

自己評価報告書

平成23年 3月 31日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20380174

研究課題名(和文) 体外成熟卵胞由来イヌ ES 細胞の樹立と再生医療への応用

研究課題名(英文) Establishment of embryonic stem cell lines from in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes and their application to regenerative veterinary medicine

研究代表者

稲葉 俊夫 (INABA TOSHIO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00137241

研究分野：細胞病態学

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、iPS 細胞、卵子、体外成熟、神経細胞、骨髄間質細胞、再生医療

1. 研究計画の概要

本研究は、ヒト再生医療の実用化を円滑に進め得るトランスレーショナルリサーチの1つとして、ヒトと同様な生活習慣病の自然発症がみられるイヌに着目し、イヌ ES 細胞の樹立を行い、本細胞を用いてイヌの再生医療モデルを確立することを目的に、以下の項目について検討する。

(1) ES 細胞樹立に必要な胚盤胞期胚を、卵巣内卵母細胞から定常的かつ安定に供給できる方法の検討

(2) イヌ ES 細胞の培養法の検討

(3) ES 細胞から機能細胞への分化誘導と再生医療への応用の検討

2. 研究の進捗状況

(1) 卵巣内の優良卵子の選別法の検討

卵巣内の優良卵子の選別法について、材料採取の容易なネコを用いて、卵子の周りにある卵丘細胞の付着状態の観察および brilliant cresyl blue (BCB) 染色を行った。その結果、体外成熟に適した優良卵子は卵丘細胞付着状態が良好で、BCB 染色でよく染まった。本法で選別した優良卵子を体外成熟させた後、ネコ精巣上体精子と体外受精させることにより、前核形成受精卵の割合、卵割率、桑実胚/胚盤胞期胚の形成率を有意に上昇できた。

(2) 卵巣内未成熟卵子の体外成熟法の検討

卵子の立体構造を保つためのコラーゲン・ゲルによる三次元培養、および培養液に添加するホルモン等の影響を検討し、以下の結果を得た。

① コラーゲン・ゲルによる三次元培養で、卵母細胞の発育が促進された。

② 培養液に卵胞刺激ホルモン (FSH) を添加

することで、卵丘細胞の増殖を促し、成熟卵子の割合が有意に増加した。

③ 体外成熟卵子を得る上で、ウシ血清アルブミン含有培地に FSH とヒト胎盤性性腺刺激ホルモンの添加が有用であった。

(3) ES 細胞の培養法の検討

ES 細胞と同様の性質を有する人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を代用して細胞継代法について検討した。その結果、イヌ iPS 様細胞は、マウス線維芽細胞由来細胞株の STO 細胞を不死化してできた SNL 細胞をフィーダー細胞として 11 継代程度まで維持できた。

(4) ES 細胞から神経系細胞への分化誘導と細胞移植治療

既に樹立したサル ES 細胞から神経細胞への分化誘導方法およびイヌの脊髄損傷に対する細胞移植治療について検討し、以下の結果を得た。

① ラット胎子由来初代培養アストロサイトの培養上清、あるいはサル ES 細胞由来アストロサイトの培養上清を用いて、サル ES 細胞から神経細胞を簡便に分化誘導できた。

② 重度脊髄損傷を伴った椎間板ヘルニアのイヌにおいて、手術に加えて自己の骨髄中の幹細胞を含んだ骨髄間質細胞を投与することによって、運動機能が改善されることが示唆された。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究課題で掲げている検討項目の7割以上は既に達成できているため。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究を継続して、以下の項目に

ついて検討する。

(1) 卵巣内未成熟卵子の体外成熟と体外受精、および体外発育により、胚盤胞期胚の作製を行い、ES細胞樹立につなげる。

(2) イヌ ES細胞の培養法および凍結保存法の検討を行う。

(3) ES細胞から機能細胞への分化誘導と再生医療への応用の検討を行う。

5. 代表的な研究成果

(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 10 件)

① Ohmura M, Torii R, Hatoya S, Sugiura K, Tamada H, Kawate N, Takahashi M, Sawada T, Inaba T. Induction of fertile oestrus in dioestrous bitches by prostaglandin F₂α and a GnRH-agonist. *Vet. Rec.*, 2011, in press. 査読有

② Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Locomotor improvement after autologous bone marrow stromal cell intrathecal delivery in dogs with chronic spinal cord injury. *Am. J. Vet. Res.*, 2011, in press. 査読有

③ Pathirana IN, Ashida Y, Kawate N, Tanaka K, Makoto T, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Comparison of testosterone and insulin-like peptide 3 secretions in response to human chorionic gonadotropin in cultured interstitial cells from scrotal and retained testes in dogs. *Anim. Reprod. Sci.*, 2011, in press. 査読有

④ Sugiura K, Wijewardana V, Fujimoto M, Akazawa T, Yahata M, Mito K, Hatoya S, Inoue N, Inaba T. Effect of IL-12 on the canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 322-326, 2010. 査読有

⑤ Tamada H, Kawate N, Kawata N, Inaba T, Kida K, Hatoya S, Akune A, Nakama K, Kohsaka T, Sawada T. Detection of relaxin mRNA in the corpus luteum, uterus, and uterine cervix in the bitch. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 1383-1386, 2010. 査読有

⑥ Mit K, Sugiura K, Ueda K, Hori T, Akazawa T, Yamate J, Hatoya S, Inaba M, Inoue N, Ikehara S, Inaba T. INFγ markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. *Cancer Res.* 70, 7093-7101, 2010. 査読有

⑦ Pathirana IN, Tanaka K, Kawate N, Tsujii M, Kida K, Hatoya S, Inaba T, Tamada H.

Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the estrogen receptor 1 gene in normal and cryptorchid miniature dachshunds and chihuahuas. *J. Reprod. Dev.* 56, 405-410, 2010. 査読有

⑧ Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S., Takano M, Kondo Y, Inoue N. Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS One* 4, e6318, 2009. 査読有

⑨ 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* 71, 560-567, 2009. 査読有

⑩ 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.* 126, 388-391, 2008. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 稲葉俊夫ら、FSHおよびhCGによるイヌ卵子の体外成熟率の改善、第136回日本生殖医学会関西支部集談会、2011年3月5日、ハービスPLAZA (大阪)

② 今井 裕ら、イヌにおける人工多能性幹細胞樹立の試み、第136回日本生殖医学会関西支部集談会、2011年3月5日、ハービスPLAZA (大阪)

③ 稲葉俊夫ら、ES細胞によるパーキンソン病モデル動物の治療に関する基礎的研究、日本獣医学会第149回大会、2010年3月26日、日本獣医生命科学大学 (東京)

④ 鳩谷晋吾ら、再生医療の最前線—幹細胞：犬ES細胞 (胚性幹細胞) の開発、日本獣医学会第149回大会、2010年3月26日、日本獣医生命科学大学 (東京)

⑤ 稲葉俊夫ら、イヌ骨髄間質細胞の継代に伴う特性変化、日本獣医学会第148回大会、2009年9月27日、鳥取大学 (鳥取)

⑥ 稲葉俊夫ら、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、大阪市立大学 (大阪)

[その他]

ホームページ情報

<http://kyoindb.acs.osakafu-u.ac.jp/profile/out.cudjDYHfHMO.PEVGDxV-iw==.html>