	19.46	1.89	23.6	13
MCHC	g/dl	28.75	1.69	33.7	20.6
PLT	×10 ⁴ /μl	33.07	9.23	63.2	10.9
W-SCR	%	41.92	14.96	73.9	10.8
W-MCR	%	8.59	4.64	22.1	2.2
W-LCR	%	51.36	15.09	84.5	24.4
W-SCC	×10 ² /μl	34.30	16.26	81	9
W-MCC	×10 ² /μl	7.17	5.16	27	2
W-LCC	×10 ² /μl	43.79	21.18	118	15
RDW	f1	35.13	2.50	41.6	30.3
PDW	f1	11.87	2.23	18.6	8
MPV	f1	9.73	1.16	13	7.2
P-LCR	%	23.45	9.21	48.6	6.7

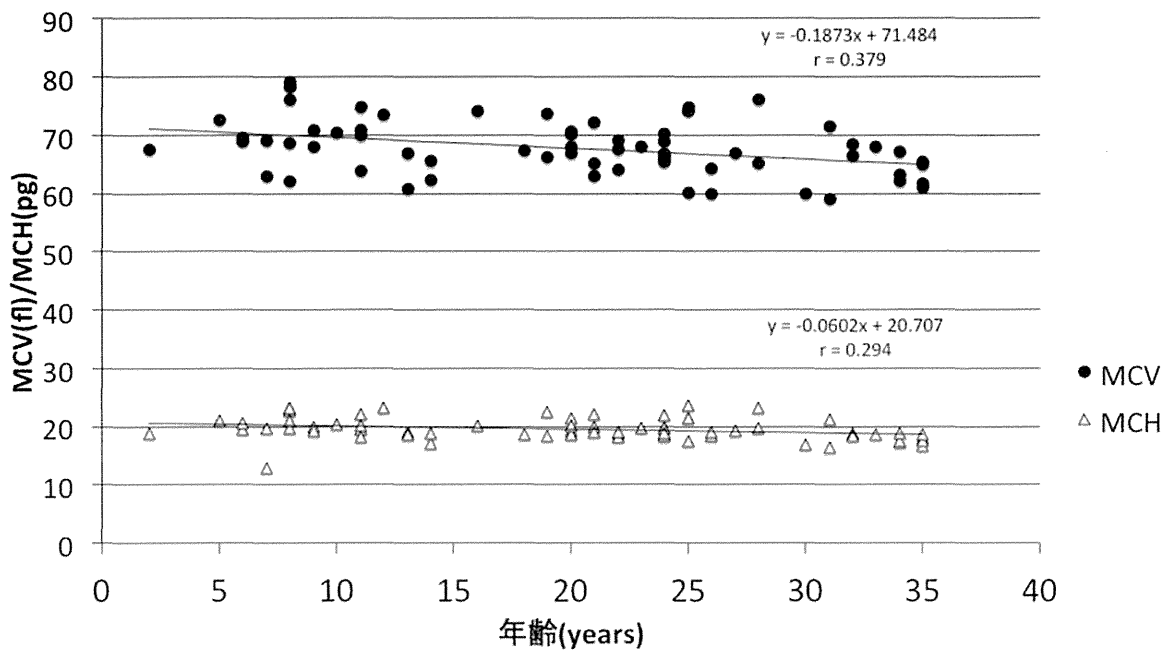


図 3. 年齢と MCH、MCV の関連

加齢に伴い、RBC count、HGB、HCT が増加するのに対し、MCH、MCV は減少する傾向が認められた。

厚生労働科学研究費 創薬基盤推進研究事業
分担研究報告書

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

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

霊長類医科学研究センターでは、原産地（インドネシア、フィリピン、マレーシア）を把握したカニクイザルの SPF 繁殖コロニーを確立し、良質なカニクイザルの供給体制を整えている。本研究では、産地および系統が明らかな SPF カニクイザルを用いて SIV とカニクイザルの感染系の確立を試みる。本年度は、SIV および SHIV 感染慢性期における病態および免疫反応について検討した。SIVmac239 接種後 50 週を超えたカニクイザルのウイルス量は平均 1.6×10^6 /ml、ウイルス量の高い個体では CD4+T 細胞の減少が認められた。一方、SHIV89.6P 感染カニクイザルでは、接種後 50 週を超えて平均 1.1×10^4 /ml、CD4+T 細胞は接種直後から急激な減少が認められ、現在まで回復はみられなかった。これらのサル免疫反応について検討したところ、SIV 抗体価は SIV 接種カニクイザルで接種後、速やかに抗体の上昇が認められた。また IFN- γ 産生細胞数も時間経過と共に強い反応が認められた。SHIV 接種カニクイザルでは、抗体価および IFN- γ 産生細胞数は SIV 感染カニクイザルと比較して低値を示し、CD4+T 細胞（ヘルパーT 細胞）の喪失が関連していると考えられた。また接種後 1 年を経て、SIV 感染した 7 頭中 2 頭でエイズ病態（エイズ脳症 1 頭、多発性血管炎 1 頭）、SHIV89.6P 感染した 5 頭中 1 頭で間質性肺炎を呈し、それぞれ安楽殺を行った。これらの結果から、エイズ感染カニクイザルは、産地に関係なく高いウイルス量を検出し、またヒトのエイズ病態と類似の症状を呈することから、エイズ動物モデルとして有用であると考えられた。

A. 研究目的

感染症研究における実験動物としての霊長類は極めて重要であり、特にワクチン研究において霊長類を用いた検討は必須となっている。HIV は人以外ではチンパンジーにしか感染せず、そのチンパンジーもエイズを発症することがない。このためにエイズウイルス感染症では HIV と近縁ウイルスであり、エイズを発症する SIV とアカゲザルの実験系を用いて、病態やワクチン開発研究等が行われてきた。

霊長類医科学研究センターでは、SPF 化されたカニクイザルを繁殖し、実験に供給することが可能である。カニクイザルはアカゲザルよりも小型で取り扱い易く、世界中で様々な動物実験に用いられている。しかしながら、SIV に対する感受性・病原性

