

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19880026

研究課題名（和文） イヌ ES 細胞株樹立システムの開発

研究課題名（英文） Development of system to establish canine embryonic stem cell line

研究代表者

鳩谷 晋吾（HATOYA SHINGO）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40453138

研究成果の概要：

卵巣から得られる、前胞状卵胞由来未成熟卵子を用いて、新たなイヌ体外受精技術の開発を試みた。(1) コラーゲン・ゲルの中にイヌ未成熟卵子を包埋した三次元培養法で長期間の培養が可能となり、未成熟なイヌ卵子を成長させることに成功した。(2) イヌ ES 様細胞の初代コロニー形成に成功した。また、10 代目まで ES 様細胞を培養できることが分かった。しかしながら、早期の胚からイヌ ES 様細胞の初代コロニーを形成することはできなかった。(3) イヌ未成熟卵子をエストロゲンおよび上皮成長因子を添加した培地で培養したところ、体外成熟が促進されることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：イヌ、ES 細胞、再生獣医療、体外受精、卵子

1. 研究開始当初の背景

現在までに、ヒトを含めたさまざまな動物種から ES 細胞株が樹立されており、これらを用いて神経や膵臓β細胞などの様々な細胞に分化させる研究が進められている。実際に

脊髄損傷マウスや糖尿病モデルマウスの治療に ES 細胞を利用した研究が報告されている。一方、イヌにおいては、研究代表者らが、自然交配させたイヌの子宮より胚盤胞期胚を回収し、その内部細胞塊からイヌ ES 様細胞

胞を分離・培養することに世界で初めて成功している。この細胞は *in vitro* で様々な細胞に分化することを確認しており、イヌ ES 細胞が再生獣医療に応用できる可能性を示した。

しかしながら、現在得られている細胞は、未分化な状態を長期間保つことができず分化してしまうために、移植治療に応用することが難しいものとなっており、ヒトやマウスと同様の性質をもつイヌ ES 細胞株の樹立が必要となる。イヌ ES 細胞株を樹立するためには、その適切な培養条件を探るために大量の受精卵が必要となる。特に、イヌの発情周期は他の動物と比較して大きく異なっており、無発情期期間が著しく長く、発情の回数は年に 1~2 回と極めて少ないため、研究代表者らが行ったような自然交配後、子宮から受精卵を *in vivo* で回収する方法では、回収できる受精卵の数に限界がある。以上のことから、イヌ ES 細胞株樹立のためには、卵巣に多数存在する未成熟卵子を採取し体外で受精させる体外受精によって *in vitro* で受精卵を作成する必要がある。

イヌにおいては、体外受精技術が非常に難しいとされており、受精卵まで体外受精で作製した報告はほとんどない。研究代表者らは、避妊手術で回収した卵巣より未成熟卵子を回収し、それをさまざまな生理活性物質を産生していると考えられる胎子線維芽細胞と共培養することで卵子の成熟を促し、その後、体外受精させることによって、桑実胚までの受精卵を作製することに成功している。

以上の背景より、現在までに申請者が開発したイヌ体外受精方法および ES 様細胞株分離・培養方法をさらに改良し、避妊手術で不要となった卵巣を利用し、そこから得た卵子を新しい培養システム（細胞外マトリクスを利用した 3 次元培養）によって培養した後に、体外受精することで受精卵を作製し、ES 細胞株樹立につなげるというイヌ ES 細胞株樹立システムの開発を考えるに到った。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、ES 細胞を分化させ、獣医臨床分野でさまざまな治療に用いることである。現在までの研究成果をもとにして、ES 細胞株の樹立を成し遂げるためには、イヌ体外受精技術の向上およびイヌ ES 細胞の培養条件の向上の 2 つの条件が必須と思われる。そこで、本研究の期間内には、以下の項目について検討する予定であった。

(1) 前胞状卵胞由来未成熟卵子を用いた新たなイヌ体外受精技術の開発
従来のイヌ未成熟卵子を用いた体外受精方

法では、受精卵を効果的に作製することができなかった。そこで、避妊したイヌの卵巣に多数存在する前胞状卵胞内に含まれている未成熟卵子を、3 次元的に培養する新しい培養システムを試すことによって、これまで以上にイヌ体外受精技術をすすめ受精卵の効果的な供給を目指す。

(2) ES 細胞株樹立条件の検討

ES 細胞株を得るために 早期胚における ES 細胞株分離方法の検討および ES 細胞培養・継代の方法の検討を行う。すなわち、各成熟段階における受精卵からの ES 細胞分離を試み、ES 細胞樹立のための効果的な期間、方法を探した後、得られた ES 細胞のコロニーをさまざまな培地、添加因子を試みることによって最適な培養環境を検索する。

