

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640045

研究課題名(和文) 高次脳機能研究モデルとしての一卵性多子ニホンザルの作成

研究課題名(英文) Production of monozygous Japanese monkeys as animal models for Cognitive Neuroscience.

研究代表者

岡本 宗裕 (OKAMOTO, Munehiro)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70177096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：一卵性多子ニホンザルの作製を目指し、関連する生殖工学技術について検討した。卵子採取の効率化の為、卵巣刺激処置におけるホルモン投与量を検討し、既報の半量に減じることでよりクオリティの高い卵子が得られる傾向が確認できた。精子の凍結保存について検討し、保存液としてテストヨークバッファーを用い、融解後に1mM Caffeine および1mM dbcAMPを含むB0液で処理することで、顕微授精等の受精補助を伴わずに体外受精卵を作製できる手法を確立した。体外受精卵および分割受精卵について、受胎雌に移植試験を実施したが、いずれも妊娠を確認するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to produce monozygous Japanese monkeys as animal models for Cognitive Neuroscience, we examined and improved associated embryological engineering techniques. It was revealed that it was effective to make the dose of the hormone half of the known report to raise efficiency of the egg collection. TEST Yolk Buffer was suitable for the cryopreservation of the sperm. After melting, sperm was treated by the B0 solution with 1mM Caffeine and 1mM dbcAMP. Such sperm could use *n* vitro fertilization. Although an egg fertilized *in vitro* or splitter fertilized eggs were transplanted to female Japanese macaques, we were not able to confirm the pregnancy.

研究分野：実験動物学

キーワード：一卵性多子 ニホンザル 高次脳機能

1. 研究開始当初の背景

マウス・ラットは実験動物として最も頻用され生命科学分野全般の発展に貢献しているが、これはこれらの齧歯類が多産であることに加え、遺伝的に均一な個体を簡単に入手できるという利点があるからである。サル類はこれら齧歯類と比較して、生理学的にもヒトに近縁なことから、ヒトのモデル動物として有用な実験動物であることは間違いない。特に高次脳機能研究などの脳研究分野では、マウス・ラットからでは得ることのできない貴重な動物実験データを得ることができる。この一方で、サル類にはマウス・ラットのような近交系コロニーが存在しないという、実験動物としてのウイークポイントがある。遺伝的に均一な集団を実験に供試できればより精度の高い実験データの集積が可能であるが、現状の遺伝的ばらつきの大きい集団では、高度な比較実験においては遺伝的背景の相違がデータ上でのノイズとなり厳密な解析を妨げてしまう。しかしながら、近交系を得る為には重度の近親交配を重ねる必要があり、はたしてサル類ではそれが動物種の性質として可能か否かという点とともに、奇形を始めとした種々の遺伝的要因による疾病・疾患を伴うことも大いに予想されることから、倫理的な問題も非常に大きい。

遺伝的相同個体を得る手段としてはクローン技術の適用も考えられるが、サル類での体細胞クローンは研究分担者らのマーマセットでの取り組み (Sotomaru et al., Cloning Stem, 2010) も含めて成功例は無い。また、最近 iPS 細胞からマウスの卵子作成に成功したことが報告されたが、サル類の iPS 細胞研究はまだその段階に達していない。そこで、我々は、これらの問題を解決して遺伝的に均一なサル類実験動物を作製する手段として、一卵性複数子による遺伝的相同個体の作製を進めることとした。一方で、この手法で遺伝的相同個体を作成する場合、多数の個体を同時に得ることは難しい。そこで、少数個体でも実験・研究が可能な高次脳機能研究を念頭に置き、マカク属サルの中でも特に優れた認知能力をもつニホンザルを対象とした。

2. 研究の目的

サル類はヒトに近縁であることから、ヒトのモデル動物として有用な実験動物である。しかし、マウスやラットと異なり、遺伝的に均一な集団、いわゆる近交系コロニーが存在しないため、個体によるばらつきが大きいことがウイークポイントとなっている。申請者らの研究の最終目標は、効率的かつ安定的な遺伝的相同サル作製システムを構築することである。本研究課題では、他の実験動物や家畜で実績のある受精卵分割ならびに受精卵クローンの手法をニホンザル用に改良・至適化し、ニホンザル一卵性複数子を作成することを目的としている。