といった詳細な研究は行われていない。

本研究では、当センターで繁殖育成され原産地（インドネシア、フィリピン、マレーシア）が明らかになっている SPF カニクイザルを用いて、サル免疫不全ウイルス（SIVmac239）およびサルヒト免疫不全ウイルス（SHIV89.6P）の病態を明らかにする。これまでの研究で、SIVmac239 および SHIV89.6P 感染カニクイザルの急性期における病態を明らかにした。本年度は慢性期における病態（ウイルス量および CD4+T 細胞）および免疫応答（細胞性免疫応答・液性免疫）について検討を行う。

B. 研究方法

1. 接種スケジュール

エイズ病態を明らかにするため、各産地

SPF カニクイザル 7 頭に SIVmac239、5 頭に SHIV89.6P の静脈内接種を行った。ウイルス接種後、ウイルスコピー数、CD4+T 細胞数および免疫学的解析を行った。

2. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞数

ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。また CD4+T 細胞数の算定には、フローサイトメーターを用いて検討した。

3. SIV 特異的抗体価の測定

採血より採取した血漿を用いて、SIV 抗原特異的な ELISA 法を行い、抗体価を測定した。

4. 細胞性免疫反応の解析

経時的な採血より分離した PBMC (接種後 4, 16, 50 週)は、エフェクター細胞とし、抗原提示細胞には、各自己由来の B-LCL に SIVgag-pol 遺伝子および env 遺伝子を組み込んだワクシニアウイルスを感染させた感染細胞をそれぞれ用いた。エフェクター細胞および抗原提示細胞を共培養し、抗原特異的 IFN- γ 産生 ELISPOT assay を行った。

5. 病理組織学的解析

エイズ病態を呈したカニクイザルは安楽殺を行い、各臓器・リンパ節を回収し、病理組織学的解析を行った。

6. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請、バイオセーフティー、組換え DNA 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. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞の動態

SIVmac239 接種後 50 週を超えた慢性期におけるカニクイザルのウイルス量は、平均 1.6×10^6 /ml であった。また比較的ウイルス量の高い個体では、CD4+T 細胞の強い減少が認められた。一方、SHIV89.6P に感染したカニクイザルでは、接種後 50 週を超えて

平均 1.1×10^4 /ml であり、また CD4+T 細胞は接種直後から急激な減少が認められ、CD4+T 細胞の枯渇状態は継続して確認された。(図 1A, B)。

2. SIV 特異的抗体価の測定

経時的に採取した血漿を希釈して、SIV 特異的抗体価を測定したところ、SIV 感染カニクイザルでは感染初期より高い抗体価を示し、時間経過と共に高値を示した(図 2A)。SHIV 感染カニクイザルでは、SIV 感染カニクイザルと比較して抗体価は低く、また、#5014 の個体では抗体の誘導は認められなかった(図 2B)。

3. 細胞性免疫反応の解析

SIV および SHIV 感染カニクイザルよりそれぞれ採取した PBMC (接種後 4, 16, 50 週)を用いて SIV 抗原特異的 IFN- γ 産生 ELISPOT 反応を行った。SIV 接種カニクイザルでは接種 4 週より反応は確認され、その反応は時間経過と共に強く認められた(図 3A)。SHIV 接種カニクイザルの IFN- γ 産生細胞数は、SIV 感染カニクイザルと比較して低い値を示し、また、#5002、#5014、#5024 の 3 頭の IFN- γ 産生細胞数は、時間経過と共に上昇はみられなかった(図 3B)。

4. 病理学的解析

SIV 感染サル 2 頭(#0060、#0062)、SHIV 感染サル 1 頭(#5014)は、エイズ症状を呈し安楽殺を行った。病理学的解析を行ったところ、#0060 はエイズ脳症、#0062 は多発性血管炎、#5014 は間質性肺炎と病理組織学的に診断された(Table 1)。

D. 考察

近年、モーリシャス産のカニクイザルと SIV 感染モデルは、低病原性であると報告されている。本研究ではフィリピン、インドネシア、マレーシアの各地域で産出されたカニクイザルを用いて、SIV、SHIV 感染

後の病態解析を試みた。SIVmac239 および SHIV89.6P 感染慢性期におけるウイルス量は産地に関係なく高い数値が検出された。これらのウイルス量は、過去に報告されているインド産アカゲザルのウイルス量と、ほぼ同程度であることが確認された。

また、SIV 感染カニクイザルにおける CD4+T 細胞は、感染初期において全頭で変化が無いが、慢性期になるとウイルス量の高い個体では減少傾向にある。一方で、SHIV 感染カニクイザルの CD4+T 細胞は、感染初期より喪失し、接種後 100 週を超えても回復の傾向はみられていない。これらの結果は免疫応答の結果に関連しており、CD4+T 細胞の保存されている SIV 感染カニクイザルでは、ヘルパ-T 細胞の機能により細胞性免疫および液性免疫が強く誘導される。一方で、CD4+T 細胞を喪失している SHIV 感染カニクイザルの免疫応答は、SIV 感染カニクイザルより低値を示すことが確認された。

さらに接種後、1~2 年で SIV 感染サル 2 頭、SHIV 感染サル 1 頭がエイズ症状を発症し、それぞれエイズ脳症、多発性血管炎、肺炎を呈することが確認された。これらの病態は、ヒトのエイズ症状と同じ病態を呈したことから、有力なエイズ動物モデルとして活用できると考えられた。

今後、引き続き経過観察を行いエイズ発症および非発症カニクイザルの違いを明らかにするため、免疫応答だけでなく Trim 遺伝子や MHC 遺伝子等の宿主因子についても解析を行う。

E. 結 論

カニクイザルの SIV 病態が明らかになり、エイズ動物モデルとしての有用性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表

「国内」

(1) 加藤 誠一、岡村 智崇、張 險峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏 BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価 第 62 回 日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月 10 日-12 日

