

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2012～2014
課題番号：24240066
研究課題名(和文) マウス<->ラットキメラにおける「自己」解析

研究課題名(英文) Self and non-self in mouse-rat chimera

研究代表者

岡部 勝 (Okabe, Masaru)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：30089875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：母体-胎児相互認識における自己非自己の検討を行った。妊娠は同種であれば非自己でも受け入れるが、異種の場合はどのような自己非自己認識があるのかについて、免疫機能をほとんど持たない重篤な免疫不全マウスの子宮にラット胚の移植を試みたが、ラット胚が野生型マウスに比してより長く育つようなことはなかった。そこでマウス・ラット異種キメラを母体としたマウスの2細胞期胚をテトラプロイドにすることにより胎盤がマウスで胎児がラットと分離された胎児を着床させる系を組み合わせ検討により、母体-胎児相互認識の初期には免疫応答以外の原因で異種の胚が育たなくなることが示された。

研究成果の概要(英文)：A special interaction is said to be established during pregnancy between the maternal immune system and fetal cells to allow the survival and the normal growth of the fetus. A local immunosuppression is considered to be an important feature of a pregnancy. However, when we used heavily immunodeficiency mice for the recipient of rat embryos, the duration until the miscarriage was the same with wild-type mice. This was also true when the mouse-rat chimera was used for the recipient mothers. Moreover, producing embryos with mouse placenta and rat fetus also revealed that the immunity was not the first cause of a xenogenetic abortion.

研究分野：動物実験学

キーワード：免疫 マウス・ラットキメラ 自己・非自己

1. 研究開始当初の背景

ヤギ (goat) と羊 (sheep) の受精卵を 8 細胞期のころに集合させると羊とやぎの卵細胞が入り混じったキメラ胚ができ、これをヤギまたは羊の仮親に移植すると “geep” が誕生する。単純にやぎに羊の胚を移植しても、あるいはその逆でも子供は生まれない。キメラにすることが必要である。

同様にマウスとラットの組み合わせでもキメラの作製が試みられていたがいずれもマウス・ラットキメラを産仔として得ることは成功していなかった。

我々は、この原因は胎盤の種特異性がネックになっているからではないかと考えマウスの胚盤胞にラットの ES 細胞を注入したり、あるいはその逆にラットの胚盤胞にマウスの ES 細胞を注入したりしてキメラ胚を作製した。胎盤は卵子のみに由来するので、キメラ胚からできてくる胎盤と一致する種の仮親に移植したところ、予想通りマウス・ラットキメラの産仔を作製することに成功した。この異種キメラはほぼ、マウスサイズであった。一方、ラットの胚盤胞にマウスの ES 細胞を注入して作製した異種キメラは、ほぼラットのサイズであった。

すなわち、これらの異種キメラ動物はマウスとラットの間ではなく胚盤胞を提供した種の外観を示し、あたかも ES 細胞が別の種として振る舞っている様に見えた。

2. 研究の目的

本研究では、マウス・ラットキメラの生物学的特性を詳しく検討し、マウス・ラット異種キメラにおける自己非自己の認識について研究を行う。また、妊娠は母体が非自己である子供を自分の体内に受け入れるという特殊な系であるが、その機構については不明である。そこでマウス・ラット異種キメラの系を用いて母体-胎児相互認識メカニズムについても解析を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **マウス+ラット ES キメラと、マウス、ラットの生物学的特性の比較**：マウスの胚盤胞にラット ES 細胞をインジェクションして、マウス+ラット ES キメラ胚を作製し、偽妊娠マウスに移植して、マウス+ラット ES キメラを誕生させた。心拍数や体重、臓器重量を測定し、比較解析を行った。また、ES 細胞を EGFP で標識したものをを用いることによって、各臓器への細胞分布について、観察を行った。

(2) **母体-胎児相互認識における自己非自己の検討**

重篤な免疫不全マウス及び、マウス+ラット ES キメラの雌にラットの胚盤胞を移植し、どのステージまで発生をサポート

トするのかを検討した。

また、胎盤にしかならず、胚には寄与しないテトラプロイドのマウス胚を作製し、胎盤に寄与しないラット ES 細胞を注入した、テトラプロイドコンプリメンテーション胚を偽妊娠マウスに移植し、どのステージまで発生をサポートするのかを検討した。

