

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07138

研究課題名(和文)ウサギにおける生殖工学基盤技術の確立

研究課題名(英文)Improvement of reproductive technology in rabbit

研究代表者

北嶋 修司(Kitajima, Shuji)

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授

研究者番号：70284643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウサギの生殖工学において重要な基盤技術の整備として、高効率なウサギ胚作成技術の確立を行った。若齢(12-14週齢)ウサギに過排卵処置を行うことで成熟(20週齢以上)ウサギと比較して約3倍(平均100個程度)の卵子が得られること、得られた卵子を用いて体外受精を行った場合、成熟ウサギ由来卵子と比較して体外受精成績に有意な差は認められず、少なくとも若齢ウサギから採取した卵子には受精能力があり、体外受精を行うことで胚盤胞まで発生することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学研究において疾患モデル動物は有用な研究資源であり、これらの保存・供給事業を進めるには、精子・胚の凍結といった保存技術の確立が非常に重要である。マウス・ラットではすでにこれらの技術が確立され、多くの研究機関で広く利用されている。いっぽう、ウサギでは、マウス・ラットに比べ性成熟に時間がかかる上、飼育スペースの確保が難しい、高コストとなるなど系統維持・保存作業は困難な点が多いことから研究が進んでいなかった。本研究の成果は、これらの問題の一端を解決し、ヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ウサギ開発の促進や疾患モデルウサギの保存・供給事業の推進に寄与する事ができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established the method for preparing the rabbit embryos effectively as a technique in reproductive engineering in the rabbit. We tried superovulation on the young rabbits (12-14 weeks of age) and found that they have an ability to provide more than 3 times eggs (an average of around 100) comparison with the adult rabbits (20 weeks of age or older) after superovulating with PMSG. After in vitro fertilization (IVF) using eggs collected from young rabbits, there were no significant differences in result of IVF such as fertility and development rate to blastocyst comparison with eggs from adult rabbits. These results indicate that the egg from the young rabbit at least has fertility and the ability of development to blastocyst after IVF.

研究分野：実験動物学

キーワード：ウサギ 生殖工学 系統保存

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医学研究において、ヒト疾患モデル動物は重要な役割を担っているが、ヒト疾患モデル動物の最も重要な条件は、病態における生理学的特徴がヒトに類似しているということである。最も多く利用されている実験動物種はマウスであるが、マウスも決して万能ではない。例えば、近年、社会問題となっている動脈硬化、肥満、糖尿病、いわゆる生活習慣病の研究においては適切なモデルとはいえないことも指摘されている。そのため、これらの研究分野ではマウス以外の疾患モデル動物の開発が望まれている。いっぽう、ウサギは脂質代謝系がヒトによく類似しており、動脈硬化、糖尿病、肥満、生活習慣病といった研究分野における疾患モデル動物としての意義は非常に大きい(特に動脈硬化では病変の性状もヒトとよく類似している)。これらの背景のもと、我々は疾患モデルウサギの開発を行ってきた。さらに、開発だけでなく、国内外の疾患モデルウサギを多くの研究者が研究に利用できるよう、疾患モデルウサギの収集・保存・供給(バイオリソース事業)拠点形成を目標に、人工授精によるウサギの効率的な繁殖方法、精子・胚凍結に関する技術確立を進めてきた。現在、これらの成果をもとに疾患モデルウサギの系統保存を進めているが、胚凍結保存技術を確立できても、ウサギは性成熟に時間がかかる、得られる胚数が多い、高コストとなるなど凍結に用いる胚を確保することが予想以上に困難であり、実際には、胚凍結による系統保存が期待通りに進めることができていなかった。そこで、ウサギにおいて高効率に胚を作出する技術の確立を検討することとした。