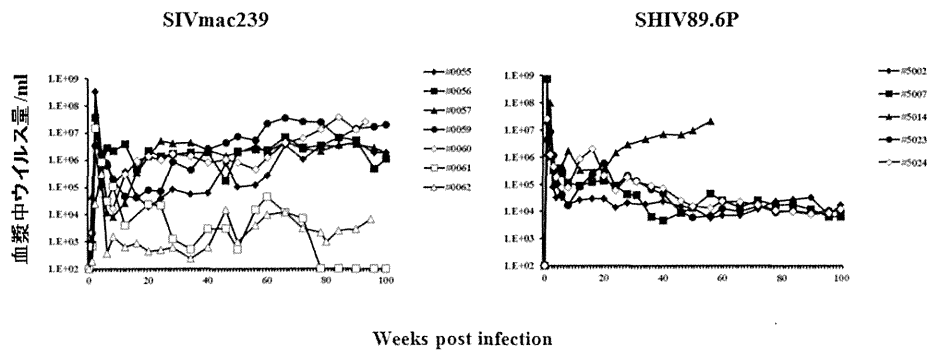
「国際」

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願
なし

(A)



(B)

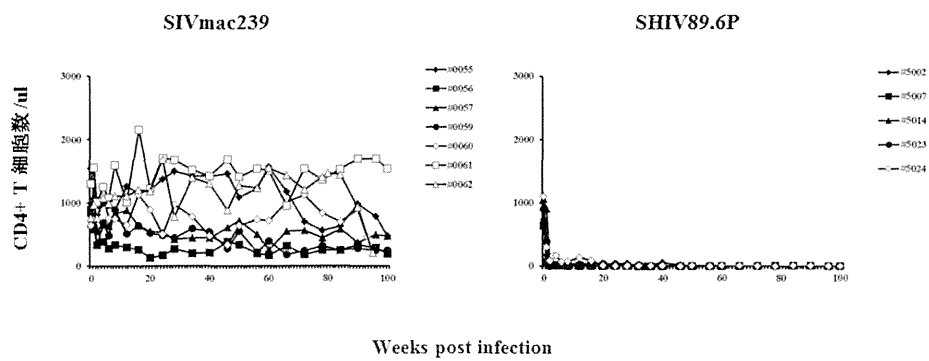
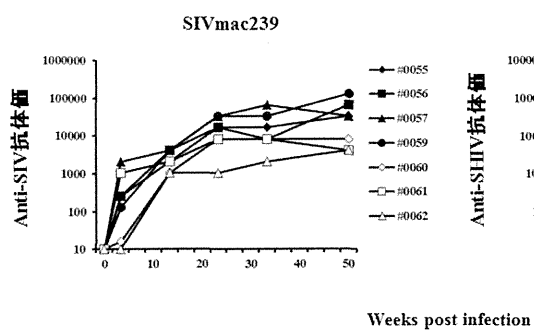


図1 SIVmac239 および SHIV89.6P 接種後のウイルス量 (A) および CD4+T 細胞 (B)。

(A)



(B)

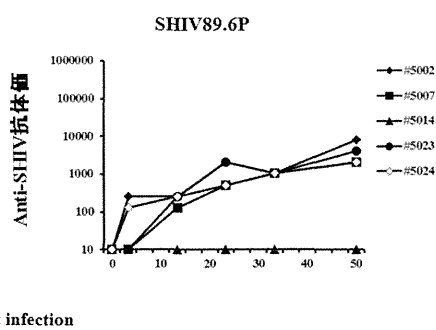


図2 SIVmac239(A)および SHIV89.6P(B)接種後の血漿中のウイルス抗体価。

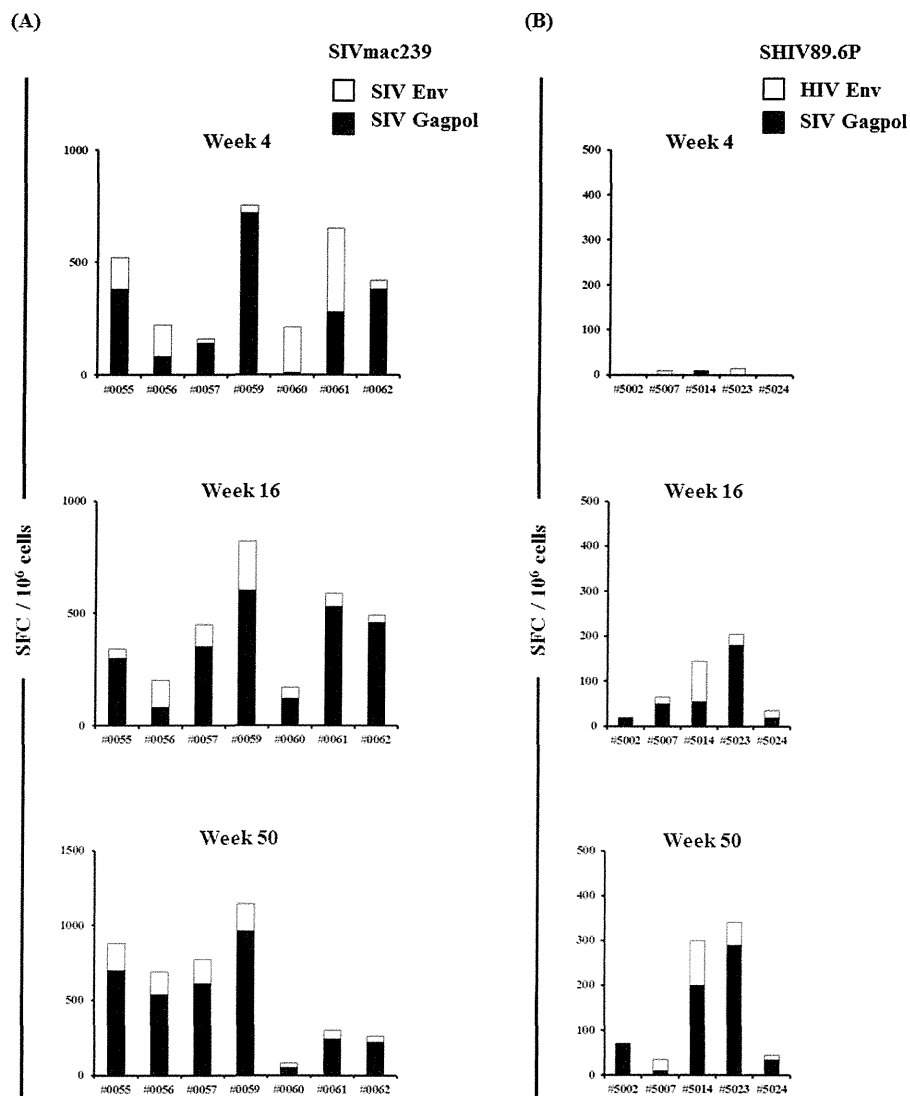


図3 SIVmac239(A)および SHIV89.6P(B)接種後の IFN- γ 産生細胞

Table 1 エイズを発症したカニクイザルの所見

Monkey	臨床症状	安楽殺	病理組織学的所見
#0060	食欲不振、体重減少、神経症状	658 日	エイズ脳症、脳脊髄炎
#0062	食欲不振、体重減少、白血球増多症	672 日	肺高血圧症、多発性血管炎
#5014	食欲不振、体重減少	391 日	間質性肺炎、リンパ組織リンパ球喪失