(3) 体外受精由来受精卵を用いたイヌ ES 細胞株の樹立

(1)(2)の研究知見より、体外受精由来卵子からの ES 細胞株の樹立を目指すことで安定的にイヌ ES 細胞株を供給できる体制を整える。

3. 研究の方法

(1) 前胞状卵胞由来未成熟卵子を用いた新たなイヌ体外受精技術の開発

①：避妊手術で得た非発情期のイヌ卵巣から未成熟卵母細胞を回収し、コラーゲン・ゲルに包埋した。コラーゲン・ゲルに重層する培養液を 10%ウシ胎子血清 (FBS) 添加 M199 培地+ヒポキサンチン (HX) 0 mM、2 mM、4 mM の 3 群に分け、それぞれ 7 日間培養した。卵母細胞の直径、生存率、卵丘細胞付着卵子率、オルセイン染色による卵母細胞の核相を比較して最適な濃度を検討した。

②：①同様、卵母細胞をコラーゲン・ゲルに包埋した。培養液は HX 4 mM に、FSH を 0 µg/ml、0.5 µg/ml、5 µg/ml 添加した 3 群に分け、それぞれ 7 日間培養した。培養後、各濃度での生存率、卵丘細胞付着卵子率、核相を比較した。

③：オールドロップ二次元培養法により 48 時間培養した卵母細胞 (IVM 群) と、HX 4 mM および FSH 0.5 µg/ml を添加した培養液で 7 日間コラーゲン・ゲル培養後、オールドロップ二次元培養法により 48 時間培養した卵母細胞 (IVG+IVM 群) の核成熟率を比較した。

(2) ES 細胞株樹立条件の検討

①早期胚における ES 細胞分離方法の検討

雌イヌを交配後 14-16 日目に子宮灌流によって、桑実胚、胚盤胞期胚、脱出胚盤胞期胚を回収した。顕微鏡下で物理的に内部細胞塊を分離し、マウス Leukemia Inhibitory Factor (LIF)・20%FBS 添加 KNOCKOUT DMEM 培地を用いて、マウス胎子線維芽細胞と共培養し、ES 様細胞の初代コロニーが形成される割合を各受精卵で比較した。

②ES 細胞培養の条件検索

雌イヌを交配後 14-16 日目に子宮灌流によって、脱出胚盤胞期胚を回収した。顕微鏡下で物理的に内部細胞塊を分離し、マウス LIF・20%FBS 添加培地およびヒト LIF・20%FBS 添加培地をそれぞれ用いて、マウス胎子線維芽細胞と共培養し、継代後のコロニー形成数について比較した。さらに、FBS の代わりに KSR を添加した培地を用いた培養を試みた。

(3) 体外受精由来受精卵作製を目指した体外成熟条件の検討

エストロゲンおよび Epidermal Growth Factor (EGF) は卵子の成熟に関与していることが多くの動物種で報告されているが、イヌにおける作用については不明な点が多い。そこで、これらの因子がイヌ未成熟卵子の IVM に及ぼす影響を調べた。

①未成熟卵子と卵丘細胞におけるエストロゲンレセプター(ER) α 、ER β および EGF レセプター (EGF-R) の mRNA 発現を RT-PCR 法によって調べた。

②卵丘細胞の付着した卵子と除去した卵子に分け、エストロジオール-17 β (E₂) または EGF を添加した培地で培養後、卵子の成熟率を比較した。

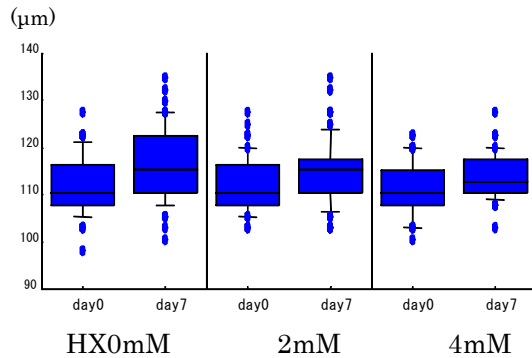
③未成熟卵子を M199 培地に E₂ と EGF の両方を添加した培地、あるいは、M199 培地に 10%FBS、E₂ および EGF を添加した培地で培養し、成熟率をそれぞれ比較した。

4. 研究成果

(1) 前胞状卵胞由来未成熟卵子を用いた新たなイヌ体外受精技術の開発

①：長期間、卵丘卵子複合体 (COCs) の形態を保持することが可能になり、卵母細胞の直径は全ての群で培養前 (約 110 μm) に比べて培養後 (約 115 μm) で有意に増加した。培養後の形態を比較すると、HX 0 mM 添加群では卵丘細胞がゲル内に拡散してしまうものがあつたが、HX 4 mM 添加群では COCs の形態を保っており、卵丘細胞付着卵

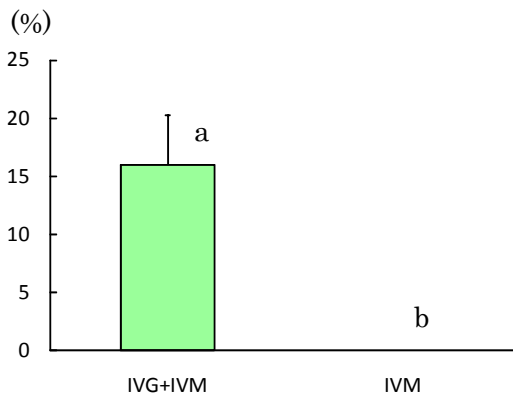
子の割合も有意に高値を示した。生存率は全ての群で高く、群間に有意差は認められなかった。卵核胞 (GV) 期の割合は HX 4 mM 添加群で有意に高値を示した。



