

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18300140

研究課題名（和文）

カニクイザル・テーラーメイド ES 細胞を用いた移植医療モデルシステムの構築

研究課題名（英文）

Establishing cynomolgus monkey transplant models using tailor-made ES cells

研究代表者

鳥居 隆三(TORII RYUZO)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：50106647

研究成果の概要（和文）：

カニクイザルにおける体細胞核移植法によりテーラーメイドの ES 細胞樹立を行うことを試みた結果、胚盤胞期胚の作製は出来たがその後のテーラーメイドの ES 細胞樹立には至らなかった。この体細胞核移植法は胚の滅失の問題に加え胚盤胞期胚作製の効率が極めて悪く、実用化にはかなり困難と考えられた。他方、カニクイザルからの iPS 細胞は比較的容易に樹立できたことから、臨床応用研究にはむしろ iPS 細胞が有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

For the tailor-made ES cell establishment method using the somatic cell nuclear transfer method in the cynomolgus monkey, in addition to problem of embryo loss, the efficiency for creating blastocyst-stage embryos was extremely poor, and we reached the determination that regrettably ES cell establishment was extremely difficult. On the other hand, it was relatively easy to establish cynomolgus monkey iPS cells, and it goes without saying that iPS cells are expected to be useful in clinical application research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,000,000	0	4,000,000
2007 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	15,100,000	3,330,000	18,430,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：カニクイザル、体細胞核移植、テーラーメイド ES 細胞

1. 研究開始当初の背景

2004 年 Science 誌に韓国、黄禹錫教授らがヒトクローン胚由来の ES 細胞株樹立に成功したことから、免疫適合 ES 細胞（テーラー

メイド ES 細胞)を用いた細胞移植医療が急速に現実のものとなりつつあった。しかしこのテーラーメイド ES 細胞を用いた細胞移植医療を実際に臨床応用するためには霊長

類を用いた動物実験、および前臨床試験等が必要不可欠と考えられた。しかしながら、霊長類を用いた実験システムが確立されていないため、その有効性や安全性を検討する手段が全く無い状態にあり、これは今後の臨床応用にとって非常に危険な状況であると考えられた。例えばヒトの生殖医療においては、霊長類を用いた動物実験で安全性を確認する前に、ヒトでの体外受精、顕微授精などが先行した結果、今日になって異常や障害が報告され問題となっている。即ち全く未知の分野であるテラーメード ES 細胞を用いた細胞移植医療においてはその有効性、安全性を正確に評価、検証するモデルシステムの開発は急務であり、非常に重要な問題であると考えた。そこで本研究の目的は、ヒトと同じ霊長類に属するカニクイザルを用いて、テラーメード ES 細胞の樹立し、さらにそれを用いた細胞移植医療モデルシステムを構築することにより、今後の高齢化社会において深刻な問題となるヒトの細胞移植医療、再生医療の有効性および安全性を事前に検証することが可能になると考え研究を開始した。

2. 研究の目的

ヒトのテラーメード ES 細胞を用いた細胞移植医療は、体細胞核移植胚の作製、テラーメード ES 細胞の樹立、その分化細胞、細胞移植と数多くのこれまで医療に応用されたことのない新たな材料、技術から構成されるため、その有効性、安全性には細心の注意が払われるべきである。そこで、テラーメード ES 細胞のヒトへの臨床応用のためヒト近縁種であるサルを使用してモデルシステムを構築することを本研究の目的とした。マウスはヒトと生理学的に異なる点が多いうえに、ES 細胞においても、細胞表面マーカー、増殖因子とその要求性、細胞コロニーの形態等がヒト ES 細胞とまったく異なっている。一方でヒトとサル ES 細胞とはこれらの点が非常に類似していることが知られている。このような状況を判断すると、この前臨床試験は、できる限りヒトに近い動物種で行う必要性があり、ヒトと同様 ES 細胞が樹立されているカニクイザルは最適の動物である。このカニクイザルをモデルシステムとして使用することで、テラーメード ES 細胞を用いた細胞移植医療の有効性、安全性に関して、容易にヒトへ外挿できる正確な評価ができるだけでなく、その可能性と限界に関しても貴重な情報、結果が得られると考えられる。また本研究から得られた結果は、ヒトクローン胚研究の是非に関する議論、指針作製に関しても重要な科学的根拠を与えるという大きな意義があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 良質な成熟卵子の獲得: カニクイザルに FSH25IU/kg を連日筋肉内投与する法から、皮下に埋設した micro-infusion pump により 15IU/kg として 4 日間、その後卵胞の発育状況を腹腔鏡により確認後さらに 5 日間増量を含め投与する方法により、サルへの痛みや精神的負担を軽減し動物福祉の向上を図ると共に良質な成熟卵子を採取する方法として確立できた。

(2) 未成熟卵子の体外成熟培養法: 採取された未成熟卵子は、卵丘細胞、卵管由来細胞、卵管上皮細胞、可溶化羊膜細胞を用いる事により体外で成熟させることの出来る培養法を確立できた。