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

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

動物資源の計画的な増産・系統保存には効率的な誘起排卵法が必須である。本研究ではこれまでにマウスをモデルとして PTEN 阻害剤投与による誘起排卵数増加の可能性を検討してきた。本年度は、PTEN 阻害時期の検討や卵巣内 PI3 キナーゼ (PI3K) や AKT アイソザイム蛋白質含量と排卵誘起効率との関係、さらに PTEN の卵巣内局在について調べたところ、雌マウス個体への PTEN 阻害剤は時期特異的に性腺刺激ホルモンによる誘起排卵数を増加させ、その作用点は卵胞の顆粒層細胞および莢膜細胞であると考えられた。また、PTEN 阻害剤の反応効率には PI3K 含量や AKT アイソザイム含量への依存性が示唆され、誘起排卵数決定機構における PI3K/Akt シグナル経路の重要性が再確認された。これまでは性周期の影響を避けるため、未成熟マウスで検討してきた。PTEN 阻害剤の効果は時期特異性が強いことから、PTEN 阻害剤による霊長類での誘起排卵数増加が成熟個体でも実践的に期待できるかを検討するには、成熟マウスを用いて性周期の影響を調査する必要がある。

A. 研究目的

霊長類や小型齧歯類等の研究用動物資源の計画的な増産・系統保存には排卵誘起技術が汎用されるが、例えばマウスにおいても誘起排卵卵子数には大きな系統差があり (Suzuki et al. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8(6):975-980), 低反応マウス系統からの採卵はいまだに深刻な問題である。

本研究では研究用動物の低誘起排卵数の克服法として、卵子採取前に雌個体に各種薬剤を投与する方法を検討している。近年、卵胞発育には PI3K/Akt 経路の関与が注目され、特に Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) が原始卵胞活性化 (Li ら, *Proc Natl Acad Sci USA* 107:10280-10284, 2010) や排卵 (Fan ら, *Mol Endocrinol*, 22:2128-2140, 2008) に抑制的に関与することから、本研究では PTEN 阻害剤の一種 Dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (V) (略称: bpV(pic)) と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 PTEN 阻害剤の投与時期依存的に誘起排卵数が増加することをマウスで見いだしてきた。

また、投与時期によっては PTEN 阻害剤で誘起排卵数が逆に減少する事例も見いだした。

そこで本年度は、PTEN 阻害時期のさらなる検討や、卵巣内 PI3 キナーゼ (PI3K) や AKT アイソザイム蛋白質含量と排卵誘起効率との関係、さらに PTEN の卵巣内局在についてマウスをモデルとして調べ、PTEN 阻害剤による誘起排卵の向上効果とその機序についてさらに詳しく検討した。

B. 研究方法

1) PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤

PTEN 阻害剤として bpV(pic) (Enzo) をリンゲル液に溶解して用いた。投与量は 1 匹当たり 30 μ g (体重 1kg あたり 2 mg, すなわち 2 mg/kg BW) とした。

PI3K 阻害剤として LY294002 (Cayman Chemicals) を DMSO に溶解した後、DMSO の最終濃度が 5% となるようにリンゲル液に加えて用いた。

2) 誘起排卵数に対する PI3K 阻害剤の影響

A/J マウスを用い、PMSG を投与する日を 28

日齢の日とし、24 時間後に LY294002 を腹腔内投与した。2 用量 (0.1 mg/kg BW と 1 mg/kg BW) を設定した。PMSG 投与 48 時間後に hCG を投与し、更に約 16 時間後、パラフィンオイル (Zenith Biotech.) で覆った TYH 培地 (三菱化学メディエンス) 小滴内へ卵管膨大部より卵子卵丘細胞複合体を採取し、ヒアルロニダーゼ処理 (300 iu/mL, Sigma) により卵丘細胞を分散させ、卵子数を記録した。

3) 誘起排卵に対する bpV(pic)と LY294002 の併用効果

PMSG 投与日での PTEN 阻害剤 bpV(pic)の投与 (2 mg/kg BW) の有無と PMSG 投与の翌日での PI3K 阻害剤 LY294002 の投与 (0.1 mg/kg BW) の有無という 2 つの要因を組み合わせた合計 4 つの実験区を設定した (図 2)。採卵は上記 2)と同様に行った。

4) 蛋白質の定量 Western blot 解析

卵巣を測定時まで Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 内で冷蔵保存した。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 0.3 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 PI3K の各サブユニットに対する抗体 (4 種類, 1:10,000, Cell Signaling Technology, ウサギ抗体) または AKT アイソザイムに対する抗体 (3 種類, 1:10,000, Cell Signaling Technology, ウサギもしくはマウス抗体) と抗 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (1:50,000, Millipore, マウス抗体, もしくは Cell Signaling Technology, ウサギ抗体) を、二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 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, Pierce) を使い、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(2): 193-196, 2011 を参照)。

5) PI3K サブユニットおよび AKT アイソフォームの卵巣内蛋白質含量の系統間比較

4 週齢の雌マウスより得た卵巣の PI3K サブユニット (2 系統) および AKT アイソフォーム (4 系統) の蛋白質含量の定量 Western blot 解析による系統間比較を行った。

6) 卵巣 PTEN の免疫組織染色

28 日齢の A/J マウスの卵巣を 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法により組織切片を作成した。オートクレーブによる抗原賦活化処理の後、一次抗体として PTEN 抗体 (Cell Signaling Technology) を、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、さらに HRP 標識アビジンを反応させた。ジアミノベンジジンで発色させ、核染色 (マイヤーのヘマトキシリン) してから観察した。一次抗体処理を除いた標本を陰性対照とした。