①図：培養後の卵子直径

②：卵丘細胞付着卵子の割合は FSH 添加群で有意に高値を示した。さらに FSH 添加群では卵胞様の構造 (疑似卵胞) が観察され、その形成率も FSH 添加群で有意に高値を示した。生存率は全ての群で高く、群間で有意差は認められなかった。また、GV 期の割合に群間で有意差は認められなかった。

③：成熟 (MII) 卵子の割合は、IVM 群に比べて、IVG+IVM 群で有意に高値を示した。



③図：MII 卵子の割合

以上のことから、コラーゲン・ゲルによる三次元培養では、長期間 COCs の立体構造を維持することが可能になり、細胞質の直径が増加したことから、卵母細胞の発育に有効であることが示唆された。培養液には HX を添加することで、卵母細胞の核の成熟を GV 期の状態に保ちながら、その細胞質の発育を促進させ、さらに、FSH を添加することで疑似卵胞を作製できることが分かり、HX と FSH は、より効果的に卵母細胞の発育を促進することが示唆された。また、三次元培養後の IVM において MII 卵子の割合が高値を示したことから、卵母細胞の発育がその後の核成熟に効果的であることが示唆された。

(2) ES 細胞株樹立条件の検討

①早期胚における ES 細胞分離方法の検討
胚盤胞期胚、脱出胚盤胞期胚からは、初代 ES 様細胞のコロニーが得られたが、桑実胚からは、得られなかった。特に、脱出胚盤胞期胚からは、非常に効率にコロニーが得られることがわかった。

②ES 細胞培養の条件検索

マウス LIF・20%FBS 添加培地およびヒト LIF・20%FBS 添加培地をそれぞれ用いて、内部細胞塊をマウス胎子線維芽細胞と共培養し、継代後のコロニー形成数について比較したところ、どちらのコロニーも 10 代目まで継代が可能であった。また、FBS の代わりに KSR を添加した培地を用いると、イヌ ES 様細胞コロニーの増殖速度が遅くなり、継代に適さないことがわかった。

以上のことから、初期胚ではイヌ ES 細胞株が得られなかったことから、脱出胚盤胞が最適であることがわかった。さらに、培養条件では、ヒトやマウスの LIF 添加では、分化を抑制できないことがわかった。

(3) 体外受精由来受精卵作製を目指した体外成熟条件の検討

①ER β および EGF-R の mRNA 発現が卵子および卵丘細胞の両方に認められた。

②卵丘細胞付着卵子では 1 $\mu\text{g/ml}$ の E₂ 添加によって、卵核胞崩壊期の割合が有意に増加し、10 ng/ml の EGF 添加によって、卵核胞崩壊期および第一減数分裂中期の割合が有意に増加した。

③E₂ と EGF 両方の添加だけでは第二減数分裂中期 (MII) の割合は増加しないが、FBS をさらに添加することにより、MII の割合が有意に増加した。

以上の結果から、エストロゲンおよび EGF は卵子と卵丘細胞の相互に働き、卵子の成熟を促進することが示唆された。

さらに、これらの因子に FBS を添加することにより、より効果的に卵子の核成熟が促進されることがわかった。

本研究の結果より、避妊手術で不要となった卵巣を利用し、そこから得た卵子を新しい培養システム (コラーゲンゲルを利用した 3 次元培養) によって培養した後に、体外成熟することで、効果的に成熟した卵子を作製することに成功した。今後、成熟卵子を用いて体外受精を行うことで、受精卵を作製し、ES 細胞の樹立につながる可能性を示した。

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 2 件)

1. **Hatoya S.**, Sugiyama Y, Nishida H, Okuno T, Torii R, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Inaba T.
Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells.
Theriogenology. 2009 ;71 (4) :560-7.
査読あり
2. Sugiura K, Akazawa T, Fujimoto M, Wijewardana V, Mito K, **Hatoya S.** Taketani S, Komori M, Inoue N, Inaba T.
Construction of an expression vector for improved secretion of canine IL-18.
Vet Immunol Immunopathol. 2008 ;126 (3-4) :388-91. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. 鳩谷晋吾、宮武希衣、大村 雅、杉浦喜久弥、喜田加世子、川手憲俊、玉田尋通、稲葉俊夫
コラーゲン・ゲルを用いたイヌ卵母細胞の体外発育
第 134 回日本生殖医学会関西支部集談会
2009 年 3 月 14 日 大阪
2. 宮武希衣、鳩谷晋吾、奥野 剛、鳥居隆三、杉浦喜久弥、喜田加世子、川手憲俊、玉田尋通、稲葉俊夫
コラーゲン・ゲル培養イヌ卵母細胞の体外発育に及ぼす hypoxanthine と FSH の影響
日本獣医学会第 146 回大会
2008 年 9 月 25 日 宮崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳩谷 晋吾 (HATOYA SHINGO)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号 : 40453138