

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08146

研究課題名(和文) カニクイザル一倍体ES細胞の樹立と個体作出に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Derivation of haploid cynomolgus monkey ES cells

研究代表者

下澤 律浩 (Shimozawa, Nobuhiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・主任研究員

研究者番号：50300786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザル一倍体ES細胞を樹立するために、成熟卵への顕微授精後に形成された雌性または雄性前核の除去、および第2極体の放出を伴う単為発生誘起を行った。前者において、良質な胚盤胞への発生は確認できなかった。しかし後者において、良質な胚盤胞への発生が確認された。その内部細胞塊に由来するES様細胞が樹立され、未分化マーカーの発現および一倍体を示す21本の染色体を持つ細胞の存在も確認された。一倍体の単為発生卵からES様細胞が樹立されたことから、その樹立に人為的な単為発生誘起のみで十分であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カニクイザルは単胎動物であり、長い妊娠期間を持つ。このため、遺伝子疾患や遺伝子改変個体の生産において、マウスのように目的の個体を得ることは容易ではない。そこで、疾患あるいは改変遺伝子を持つ個体の配偶子の代替として一倍体ES細胞を用いることで、そのような個体の効率的な生産が期待される。本研究により、配偶子の一倍体ゲノムの代わりに一倍体ES細胞が利用できる可能性が示され、ヒト疾患研究に利用できるカニクイザルモデルの効率的な生産への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To establish haploid cynomolgus monkey ES cells, either of female or male pronuclei in ICSI-derived zygotes was enucleated, or parthenotes with the release of second polar body were artificially induced. In the former, no expanded blastocysts developed. In the later, however, ES-like cells from the expanded blastocyst were established. The ES-like cells expressed undifferentiated marker proteins and partly had 21 chromosomes that showed haploid. It was suggested that parthenogenetic activation to mature oocytes was adequate to establish haploid ES cells.

研究分野：実験動物学

キーワード：発生工学 一倍体 ES細胞 顕微操作 カニクイザル 遺伝子改変

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトと同じ霊長類であるカンクイザルは、生物・医学研究に広く利用されている実験動物である。しかし、マウスのように遺伝子改変を効率的に作出することは難しい。その理由として、単胎動物であること、性成熟期間が長いこと、多数の受精卵を準備し難いこと、機能的な多能性幹(PS)細胞(ES および iPS 細胞)が存在しないことなどが挙げられる。さらに最近、遺伝子改変効率が高く、多くの動物種に利用されている方法が、ゲノム編集技術である。これは PS 細胞を利用したキメラ作出を必要としないことから、時間の短縮も図れる。しかし、そのような遺伝子改変の成功は偶然によるところが大きい。妊娠期間がカンクイザルにおいては、長く待ったにも関わらず、出生した個体が遺伝子改変ではない、あるいは疾患遺伝子が伝達していないことも覚悟しなければならない。その結果、そのような個体を利用する研究の進展への影響が懸念される。

2. 研究の目的

ヒトと同じ霊長類であるカンクイザルにおいて、多能性幹(PS)細胞やゲノム編集技術などを用いた遺伝子改変あるいは遺伝性疾患個体の効率的な作出方法は確立されていない。マウスと違い、キメラ形成能を持つ PS 細胞がないことや多くの卵を準備することが難しいなどがその一因として挙げられる。近年、一倍体の単為発生胚に由来する ES 細胞を使用してマウスの作出が報告された。そこで本研究では、カンクイザルにおける一倍体 ES 細胞を樹立し、その細胞を利用したカンクイザル遺伝子改変・遺伝性疾患個体の作出に関する基盤技術を確立する。

3. 研究の方法

実験に供試する成熟卵は、雌カンクイザルに FSH および hCG 等を投与し、hCG 投与からおおよそ 36 時間で採取した。採卵後ヒアルロニダーゼを含む培養液で卵丘細胞を除去し、極体を持つ卵を成熟卵として各実験に使用した。また、同時に極体および大きな核を持たない卵は成熟前の卵で有り、それを体外培養後に極体を放出したものも成熟卵として使用した。

(1) 雄性一倍体 ES 細胞を樹立するために、雄から採取した精子を成熟卵に顕微注入し、受精卵を作出した。その後、雌雄前核を形成した受精卵を選び出して、顕微操作により雌性前核を除去し、体外培養を行った。

(2) 雌性一倍体 ES 細胞を樹立するために、成熟卵に対して活性化刺激を付与することで単為発生を誘起した。活性化刺激としては、Ionomycin 処理を 5 分、続けて cycloheximide 処理を 5 時間行うことで単為発生を誘起し、体外培養を行った。

(3) 一倍体 ES 細胞の樹立においては、発生した拡張胚盤胞から内部細胞塊を物理的に摘出した。その内部細胞塊を通常の ES 細胞の樹立法と同様に ES 細胞用培養液とマウス胎児線維芽細胞を用いて培養し、一倍体 ES 細胞の樹立を行った。ES 細胞の培養液には、LIF や複数の低分子化合物を添加して、トリプシンによる単一細胞に分散する継代培養が可能か否かを検討した。樹立された ES 細胞は、その性状解析として、免疫蛍光染色により未分化マーカーの発現を調べた。また、一倍体であることを確認するために、核型解析としてギムザ染色により染色体数を計数した。