7) 統計処理

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、一要因、もしくは二要因分散分析により判定した。相関については線形回帰分散分析 (ピアソン相関検定) を行った。 $p < 0.05$ 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: DS25-44R1)。

C. 研究結果

1) PI3K 阻害剤 LY294002 の排卵数への影響

PMSG 投与後の PTEN 阻害剤投与は排卵数を抑制する傾向があることから（図 1A, 昨年度実績の再掲）, PMSG 投与後, 翌日に PI3K 阻害剤である LY294002 を投与したところ, 高用量（1 mg/kg BW）では抑制傾向だが, 低用量（0.1 mg/kg BW）では排卵数が増加する傾向が見られた（図 1B）。PMSG 投与後では PI3K 活性が適度に抑制されると, つまり, PTEN 活性が適度に保たれていると排卵数が増える可能性が示唆された。

2) 誘起排卵数への PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用効果

阻害剤を全く投与しなかった対照群に比べ, bpV(pic)のみを投与した群は有意に誘起排卵数が多く, また, LY294002 のみを投与した群よりも有意に多かった。LY294002 のみを投与した群は対照群に比べ排卵数が若干多く, 両阻害剤併用群もさらに排卵数は上昇したものの, 両者とも対照群との間で有意差はなかった（図 2）。この結果は, PI3K 阻害剤の有効性は低く, PTEN 阻害剤こそが誘起排卵数の増加に有効であることを示している。

3) PI3K サブユニットの卵巣内含量の系統差

PI3K の各サブユニット蛋白質の卵巣内含量は, p85 と p110 α , Class III については C3H/HeJ に比べ A/J の方が有意に高かったが, p110 γ については 2 系統間に有意差はなかった（図 3）。本研究でこれまでに C3H/HeJ より A/J で PTEN 阻害剤による排卵数増加率が高いことが判明しているが, その理由が PI3 キナーゼによる PIP3 の産生能の高さである可能性を示している。

4) AKT アイソザイムの卵巣内含量の系統差

4 系統の卵巣内 AKT アイソザイムの各蛋白質含量には系統差が見られた（図 4）。各系統の卵巣内 AKT 含量と誘起排卵効率との間に関連はないが, bpV(pic)による排卵数増加効果と

の相関から, PTEN 阻害剤の効果と卵巣内 AKT1 含量との関連が示唆された（詳しくは図 4 の説明文を参照）。

5) 卵巣 PTEN の免疫組織染色

抗体との反応から PTEN は主に顆粒層細胞や莢膜細胞に存在し, PTEN 阻害剤はこれら顆粒層細胞や莢膜細胞に主に作用すると考えられた（図 5）。

D. 考察

PTEN 阻害剤による誘起排卵の向上効果とその機序を明らかにするため, 本年度は PTEN 阻害の時期の影響, 卵巣内 PI3K サブユニットや AKT アイソザイム蛋白質含量, さらに PTEN の卵巣内局在についてマウスをモデルとして調べた。

昨年度の結果から排卵数の上昇には PMSG 投与後の PTEN 阻害はむしろ抑制的であることが示唆され（図 1A）, 本年度の結果で PTEN 阻害剤の逆作用をもたらす PI3K 阻害剤が排卵数上昇傾向をもたらしたことから（図 1B）, 両阻害剤の併用効果が期待されたが, 相乗効果は見られず, PTEN 阻害剤単独投与こそが有効であることがわかった（図 2）。このことは, PTEN 阻害によって PI3K/Akt 経路の活性化が誘起された場合は, そのまま活性化状態を維持した方が排卵数上昇に有効であることを示唆している。

A/J は他系統に比べ PTEN 阻害剤による誘起排卵数上昇率が高いが（昨年度実績）, PI3K/Akt 経路を担うリン酸化酵素の PI3K（図 3）と AKT（図 4）の卵巣内含量と誘起排卵の相関性を調べたところ, A/J では PI3K 量や AKT 量が他系統に比べ多い傾向にあり, PTEN による PI3K/Akt 経路の抑制が PTEN 阻害剤により解除されると, 他系統に比べ効率良く PI3K/Akt 経路が活性化され, それが PTEN 抑制への反応性の良さをもたらすものと思われた。

卵巣内の PTEN は, 卵子自体よりも卵子発育を支持し, 排卵現象にも直接関与する顆粒層細胞や莢膜細胞に主に存在することから

(図5), PTEN 阻害剤により排卵数上昇が生じるのは妥当な現象だと言える。

成熟個体では生殖に関与するホルモンの影響により周期的な卵胞発育が見られる(性周期;齧歯類や家畜では発情周期,サル・ヒトでは月経周期と呼ばれる)。これまで本研究では,性周期の影響を避け,卵巣自体の反応を明確に見極めるために,未成熟マウスを用いてきた。しかし,霊長類やヒト,さらには家畜等への実践的な応用を考える場合は成熟個体での効果を検討する必要がある。PTEN 阻害剤の効果は時期特異性が高いことから,次のステップとして PTEN 阻害剤の性周期での各段階での影響を検討し,成熟個体への適用条件を決めることが重要だと思われる。

E. 結論

雌マウス個体への PTEN 阻害剤投与は時期特異的に性腺刺激ホルモンによる誘起排卵数を増加させ,その作用点は卵胞の顆粒層細胞および莖膜細胞であることが明らかとなった。PTEN 阻害剤投与の効果は時期特異性が強いことから,PTEN 阻害剤による霊長類での誘起排卵数増加が期待できるかを推定するには,性周期(月経周期)の影響を調査する必要があるだろう。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kumagai, A., Fujita, A., Yokoyama, T., Nonobe, Y., Hasaba, Y., Sasaki, T., Itoh, Y., Koura, M., Suzuki, O., Adachi, S., Ryo, H., Kohara, A., Tripathi, L., Sanosaka, M., Fukushima, T., Takahashi, H., Kitagawa, K., Nagaoka, Y., Kawahara, H., Mizuguchi, K., Nomura, T., Matsuda, J., Tabata, T., and Takemori, H. (2014) Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. *Genes*

5(4): 1095-1114.