2. 研究の目的

国内外に疾患モデルウサギを対象としたウサギの精子・胚バンクは未だ存在しない。我々は、ウサギバイオリソース事業等の推進を図りたいと考えている。そのためには、ウサギの生殖工学におけるこれら基盤技術の確立、とくに高効率な胚作出技術の確立が必要である。これまでの検討で、3ヶ月齢程度の若齢ウサギに過排卵処置を行うことで、成熟ウサギも多くの排卵卵子が採取できることを見出している。このような現象は他の動物種でも知られているが、ウサギではこれまで報告がない。しかし、未性成熟の若齢個体を自然交配に使用することはできないため、この手順では、未受精卵として回収した後に体外受精を実施して受精卵を作成する必要がある。そのため、採卵条件の改善だけでなく、同時に体外受精条件の確立も必須である。ウサギは、哺乳動物で最初に体外受精、顕微授精に成功した動物種であるが、再現性、効率は悪く、現在でも体外受精技術は十分に確立されていない。高効率な胚作出技術が確立できれば、使用動物数の削減、低コスト化、系統保存作業の期間短縮、とくに疾患モデルウサギで月齢の上昇に伴い死亡、繁殖率の低下する系統では、性成熟を待たずに短期間で凍結保存用の胚の確保ができるなど、ウサギバイオリソース事業を格段に推進させることができると考える。また、ヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ウサギ作成のための胚操作には、多くの受精卵が必要となることから、これらの研究の推進にも貢献できると期待される。本研究では、(1)若齢ウサギにおける過排卵誘起の条件検討、(2)若齢ウサギから得られた排卵卵子の質の確認、(3)体外受精の条件検討を実施し、ウサギにおける高効率な受精卵作成技術の確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず若齢ウサギでの過排卵の条件、とくに週齢についての検討を行い、次いで、若齢ウサギから採取した卵子の質の検討として、体外受精の成績について検討を進めた。

(1)若齢ウサギにおける採卵

日本白色種(JW)ウサギ(Std:JW/CSK)を使用した。8~80週齢の雌ウサギに75-150Uの妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)をへ筋肉内投与した。PMSG投与72~96時間後に、100~150IUのヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG)を静脈内投与し、排卵を誘起した。採卵はhCG投与12-16時間後に麻酔薬の過量投与に安楽死後、卵管を灌流により行い、採取卵子数を測定した。

(2)体外受精

JWウサギ(Std:JW/CSK)を使用した。採卵用の雌は13週齢(若齢)と25-28週齢(成熟)を使用し、150UのPMSGを筋肉内投与後96時間後に100UのhCGを静脈内投与した。採卵は、hCG投与後13時間目に行った。精子採取用の雄にはJWウサギの性成熟雄(30週齢以上)を使用し、人工腔を用いて射出精子を採取した。精子は、Lysophosphatidylcholineを0.2mg/mlの濃度で添加したmBO medium中で、38℃、5%CO₂環境下で2時間前培養を行った。前培養後の精子を運動精子数で 5×10^6 /mlに調整し、細胞培養用ディッシュ100 μ lの精子懸濁液ドロップを作成した。その後、0.01%ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去した卵子を精子懸濁液に移し(卵子10-11個/ドロップ)38℃、5%CO₂環境下で6時間媒精を行った。媒精後、卵子は20%FBS-M199 mediumに移して38℃、5%CO₂の条件で培養し、12、24、48、72、96、120、144時間後に胚の観察を行った。体外受精成績の評価は培養24時間後の受精率(分割率)および144時

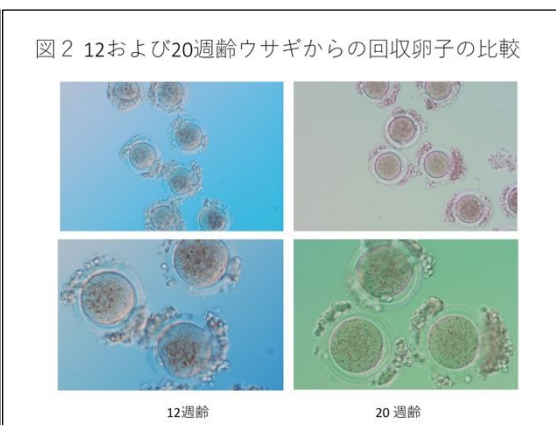
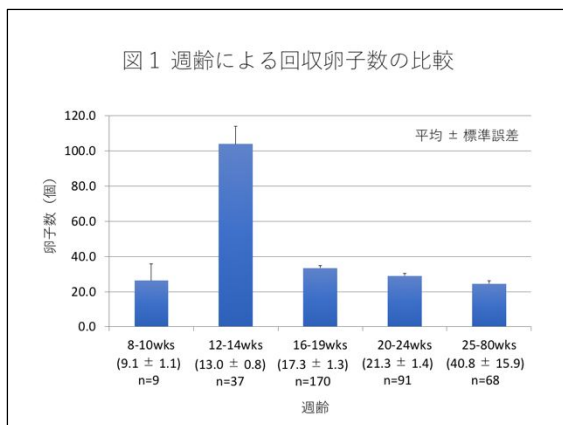
間後の胚盤胞発生率とした。また、卵子の質の検討として、Mito Traker Orange CMTMRo 染色によるミトコンドリアの分布評価およびグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G -6-PDH) を指標とした、Brilliant cresyl blue (BCB) 染色による細胞質の評価も合わせて行った。