4. 研究成果

カンクイザルにおいて、多能性幹細胞やゲノム編集技術などを用いた遺伝子改変個体の効率的な作出方法は確立されていない。また単胎動物であり、長い妊娠期間の後に漸く生まれる仔の遺伝子が正常であることも想定される。一倍体ES細胞を使用したマウス個体の作出が報告されたこと

から、本研究では、遺伝性疾患・遺伝子改変カニクイザルの作出に貢献すると考えられる一倍体ES細胞の樹立に関して検討した。

(1) 顕微受精後に得られた受精卵の細胞質中に形成された雌雄前核の内、雌性ゲノムのみを持つ一倍体とするために、形態が大きい雄性前核を顕微操作により除去し、体外培養した。また精子として、遺伝子にマーカーとなり得る変異を持ったカニクイザル家系が見つかったことから、この家系由来の雄の精子も使用したところ、同様に雌雄前核の形成が確認できた。この場合、雄性ゲノムのみを持つ一倍体にするために、形態が小さい雌性前核を除去し、体外培養した。雌性前核あるいは雄性前核の除去時に細胞骨格の重合阻害薬の効果が不十分のためか、慎重に除去しないと卵細胞質が壊れてしまうことが一部で確認された。以上の結果、雌雄どちらかの一方の前核を持つように作製した一倍体卵は、正常な受精卵が発生した時に観察されるような大きな胞胚腔を形成した良質な拡張期胚盤胞に成長することなく、発生を停止した。

(2) 次に成熟卵に対して人為的に活性化処理を行い、一倍体の雌性ゲノムのみを持つ1前核2極体の単為発生卵を作出できることが確認された。それらを体外培養した結果、形態的に良質な拡張期胚盤胞への発生を確認した。また、(1)のような前核を除去するための顕微操作を行っていないことから、卵の変性は確認されなかった。

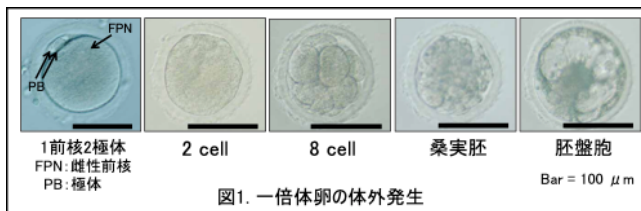


図1. 一倍体卵の体外発生

(3) ES細胞を樹立するために、(2)で得られた拡張期胚盤胞から物理的に摘出した内部細胞塊を培養したところ、伸展し、正常な受精卵に由来するES細胞の樹立時と類似した平面状のコロニーを形成した。継代培養を継続したところ、安定したES様細胞株を得ることに成功した。この細胞株の継代を続けるとともにトリプシン処理で単一細胞に分散させた状態でLIFや低分子化合物等を添加した培養液で継代を行ったところ、順調に世代を重ねることが可能であった。このES様細胞株において、免疫蛍光染色によりOct-3、SSEA4およびTRA-2-54等の未分化マーカーの発現を確認した。また、染色体数を調べたところ、通常の2倍体は42本の染色体数を持つが、樹立した細胞株では一倍体を示す21本の染色体を持つ細胞が存在することを確認した。

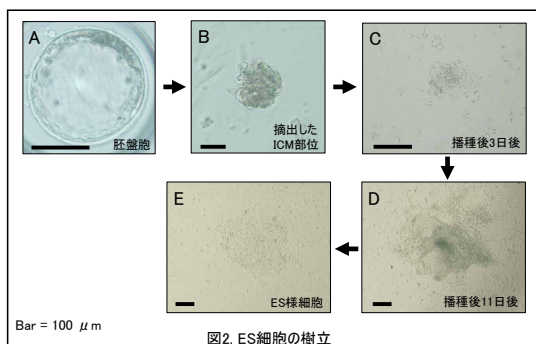


図2. ES細胞の樹立

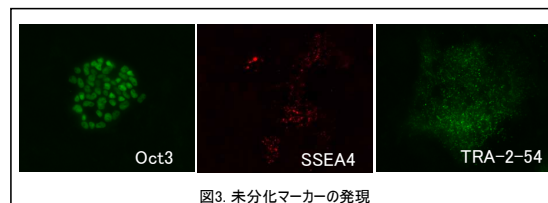


図3. 未分化マーカーの発現

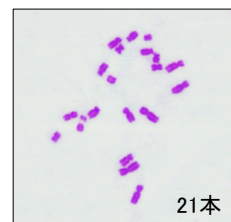


図4. 核型解析

(4) 顕微授精により作出した受精卵から顕微操作によって構築した雄性の一倍体卵は胚盤胞への発生は確認されなかったものの、単為発生により作出された雌性の一倍体卵で、胞胚腔が大きい良質な拡張期胚盤胞への発生が確認された。さらにそれからES様細胞を樹立することに至った