2. 鈴木治, 松田潤一郎 (2015) 心筋症のマウスモデル: 拡張型心筋症マウスモデルの心機能解析と遺伝子解析, *医学のあゆみ* 252(10):1027-1031.

2) 学会発表

1. Suzuki, O. Chromosomal Mapping and Zygosity Check PCR of transgenes in a GFP Mouse Line (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131-Osb) Determined by Genomic Walking. *Experimental Biology* 2014. 平成 26 年 4 月 26 日~30 日. San Diego, CA, USA.
2. 小浦美奈子, 河相晶子, 中野正文, 鈴木治, 松田潤一郎。医薬基盤研究所 実験動物研究資源バンクにおいて扱った, 凍結胚・凍結精子の復元率について。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日~17 日。札幌。
3. 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。医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」一創薬・難病研究への貢献。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日~17 日。札幌。
4. 鈴木治, 小浦美奈子, 内尾(山田)こずえ, 松田潤一郎。マウス 5 系統における bpV(pic)併用による誘起排卵向上効果。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日~17 日。札幌。
5. 鈴木治。マウス誘起排卵に対する PTEN 阻害剤の投与時期の影響。第 55 回日本卵子学会。平成 26 年 5 月 17 日~18 日。神戸。
6. Suzuki, O. Strain Difference in Superovulation with a PTEN Inhibitor in Mice. *ICE / ENDO* 2014. 平成 26 年 6 月 21 日~24 日. Chicago, IL, USA.
7. 鈴木治。卵巣内 PI3 キナーゼサブユニット蛋白質含量のマウス系統間比較。第 107 回日本繁殖生物学会大会。平成 26 年 8 月

20日～24日。帯広。

8. Suzuki, O. Effects of PTEN and PI3 Kinase Inhibitors on Superovulation in A/J Mice. 65th AALAS National Meeting. 平成 26 年 10 月 19 日～23 日. San Antonio, TX, USA.
9. 塩田節子, 鈴木治, 小澤みどり, 平山知子, 湯華民, 森康子, 渡邊健, 清水則夫, 亀岡洋祐, 笠井文生, 小原有弘。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞株 HUV-EC-C のゲノムに組み込まれた HHV-6 の存在様式。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。平成 26 年 11 月 10 日～12 日。横浜。
10. Matsuda, J., Koura, M., Kawai, A., Nakano, M., Moriishi, E., Noguchi, Y., Sasaki, M., and Suzuki, O. 2014. Aiming to promote innovative drug discovery: Laboratory Animal Resource Bank at the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Japan. AFLAS Congress 2014. 平成 26 年 11 月 11 日～12 日. Kuala Lumpur, Malaysia.

11. 鈴木治。マウス卵巣内 AKT アイソフォーム蛋白質含量の系統差。第 37 回日本分子生物学会年会。平成 26 年 11 月 25 日～27 日。横浜。
12. Suzuki, O. Effect of a combination of PTEN and PI3K inhibitors on superovulation in A/J mice. 2014 ascb/ifcb Meeting. 平成 26 年 12 月 6 日～10 日. Philadelphia, PA, USA.
13. Suzuki, O. Comparison of ovarian contents of AKT isoforms among four strains of mice. 41st IETS Annual Conference. 平成 27 年 1 月 10 日～13 日. Versailles, France.
14. Suzuki, O. Strain Difference in Protein Contents of Tachykinin Receptors in Mouse Ovaries. ENDO 2015. 平成 27 年 3 月 5 日～8 日. San Diego, CA, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

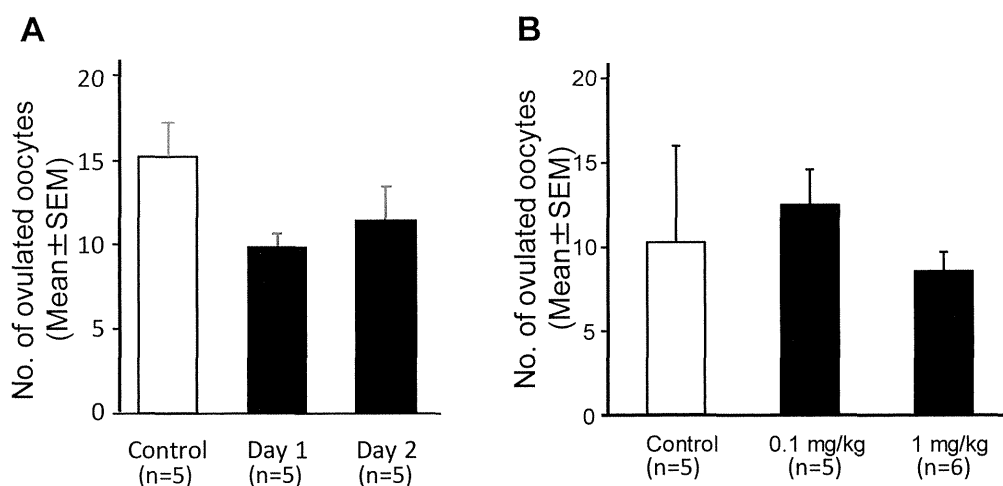
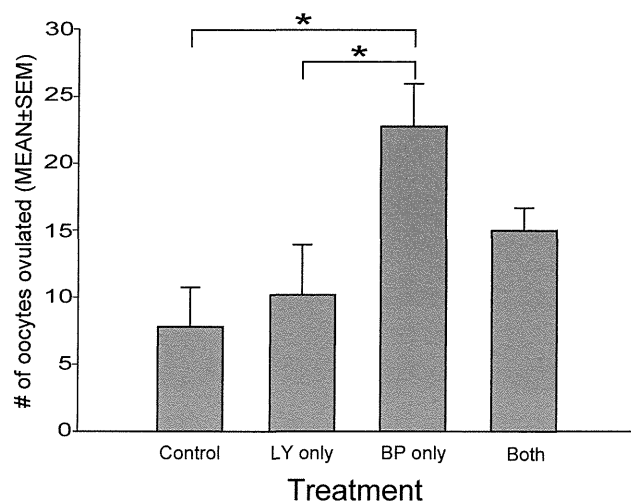