(3) 核移植法: 上記 (1)、(2) により獲得した成熟卵子から除核を行った後、細胞の核移植を行うが、ドナー細胞として羊膜細胞を用いる時は電気融合法が、胎子線維芽細胞の時はピエゾ注入法が効率良く胚盤胞期胚へと発生させることが出来ることを確認した。以降、皮膚細胞等通常の核移植法として後者のピエゾ注入法を用いることとした。さらに除核を核移植後に行うことにより胚盤胞期胚への発生効率が良くなることも確認できた。

(4) 単一割球からの ES 細胞樹立: 核移植後の胚盤胞期胚への発生効率が悪いことから、4-8 細胞期胚の単一割球からの ES 細胞樹立を単為発生胚について検討した結果、樹立に成功した。核移植胚について本法による樹立の試みを行いつつあるが、今後も継続して検討する予定である。

(5) トリコスタチン A 添加による体細胞核移植胚の発生改善の検討: マウスやウシの核移植後の胚の発生改善に用いられているヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A (trichostatin A) を添加した。その結果、核移植後の再構築胚への発生には TSA 添加は何ら効果がみられず、発生改善効果は得られなかった。

(6) 蛍光ライブセルイメージングによる体細胞核移植胚の染色体分配の観察: 体細胞核移植胚において蛍光ライブセルイメージングを試みた結果、胎子線維芽細胞の 1 例において、染色体の分配が正常に行われていることが確認でき順調に発生した胚盤胞期胚から内部細胞塊 (inner cell mass) を分離することが出来た。しかし、ES 細胞を継代 3 代目において接着が不十分で ES 細胞樹立には至らなかった。

4. 研究成果

過去 4 年間にわたり実施してきた体細胞核移植によるテラーメード ES 細胞作製の試みは、継続的な継代が出来る ES 細胞株としての樹立には至らなかった。今回の研究を通じて、テラーメード ES 細胞樹立のために幾つかのハードルである、成熟卵子採取法、未成熟卵

子の体外培養法、ピエゾ注入法とその後の活性化法等の技術、方法は胚盤胞期胚への発生効率から確立できたと考えている。しかしながら、胚盤胞期胚から内部細胞塊を取り出しES細胞として樹立するには至らなかった。これは、ライブセルイメージング法によって核移植された再構築胚の染色体分配をみた時、正常に行われているものが少なく、順調に発生がみられたものからですら安定化したES株には至らないことから、除核や核の注入法等の技術的難しさが今回明らかになった。Mitalipovら(2007)はアカゲザルで304個の再構築胚から2株を樹立したと報告したが、この成績からも核移植法によるテラーメードES細胞樹立が如何に困難であるかが分かる。

以上の通り、カニクイザルにおいては体細胞核移植法によるテラーメードES細胞樹立法は胚の滅失の問題に加え胚盤胞期胚作製の効率が極めて悪く、残念ながらES細胞樹立は極めて困難であるとの結論に至った。他方、カニクイザルからのiPS細胞は比較的容易に樹立できたことから、臨床応用研究にはむしろ今後はiPS細胞が有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Iwatani C, Yamasaki J, Okahara-Narita J, Tsuchiya H, Torii R. Follicular stimulation with micro infusion pump in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), *Exp Anim*, 58(3), S108, 2009. (査読有)
- ② Yamasaki J, Okahara-Narita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. Successful delivery after vitrification of cynomolgus monkey embryos using the Cryotom™, *Exp Anim*, 58(3), S101, 2009. (査読有)
- ③ Okahara-Narita J, Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. ES cell line derived from a single blastomere in cynomolgus monkey, *Exp. Anim*, 57, 3, 273, 2008. (査読有)
- ④ Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Tsuchiya H, Torii R. Success in deliveries of clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), *Exp. Anim*, 57,3,273, 2008. (査読有)
- ⑤ Yamasaki J, Okahara-Narita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. Effective condition for maturation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) oocytes in vitro, *Exp. Anim*, 57,3,272, 2008. (査読有)
- ⑥ Yamasaki J, Okahara-Narita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. Effect of epidermal

growth factor on in vitro maturation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) oocytes, *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 208, 2008. (査読有)

- ⑦ Tsuchiya H, Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Torii R. Influence of Hoechst staining for nuclear transfer on parthenogenetic embryos in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 111, 2008. (査読有)
- ⑧ Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Tsuchiya H, Torii R. Clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 100, 2008. (査読有)
- ⑨ Okahara-Narita J, Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. A cynomolgus monkey embryonic stem cell line derived from a single blastomere, *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 224-225, 2008. (査読有)
- ⑩ Okahara-Narita J, Tsuchiya H, Takada T, Torii R. Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), *Primates*, 48, 232-240, 2007. (査読有)
- ⑪ Tsuchiya H, Iwatani C, Yamasaki J, Okahara J, Okahara N, Torii R. Laparoscopic evaluation of ovarian reaction to hormone stimulation in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), *Reproduction Fertility and Development*, 19(1), 195, 2007. (査読有)
- ⑫ Iwatani C, Yamasaki J, Tsuchiya H, Okahara N, Narita J, Takada T, Torii R. Laparoscopic evaluation of ovarian reaction to hormone in cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*), *Exp Anim*, 5(53), 304, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 35 件)