ことは、雌性ゲノムのみを持つ一倍体卵の体外発生およびES細胞の樹立には、精子およびその受精刺激等の関与は必ずしも必要ではないこと、および人為的な活性化処理が適していることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y, Kimura N.	4. 巻 189
2. 論文標題 Elevated membrane cholesterol disrupts lysosomal degradation to induce α -amyloid accumulation: the potential mechanism underlying augmentation of α -amyloid pathology by type 2 diabetes mellitus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 391-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.ajpath.2018.10.011	査読の有無 無
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 Muraoka Yuki, Iida Yuto, Ikeda Hanako O., Iwai Sachiko, Hata Masayuki, Iwata Takeshi, Nakayama Mao, Shimozawa Nobuhiro, Katakai Yuko, Kakizuka Akira, Yoshimura Nagahisa, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 4
2. 論文標題 KUS121, an ATP regulator, mitigates chorioretinal pathologies in animal models of age-related macular degeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00624 ~ e00624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e00624	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 Shiga Yukihiro, Akiyama Masato, Nishiguchi Koji M, Sato Kota, Shimozawa Nobuhiro, Takahashi Atsushi, Kamatani Y, Nakazawa T, Kubo M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy053	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 Uno Y, Osada N, Sakurai S, Shimozawa N, Iwata T, Ikeo K, Yamazaki H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Development of genotyping method for functionally relevant variants of cytochromes P450 in cynomolgus macaques.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vet Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 e30-e34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvp.12443.	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 Ikeda Y, Nishiguchi KM, Miya F, Shimozawa N, Funatsu J, Nakatake S, Fujiwara K, Tachibana T, Murakami Y, Hisatomi T, Yoshida S, Yasutomi Y, Tsunoda T, Nakazawa T, Ishibashi T, Sonoda K.	4. 巻 59
2. 論文標題 Discovery of a cynomolgus monkey family with retinitis pigmentosa.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 826-830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-22958.	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 下澤律浩	4. 巻 41
2. 論文標題 人為的な生殖技術を用いたカニクイザルの作出	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 17-22
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 無
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 下澤律浩
2. 発表標題 カニクイザル一倍体ES細胞の樹立に関する検討
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤律浩、棟居佳子、高橋一朗、岡林佐知、木村展之、片貝祐子、揚山直英、八神健一、保富康宏
2. 発表標題 カニクイザルに適した卵採取法の検討
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棟居佳子、下澤律浩、高橋一朗、岡林 佐知、揚山直英、木村展之、片貝祐子、八神健一、保富康宏
2. 発表標題 豊長類科学研究センターで認められた神経セロイドリポフスチノーシスの原因遺伝子同定とコロニー内保因状況
3. 学会等名 第28回サル類疾病ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤律浩
2. 発表標題 神経セロイドリポフスチン症カニクイザルの発見とリソース開発
3. 学会等名 第23回 一般社団法人予防衛生協会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤律浩、棟居佳子、高橋一朗、岡林佐知、木村展之、片貝祐子、揚山直英、八神健一、保富康宏
2. 発表標題 神経セロイドリポフスチノーシスを発症したカニクイザル
3. 学会等名 第23回日本ライソゾーム病研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下澤律浩、高橋一朗、棟居桂子、木村展之、揚山直英、片貝祐子、八神健一、保富康宏
2. 発表標題 神経症状の異常を呈するカニクイザルにおける原因遺伝子の同定と保因状況に関する調査
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 棟居佳子、岡林 佐知、下澤律浩、高橋一朗、木村展之、揚山直英、片貝祐子、八神健一、保富康宏
2. 発表標題 実験用カニクイザル繁殖コロニー内で見られた遺伝性の神経セロイドリポフスチノーシス
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下澤律浩
2. 発表標題 GnRH antagonistを用いたカニクイザル卵巢刺激法の検討
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新宅 洋、下澤律浩、近藤ひろみ、横田隆徳、内原俊記
2. 発表標題 サル心臓内の軸索末端追跡の試み：バーチャルスライドを用いた厚い切片の網羅的検討
3. 学会等名 第58回神経病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内原俊記、遠藤堅太郎、近藤ひろみ、岡林佐知、下澤律浩、保富康宏、安達栄治郎、木村展之
2. 発表標題 PSP/CBDモデルとしての高齡サル脳のタウ沈着
3. 学会等名 第58回神経病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ikeda Y, Shimozawa N, Nishiguchi KM, Funatsu J, Nakatake S, Fujiwara K, Tachibana T, Murakami Y, Hisatomi T, Yoshida S, Ishibashi T, Sonoda K.
2. 発表標題 Inherited retinal degeneration in the cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>).
3. 学会等名 The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://tprc.nibiohn.go.jp/shimozawa/index.html

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	高橋 一郎 (Takahashi Ichiro) (90171470)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター・客員研究員 (84420)	