図 1. 誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤 bpV(pic)と PI3K 阻害剤 LY294002 の効果。各実験群の雌 1 匹あたりの平均誘起排卵数±標準誤差を示す。A) PMSG 投与後, 翌日 (Day 1) と 2 日目 (hCG 投与日と同じ, Day 2) に PTEN 阻害剤である bpV(pic)を 2 mg/kg BW 投与すると (■), 未投与群 (□) に比べ排卵数が少ない傾向が見られた (昨年度実績の再掲)。すなわち, PMSG 投与後の PTEN 阻害剤投与は排卵数を抑制する傾向があることがわかった。B) PMSG 投与後, 翌日に PI3K 阻害剤である LY294002 を 0.1 mg/kg BW, もしくは 1 mg/kg BW 投与したところ (■), 未投与群 (□) に比べ 0.1 mg/kg BW 投与群では排卵数が増加する傾向が見られた。1 mg/kg BW 投与群では減少傾向であった。PMSG 投与後では PI3K 活性が抑制されると, つまり, PTEN 活性が保たれていると排卵数が増える可能性が示唆された。



Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
PTEN-inhibitor	1	511.357	511.357	11.709	0.003 **
PI3K-inhibitor	1	38.035	38.035	0.871	0.364
PTEN-inhibitor x PI3K-inhibitor	1	135.704	135.704	3.107	0.096
Residual	17	742.400	43.671		
Total	20	1400.000	70.000		

図 2. 誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤 bpV(pic)と PI3K 阻害剤 LY294002 の併用効果。PMSG 投与日での PTEN 阻害剤 bpV(pic)の投与の有無と PMSG 投与の翌日での PI3K 阻害剤 LY294002 の投与の有無という 2 つの要因を組み合わせた合計 4 つの実験区を設定し、誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用効果について調べた。上段に雌 1 匹あたりの平均誘起排卵数 (平均±標準誤差 ; n=5, 併用群のみ n=6) を示すグラフを (*は $p < 0.05$ で有意差有り), 下段に 2 要因分散分析の結果を示す。全く阻害剤を投与しなかった対照群 (Control) に比べて, bpV(pic)のみを投与した群 (BP only) は有意に排卵数が多く, また, LY294002 のみを投与した群 (LY only) よりも有意に多かった。一方, 併用群 (Both) は対照群と有意差はなく, bpV(pic)の効果が LY294002 によって抑制されていた。2 要因分散分析では変動因として PTEN 阻害剤 (PTEN-inhibitor) の効果のみが有意で (**: $p < 0.01$), PI3K 阻害剤 (PI3K-inhibitor) や両阻害剤の相互作用 (PTEN-inhibitor x PI3K-inhibitor) は有意ではなかったことから, PTEN 阻害剤こそが誘起排卵数の増加に有効であることが確かめられた。

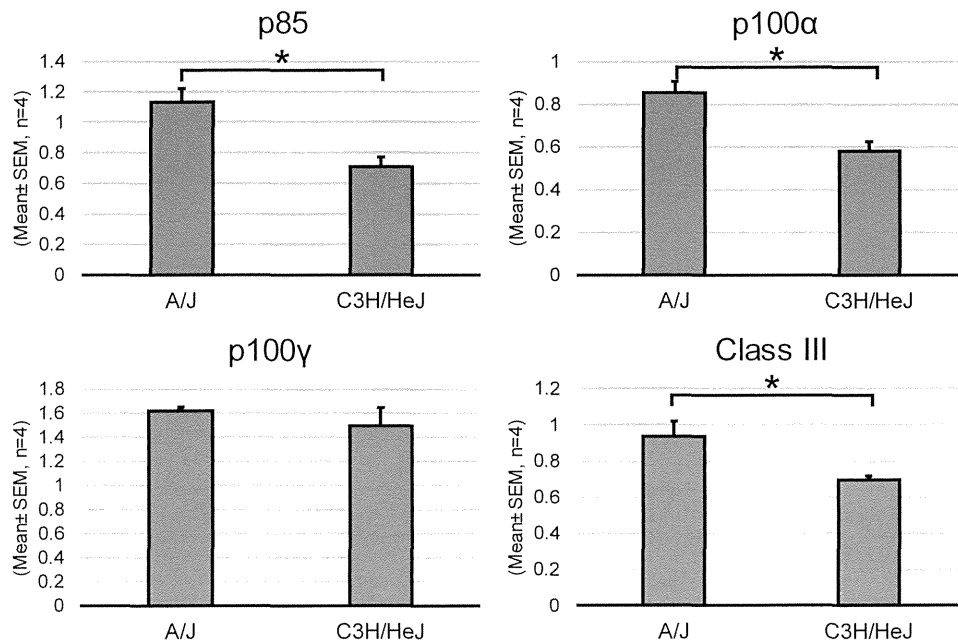


図3. 卵巣内 PI3K サブユニット蛋白質含量 (GAPDH 含量で標準化した含量, 卵巣 1 個あたりの平均±標準誤差, n=4)。PI3 キナーゼの各サブユニット蛋白質の卵巣内含量は, p85 と p110α, Class III については C3H/HeJ に比べ A/J の方が有意に高かったが ($p < 0.05$), p110γ については 2 系統間に有意差はなかった ($p > 0.05$)。C3H/HeJ より A/J で PTEN 阻害剤による排卵数増加率が低いことを昨年度に確認しているが, その理由は PI3 キナーゼによる PIP3 の産生能が C3H/HeJ に比べ A/J で高いことによる可能性を示している。