4. 研究成果

(1) **マウス+ラット ES キメラと、マウス、ラットの生物学的特性の比較**：マウスの胚盤胞にラットの ES 細胞を注入して得られるマウスサイズになるマウス・ラット異種キメラについて、心拍数や体重、臓器重量について測定し、マウス及びラットの値と比較解析を行った。その結果、これらの測定値は、マウスに類似する傾向が見られた(図 1)。

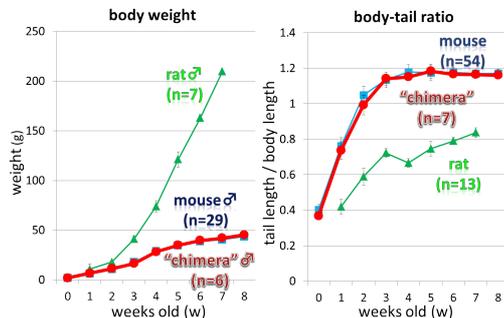


図 1 マウス・ラット ES キメラと、マウス、ラットの体重・体長の比較

また、ラット細胞の分布について観察したところ、脳や心臓といった誕生後に細胞分裂が停止する臓器においては、成獣でもラット細胞の存在を確認することができた。一方、肝臓や精巣といった、細胞増殖が盛んな臓器において、新生児の時点では、ラット細胞の存在を確認することができたが、成獣では、消失しているか、または、新生児よりも著しく減少している様子が観察された(図 2)。

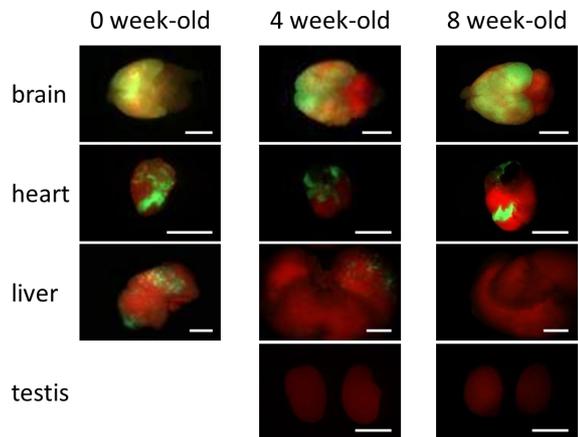


図 2 マウス・ラット ES キメラの各種臓器と、週齢による細胞分布の変化
緑:ラット由来細胞、赤:マウス由来細胞

これらの結果より、マウス ラットキメラにおいて、ラット細胞は増殖が著しい臓器や細胞では、成獣までに細胞競合を含む何らかのメカニズムで淘汰されている可能性が示唆された。

(2) **母体-胎児相互認識における自己非自己の検討**：同種であれば非自己でも寛容性を示すが、異種では妊娠が成立しない母体-胎児相互認識における自己非自己について検討した。

免疫応答の関与：免疫機能をほとんど持たない重篤な免疫不全マウスを偽妊娠として、その子宮にラット胚の移植を試み検証した。その結果、免疫不全マウスにおいてもラット胚は、正常に発生しないことがわかった(図3)。



図3 胚移植後の免疫不全マウスより回収した原条期胚

右・中：マウス胚、左：ラット胚

さらに、免疫システムが確立される以前に一個体となるため、免疫学的には、マウスとラットの両細胞を自己とみなすはずの、マウス ラット異種キメラを母体として、ラット胚の移植を試み、個体発生について検討を行った。しかしながら、重篤な免疫不全マウスの結果と同様、ラット胚は正常に発生していなかった。

胎盤の関与：胎盤が母体と同じ種であれば、胎児に異種の細胞が混ざっていても個体として誕生する。そこで、マウスの2細胞期胚をテトラプロイドにすることにより胎盤にはなるが胚そのものには発生しないようにしてから、ラットのES細胞を打ち込みラット胚の個体発生について検討した。

その結果、マウスからラットを誕生させることはできなかったが、免疫不全マウスや、マウス ラットキメラにラット胚を移植した場合に比べて、個体発生がより後期まで進行することが分かった。

これらの結果より、発生における母体-胎児相互認識の初期には免疫応答による制御がなされているのではなく、単純な細胞接着性などによる細胞間相互認

識機構が主に働いていることが示唆された。

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13件)

Yagi H, Nagano T, Xie MJ, Ikeda H, Kuroda K, Komada M, Iguchi T, Tariqur RM, Morikubo S, Noguchi K, Murase K4, Okabe M, Sato M. Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. *Sci Rep*. 2014 Sep 15;4:6353. doi: 10.1038/srep06353. (査読有)

Fujihara Y, Okabe M, Ikawa M. GPI-Anchored Protein Complex, LY6K/TEX101, Is Required for Sperm Migration into the Oviduct and Male Fertility in Mice. *Biol Reprod*. 2014 Mar 20;90(3):60. (査読有)

doi: 10.1095/biolreprod.113.