4. 研究成果

(1)若齢ウサギにおける採卵

過排卵処置後の週齢による回収卵子数の比較を図 1 に示した。回収卵子は 8 週齢より認められたが、8 週齢では卵巣はホルモン投与にほとんど反応しておらず、卵巣の肥大および卵胞の反応性形成は 10 週齢より観察された。平均回収卵子数は (mean±SE) 12~14 週齢が最も多く、104.0±10.0 個 (n=37) であった。最大回収数は、1 匹あたり 236 個であった。一般に最も採卵に用いられている 16~24 週齢では、16~19 週齢で 33.5±1.3 個 (n=170)、20~24 週齢で 29.1±1.4 個 (n=91) であり、これらと比較して 12~14 週齢では、平均 3 倍以上の卵子を得ることができた。また、12 週齢 (若齢) と 20 週齢 (成熟) の雌ウサギから回収した卵子を形態学的に比較観察したところ、成熟ウサギと比較して、とくに若齢ウサギから回収した卵子に異常は認められず、卵胞には第 1 極体も観察された (図 2)。

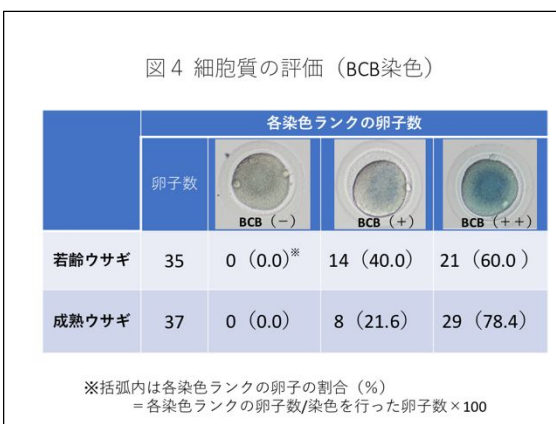
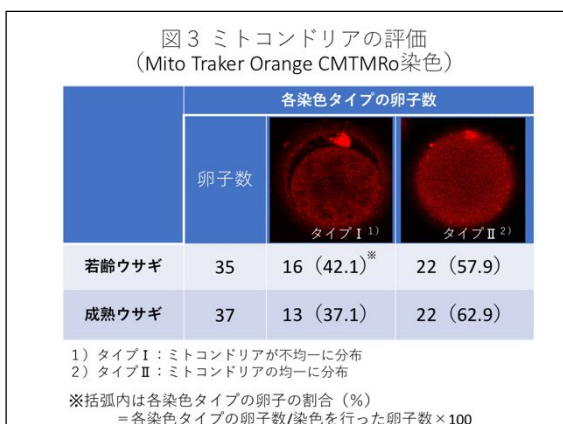
さらに、13~14 週齢の雌ウサギを用いて、回収卵子数に及ぼす PMSG 投与から hCG 投与までの時間についても 72 時間と 96 時間で比較を行ったが (卵子成熟時間の検討)、有意な差は認められなかった。



(2)体外受精

雌ウサギからの平均回収卵子数は、若齢で 104.7±24.8 個、成熟で 22.1±5.3 個であった。採卵成績については、若齢ウサギにおいて平均で約 5 倍近く多く採取できた計算となった。

体外受精翌日の受精率は、若齢 (n=140 個) で 82.1%、成熟 (n=99 個) で 78.8% であった。培養 144 時間後の胚盤胞への発生率は、若齢で 38.6%、成熟で 42.2% であった。受精率および胚盤胞への発生率において、若齢と成熟の間で有意な差は認められなかった。また、卵子におけるミトコンドリアの分布評価でも活性化型のミトコンドリアが不均一に分布している卵子は、若齢で 42.1%、成熟で 37.1% と有意な差は認められなかった (図 3)。さらに、BCB 染色による細胞質の評価でも BCB (++) は、若齢ウサギ由来卵子で 60% で、成熟ウサギ由来卵子は 73.0% と染色の程度に差は認められなかった (図 4)。