- ① 山崎樹里、山縣一夫、岩谷千鶴、土屋英明、岡原純子、若山照彦、鳥居隆三. カニクイザル顕微授精胚へのライブセルイメージング法の適用、日本生殖再生医学会 第5回学術集会、東京、(2/21/2010).
- ② 岩谷千鶴、山崎樹里、土屋英明、岡原純子、鳥居隆三. 成熟卵子採取のためのインフュージョンポンプによるカニクイザル卵巣刺激法、日本生殖再生医学会 第5回学術集会、東京(2/21/2010).
- ③ 鳥居隆三. 生殖・再生医療研究におけるサルの有用性、第54回日本生殖医学会総会・学術講演会、金沢(11/22-23/2009).
- ④ 山崎樹里、岡原(成田)純子、岩谷千鶴、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル凍結胚由

- 来産子の獲得第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉(5/14-16/2009).
- ⑤ 岩谷千鶴、山崎樹里、岡原(成田)純子、土屋英明、鳥居隆三. マイクロインフュージョンポンプを用いたカニクイザル卵巣刺激法の検討第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉(5/14-16/2009).
 - ⑥ Yamanaka M, Hashimoto S, Okahara J, Yamasaki J, Torii R, Morimoto R. Abnormal distribution of cortical granules in monkey one-day old MII oocytes which were immature at oocyte retrieval after controlled ovarian hyperstimulation, American Society for Reproductive Medicine 64th Annual Meeting, San Francisco, California, USA (11/8-12/2008).
 - ⑦ 岡原(成田)純子、山崎樹里、岩谷千鶴、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザルにおける単一割球からの ES 細胞の樹立、日本実験動物科学技術2008(第55回日本実験動物学会総会)、仙台(5/15-17/2008).
 - ⑧ 岩谷千鶴、岡原(成田)純子、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル分割クローン個体の作出、日本実験動物科学技術2008(第55回日本実験動物学会総会) 仙台(5/15-17/2008).
 - ⑨ 岩谷千鶴、岡原純子、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル分割胚によるクローン個体の作出、日本生殖再生医学会 第3回学術集会、東京(3/30/2008).
 - ⑩ 岡原純子、岩谷千鶴、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザルにおける効率よい核移植法の検討、日本生殖再生医学会 第3回学術集会、東京(3/30/2008).
 - ⑪ Okahara-Narita J, Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. A cynomolgus monkey embryonic stem cell line derived from a single blastomere, 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008).
 - ⑫ Yamasaki J, Okahara-Narita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. Effect of epidermal growth factor on in vitro maturation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) oocytes, 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008).
 - ⑬ Tsuchiya H, Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Torii R. Influence of hoechst staining for nuclear transfer on parthenogenetic embryos in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008).
 - ⑭ Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Tsuchiya H, Torii R. Clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008).
 - ⑮ Okahara-Narita J, Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Wakimoto K, Kondo Y, Wakayama T, Torii R. Establishment of cynomolgus monkey embryonic stem cell line from a single blastomere, The Fourth Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society, Singapore (11/24-28/2007).
 - ⑯ 岩谷千鶴、岡原純子、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. 単為発生胚の発生を指標としたカニクイザル体細胞核移植法の検討、第 54 回実験動物学会総会、東京(5/23-25/2007).
 - ⑰ 岡原(成田)純子、岩谷千鶴、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル体細胞核移植胚の早期染色体凝集(PCC)の形成、第 54 回実験動物学会総会、東京(5/23-25/2007).
 - ⑱ Tsuchiya H, Iwatani C, Yamasaki J, Okahara J, Okahara N, Torii R. Laparoscopic evaluation of ovarian reaction to hormone stimulation in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Kyoto, Japan(1/6-10/2007).
 - ⑲ 山崎樹里、岩谷千鶴、岡原純子、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル卵子の体外成熟培養、第 92 回関西実験動物研究会、京都(12/8/2006).
 - ⑳ Tsuchiya H, Iwatani C, Yamasaki J, Okahara N, Terakado I, Narita J, Torii R. Evaluation of various gonadotropins for oocytes collection in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), The XIIth AAAP Animal Science Congress 2006, Busan, Korea(9/18-22/2006).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：未成熟卵子の体外成熟培養用添加剤及びそれを用いた成熟卵子の作出方法

発明者：櫻川宣男、鳥居隆三、小林譲

権利者：櫻川宣男、鳥居隆三、小林譲

種類：特許出願

番号：2007-165929

出願年月日：平成19年6月25日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqanimal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 隆三 (TORII RYUZO)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
・教授

研究者番号：50106647

(2) 研究分担者

岡原 (成田) 純子 (OKAHARA (NARITA) JUNKO)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
・助教

研究者番号：20464175

土屋 英明 (TSUCHIYA HIDEAKI)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
・技術専門職員

研究者番号：10378440

高田 達之 (TAKADA TATSUYUKI)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90206756

(3) 研究協力者

岩谷 千鶴 (IWATANI CHIZURU)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
・教務補佐員

研究者番号：

山崎 樹里 (YAMASAKI JYURI)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
・教務補佐員

研究者番号：