Okabe M. Lessons Learned in Andrology: seeing is believing. *Andrology*. 2014 Jan;2(1):3-4. (査読なし)

doi: 10.1111/j.2047-2927.

Morioka Y, Fujihara Y, Okabe M. Generation of precise point mutation mice by footprintless genome modification. *Genesis*. 2014 Jan;52(1):68-77.

doi: 10.1002/dvg.22727. (査読有)

Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*. 2013 Nov;140(22):4471-9.

doi: 10.1242/dev.090613. (査読有)

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013 Nov 27;3:3355.

doi: 10.1038/srep03355. (査読有)

Kobayashi S, Totoki Y, Soma M, Matsumoto K, Fujihara Y, Toyoda A, Sakaki Y, Okabe M, Ishino F. Identification of an Imprinted Gene Cluster in the X-Inactivation Center. *PLoS One*. 2013 Aug 6;8(8):e71222. (査読有)

doi: 10.1371/journal.pone.0071222.

Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development*. 2013 Aug;140(15):3221-9.

doi: 10.1242/dev.094854. (査読有)

Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M, Okabe M. miR-200b and miR-429 function in mouse ovulation and are essential for female

fertility. Science. 2013 Jul 5;341(6141):71-3.

doi: 10.1126/science. (査読有)

Fujihara Y, Tokuhira K, Muro Y, Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 May 14;110(20):8111-6.

doi: 10.1073/pnas.1222166110. (査読有)

Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. Transgenic Res. 2013 Feb;22(1):195-200.

doi: 10.1007/s11248-012-9635-x. (査読有)

Inoue N, Nishikawa T, Ikawa M, Okabe M. Tetraspanin-interacting protein IGSF8 is dispensable for mouse fertility. Fertil Steril. 2012 Aug;98(2):465-70.

doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.029. (査読有)

Yamaguchi R, Fujihara Y, Ikawa M, Okabe M. Mice expressing aberrant sperm-specific protein PMIS2 produce normal-looking but fertilization-incompetent spermatozoa. Mol Biol Cell. 2012 Jul;23(14):2671-9.

doi: 10.1091/mbc.E11-12-1025. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

磯谷 綾子、小川 昌起、田中 高夫、松村 貴史、山縣 一夫、岡部 勝、伊川 正人「マウス ラット ES キメラを介した遺伝子変異ラットの作出」、0-4、『第 62 回日本実験動物学会総会』、2015 年 5 月 28 日、京都テルサ

Masaru Okabe, Mechanism of mammalian fertilization and gene-manipulated animals. The 12th International Symposium on Spermatology, Newcastle, Australia: Thomas Mann Lecture, Aug 14, 2014

Masaru Okabe, Sperm-egg interaction and gene-manipulated animals. Gordon Research Conference: Fertilization & Activation of Development, Holderness, NH, USA, Keynote Lecture, July 18, 2013

磯谷 綾子「マウスとラットの異種キメラの話」、『第 5 回生殖若手の会』、2012 年 07 月 27 日、東京大学三崎臨海実験所

磯谷 綾子「A trial to form an organ from ES cells --- a rat thymus in rat-nude mouse chimera.」、『第 7 回 研究所ネットワーク国際シンポジウム』、2012 年 6 月 14 日、東北大学加齢医学研

研究所

〔図書〕(計 3 件)

磯谷 綾子、伊川 正人 南山堂 プログレッシブ生命科学、140-147、2014

磯谷 綾子、伊川 正人 南山堂 生命科学から創薬へのイノベーション、145-155、2014

磯谷 綾子 羊土社 実験医学、1304-1306、2014

〔その他〕

ホームページ等

遺伝子機能解析分野 HP : <http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡部 勝 (OKABE MASARU)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号 : 30089875

(2)研究分担者

磯谷 綾子 (ISOTNI AYAKO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号 : 20444523

(3)連携研究者

伊川 正人 (IKAWA MASAHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号 : 20304066

山縣 一夫 (YAMAGATA KAZUO)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号 : 10361312