以上の結果から、12～14 週齢の若齢の雌ウサギに過排卵処置を行うことで、成熟ウサギ（20 週齢以上）に比べてより多くの卵子（1 匹当たり平均 100 個、成熟ウサギと比較して約 3 倍以上）を得られることが明らかとなった。また、若齢ウサギ由来の卵子と成熟ウサギ由来の卵子の質に差はなく、体外受精を行った場合の受精率および胚盤胞発生率においても、若齢ウサギと成熟ウサギで有意な差は認められず、少なくとも若齢ウサギから採取した卵子には受精能力があり、胚盤胞まで発生することが確認された。

残念ながら、本研究の期間内に体外受精後の胚を仮親へ移植し、個体発生を確認するところまで実施することができなかった。若齢ウサギ由来胚の個体発生能の確認が今後残された課題であるが、もし、確認できれば、使用動物数の削減、低コスト化、系統保存作業の期間短縮、とくに疾患モデルウサギで月齢の上昇に伴い死亡、繁殖率の低下する系統では、性成熟を待たずに短時間で凍結保存用の胚の確保ができるなど、ウサギバイオリソース事業の推進に有用な手技となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang Chuan, Niimi Manabu, Kitajima Shuji, Matsuhisa Fumikazu, Yan Haizhao, Dong Sijun, Liang Jingyan, Fan Jianglin	4. 巻 18
2. 論文標題 Sex hormones affect endothelial lipase-mediated lipid metabolism and atherosclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12944-019-1175-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Niimi, M., Nishijima, K., Kitajima, S., Matsuhisa, F., Satoh, K., Yamazaki, H., Zhang, J., Chen, Y.E., Fan, J.	4. 巻 33
2. 論文標題 Macrophage-derived matrix metalloproteinase-1 enhances aortic aneurysm formation in transgenic rabbits.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biomed. Res.	6. 最初と最後の頁 271-279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Joh, K., Matsuhisa, F., Kitajima, S., Nishioka, K., Higashimoto, K., Yatsuki, H., Kono, T., Koseki, H., Soejima, H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Growing oocyte specific transcription-dependent de novo DNA methylation at the imprinted Zrsr1-DMR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-018-0200-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 松尾 完, 松久葉一, 秋吉俊明, 西島和俊, 森本正敏, 北嶋修司	4. 巻 34
2. 論文標題 ウサギ精子凍結保存液における卵黄代替物としての大豆由来機能性改質レシチンに関する検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 九州実験動物雑誌	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang, C., Nishijima, K., Kitajima, S., Niimi, M., Yan, H., Chen, Y., Ning, B., Matsuhisa, F., Liu, E., Zhang, J., Chen, Y. E., Fan, J.	4. 巻 37
2. 論文標題 Increased hepatic expression of endothelial lipase inhibits cholesterol diet induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in transgenic rabbits	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.	6. 最初と最後の頁 1282-1289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.117.309139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 新見 学、Yan Haizhao、Chen Yajie、Zhou Huanjin、王 川、松久葉一、西島和俊、北嶋修司、範 江林
2. 発表標題 内皮リパーゼは脂質低下を介して抗動脈硬化作用を発揮する - 遺伝子改変ウサギを用いた検討 -
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutoshi NISHIJIMA, Shuji KITAJIMA, Keita BASAKI, Megumi YANO, Yousuke SATO, Takahiro OBATA and Shinsuke SEKI
2. 発表標題 Improvement of embryo use efficiency in generation of gene-modified rabbit.
3. 学会等名 The 8th International Congress of Rabbit Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋吉俊明、吉岡翔太、松久葉一、向平峻太郎、森本正敏、塩見雅志、北嶋修司
2. 発表標題 若齢ウサギから過排卵処置により採取した卵子の受精能力について
3. 学会等名 第36回九州実験動物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向平峻太郎、松久葉一、高井直史、前田達弘、水田あい、吉岡翔太、森本正敏、北嶋修司
2. 発表標題 超急速ガラス化法によるWHHLウサギ胚の凍結成績について
3. 学会等名 第36回九州実験動物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡翔太、秋吉俊明、松久葉一、向平峻太郎、森本正敏、北嶋修司
2. 発表標題 ウサギ体外受精における精子前培養法の検討
3. 学会等名 第36回九州実験動物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石将平、猪原 哲、松久葉一、北嶋修司
2. 発表標題 パルス電界印加によるウサギ精子の先体反応の誘導
3. 学会等名 平成30年電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidenobu Soejima, Fumikazu Matsuhisa, Shuji Kitajima, Kenichi Nishioka, Ken Higashimoto, Hitomi Yatsuki, Tomohiro Kono, Haruhiko Koseki, Keiichiro Joh