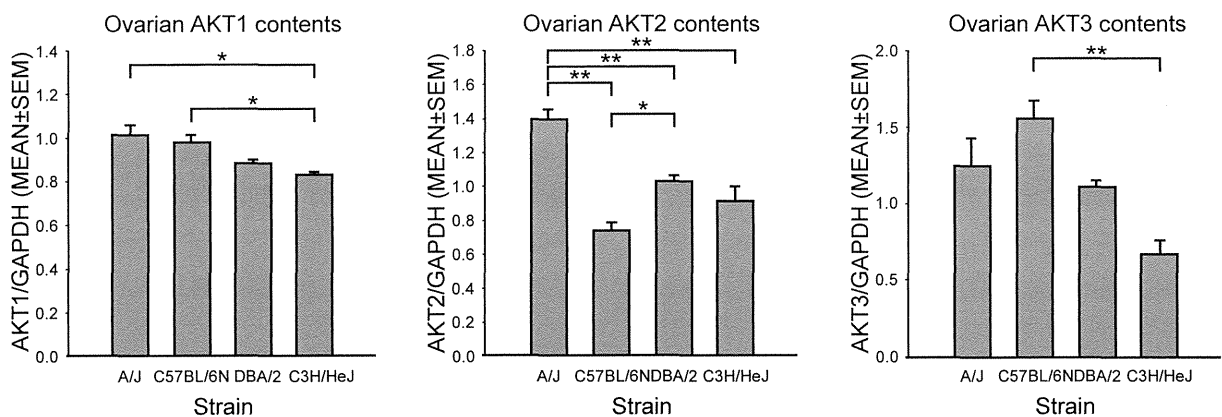


図4. 卵巣内 AKT アイソザイム蛋白質含量 (卵巣 1 個あたりの平均±標準誤差, n=4)。4 系統の卵巣内 AKT アイソザイムの各蛋白質含量には系統差が見られた (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)。誘起排卵数 (昨年度に調査済み) と AKT アイソフォームの卵巣内含量の間には, どの AKT アイソフォームにおいても有意な相関は無かったことから ($p > 0.05$, ピアソン相関検定), 卵巣内 AKT 含量と誘起排卵効率との間には密接な関連はないと思われた。一方, PTEN 阻害剤 bpV(pic)による排卵数増加効果 ([bpV(pic)群の平均排卵数]/[対照群の平均排卵数]) と卵巣内 AKT 含量との相関をみると, AKT1 との間でのみ有意な相関が見られたことから ($p = 0.014$, ピアソン相関検定), PTEN 阻害の影響の出方には AKT1 の量に関係することが示唆された。

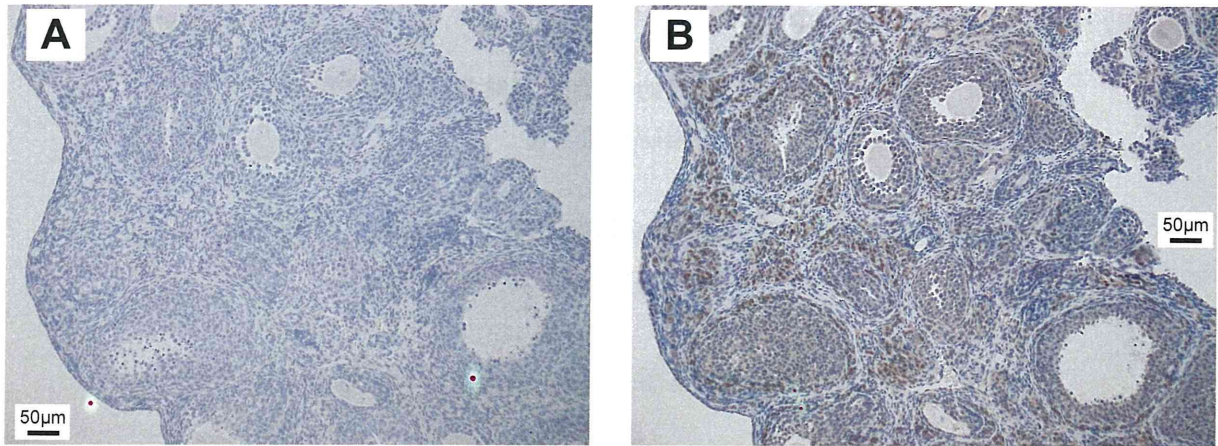


図 5. 28 日齢の A/J マウスの卵巣を用いた PTEN の免疫組織染色 (A: 一次抗体未使用の陰性対照 ; B : PTEN 抗体使用)。顆粒層細胞および莢膜細胞に強い染色 (茶色) が見られる。卵子の染色は非常に弱いことから, PTEN は主に顆粒層細胞や莢膜細胞に存在し, PTEN 阻害剤はこれら顆粒層細胞や莢膜細胞に主に作用すると考えられた。

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
カニクイザル MHC class-Iの発現解析

分担研究者 高橋一郎 (医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)

研究要旨

感染症を引き起こすウイルス感染に対して感受性があるか或いは抵抗性かは、MHC の class I の発現が重要な働きを担っていると考えられている。そこで基盤研霊長類センターで飼育管理されているカニクイザル個体より作成された株化 B 細胞株で MHC class I A ローカス、B ローカスからの発現している遺伝子を解析しデータベースより、タイプを同定した。

カニクイザル 8 個体より作成された B 細胞株で発現している MHC class I について A ローカスおよび B ローカス特異的なプライマーで増幅しクローニングしてシーケンス法で同定した。それぞれ 20 クローン以上クローニングしたクローンをとりシーケンスし、カニクイザル MHC データベースを検索し発現しているクローンタイプを同定した。

A. 研究目的

霊長類センターで飼育管理しているカニクイザルコロニーの遺伝学的解析を行うことにより、コロニーの特色を把握し実験用カニクイザルの高度化を図り資源としての価値を高める。またヒトの疾病モデルとしてカニクイザルを使用するための基礎データとして、MHC 遺伝子の発現情報を蓄積する。今年度は昨年度に引き続き情報を収集した。

アカゲザルでの MHC class-I のタイピングおよびゲノム解析した結果の整備がすすんでいるが、カニクイザルについては、体系的に進んでいない。そこで感染症に対する防御を担っている MHC class I を調べることで、実験動物のカニクイザルの資源の高度化を図ることを目的とする。

B. 研究方法

カニクイザル個体より採血された血液より B 細胞を株化した細胞を作製した。

カニクイザル B 細胞株については SIV 感染前に作成され、作製後に SIV 感染実験を行い感染の成立、感染の非成立が行われた。これら B 細胞株 8 株より遺伝子発現している RNA を抽出し MHC type I 特異的なプライマーで PCR 増幅後クローニングし約 20 クローンをシーケンスして塩基配列を IPD (Immuno Polymorphism Database) MHC データベースを検索し発現している MHC のタイプを同定した。

C. 研究結果

カニクイザル 8 頭より作製された不死化 B