2. 発表標題 Transcription-dependent de novo DNA methylation at the imprinted Zrsr1-DMR occurs in the growing oocyte, but not in early embryonic cells
3. 学会等名 European Human Genetics Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋吉俊明、松久葉一、向平峻太郎、吉岡翔太、森本正敏、塩見雅志、北嶋修司
2. 発表標題 若齢ウサギにおける過排卵処置および卵子回収の試み(その2)
3. 学会等名 第5回日本ウサギバイオサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松久葉一、秋吉俊明、塩見雅志、向平峻太郎、吉岡翔太、森本正敏、北嶋修司
2. 発表標題 WHHLMIウサギの凍結胚による系統保存に関する検討
3. 学会等名 第5回日本ウサギバイオサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haizhao Yan, Manabu Niimi, Fumikazu Matsuhisa, Shuji Kitajima, Y. Eugene Chen, Jianglin Fan
2. 発表標題 Characterization of apolipoprotein C-III knockout rabbits
3. 学会等名 第5回日本ウサギバイオサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabu Niimi, Kazutoshi Nishijima, Shuji Kitajima, Fumikazu Matsuhisa, Kaneo Satoh, Jianglin Fan
2. 発表標題 Macrophage-derived matrix metalloprotease-1 accelerates aortic aneurysm formation in transgenic rabbits
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fumikazu Matsuhisa, Toshiaki Akiyoshi, Kan Matsuo, Masatohi Morimoto, Manabu Niimi, Jianglin Fan, Shuji Kitajima
2. 発表標題 Comparison of cryoprotectants for ultra-rapid vitrification (Cryotop method) in rabbit embryos
3. 学会等名 The 7th International Meeting on Rabbit Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazutoshi Nishijima, Gen Watanabe, Shuji Kitajima, Keita Basaki, Yasuyoshi Fukuda, Yukie Komatsu, Megumi Yano, Takahiro Obata, Yuhei Matsuo, Yukihisa Matsuda, Shinsuke Seki
2. 発表標題 Effect of inhibin antiserum administration and vulva color on superovulation in rabbit
3. 学会等名 The 7th International Meeting on Rabbit Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chuan Wang, Kazutoshi Nishijima, Shuji Kitajima, Manabu Niimi, Hizhao Yan, Yajie Chen, Bo Ning, Fumikazu Matsuhisa, Enqi Liu, Jifeng Zhang, Y. Eugene Chen, Jianglin Fan.
2. 発表標題 Increased hepatic expression of endothelial lipase inhibits cholesterol diet induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in transgenic rabbits
3. 学会等名 The 7th International Meeting on Rabbit Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北嶋修司、松久葉一、西島和俊、森本正敏
2. 発表標題 ウサギにおける生殖工学技術の現状と今後の課題
3. 学会等名 第51回日本実験動物技術者協会総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yajie Chen, Kazutoshi Nishijima, Lu Chen, Manabu Niimi, Shuji Kitajima, Jingyan Liang, Jianglin Fan
2. 発表標題 Macrophage-derived MMP-9 Enhances the Arterial Calcification and Progression of Atherosclerosis in Transgenic Rabbits
3. 学会等名 AHA Scientific sessions 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾 完、松久葉一、秋吉俊明、西島和俊、森本正敏、北嶋修司
2. 発表標題 ウサギ精子の凍結保存における大豆由来分別レシチンの有用性について
3. 学会等名 第35回九州実験動物研究会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松久葉一、秋吉俊明、松尾 完、塩見雅志、森本正敏、北嶋修司
2. 発表標題 ウサギにおける効率的な受精卵作製の試み
3. 学会等名 第35回動物生殖工学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白石将平、猪原 哲、松久葉一、北嶋修司
2. 発表標題 パルス電界印加によるウサギ精子の先体反応の誘導
3. 学会等名 平成30年電気学会全国大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐賀大学総合分析実験センター 生物資源開発部門 研究活動の紹介
<http://www.animal.med.saga-u.ac.jp/index.php?id=2>
佐賀大学総合分析実験センター 生物資源開発部門 研究活動の紹介
<http://www.animal.med.saga-u.ac.jp/index.php?id=2>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松久 葉一 (Matsuhisa Fumikazu) (20754253)	佐賀大学・総合分析実験センター・助教 (17201)	