一卵性複数子は同じ遺伝的背景をもつた

め、これらが作成できると、高次脳機能研究や認知ゲノミクスなどの脳研究の推進に貢献できる。また、家畜、マウス・ラットでは、体外受精や受精卵移植等の胚操作はごく普通の技術になりつつあるが、サル類、特にマカク類では十分な成果が上がっていない。本研究の実施によりニホンザルの胚操作の技術が確立すれば、今後需要が予想されるノックアウトザルの作成等、動物実験の高度化に向けて、きわめて意義が大きい。

3. 研究の方法

我々は、これまでに生殖工学技術を駆使した哺乳類実験動物の作製・開発に取り組んできた。近年では特にマーマセットおける発生工学技術の開発ならびにクローン技術の応用に組み込み、卵子の採取や体外培養等の生殖工学基盤技術を構築するとともに、世界初の受精卵クローンマーマセットの作製に成功した。本研究では、これまでのマーマセットおける知見をニホンザルに適用して下記の実験計画を遂行することで、受精卵分割および受精卵クローン技術による一卵性複数子作製の手段を検討し、動物実験に有用な遺伝的相同ニホンザルの作製を目指す。

そこでまず、ホルモン投与により卵巣刺激処置を施したメスより卵胞卵子を採取し、体外成熟させた後に体外受精を実施して体外受精卵の作製を試みた。また、同処置を施したメスとオスの交尾を設定した後に子宮還流による生体由来受精卵の採取を試み、これらの受精卵について体外培養条件を確認することで体外卵子操作等の基盤技術を確認した後、分割受精卵ならびに受精卵クローン胚の作製試験を行った。京都大学霊長類研究所にて飼育されている6~17歳の雌ニホンザル7頭(延べ11頭)を対象とし、予想される月経の時期の2-3週間前より隔日に採血を行い、血漿中のプロゲステロンおよびエストラジオールの値を測定した。卵巣刺激処置は、発情休止期(月経予定日の前後3日程度)にある個体に0.9mg/頭のGnRHアゴニスト(リュープリン)を単回皮下投与、2週間後から20IU/kgのFSH(ゴナピュール/フォリルモン)を7日間連続筋肉内投与、ならびに400IU/kgのhCG(ゴナトロピン)を単回筋肉内投与することで実施した。hCG投与後36-40時間目に、麻酔下で外科的処置により露出させた卵巣から卵胞卵子を吸引採取し、得られた卵子の数とステージを確認した。

雌個体にホルモン投与により卵巣刺激処置を施した後、麻酔下で外科的処置により露出させた卵巣から卵胞卵子を吸引採取し、未成熟卵子については体外成熟培養を施した。次いで、得られた成熟卵子について、射出精子もしくは精巣上体精子を用いて体外受精および顕微授精を施した後、体外培養することで発生能を確認した。射出精子は麻酔下の雄個体へのプローブを介した電気刺激の付与により、また精巣上体精子は経皮的精巣上

体精子吸引術により採取し、一部の精子はグリセリン添加 Egg York Buffer で凍結保存した後に供試した。体外受精は IVF100 液、体外培養には ISM1 液および 10% FBS 添加 BlastAssist 液(胎子線維芽細胞との供培養)を用いて実施した。

4. 研究成果

延べ 11 頭の内 10 頭から、平均 23.6 個(7~73 個)の卵子が得られ、成熟卵子の割合は 29.7%(23.3~50.0%)であった。ホルモンの測定結果から、7~11 月に採卵を実施した 5 頭は無排卵性周期にあることが示唆され、何れの個体からも卵胞卵子を得ることができた。一方、12~3 月に実施した 4 頭は排卵性周期にあることが示唆され、多くの卵子が得られる傾向にあった。また、ホルモン値の高く変動が大きい個体ほど卵巣が腫脹し、採卵数が多くなる傾向が見られた。

体外成熟卵子からの受精卵作製手段として体外受精・顕微授精を実施した。射出精子を用いた場合には受精卵は得られなかったが、経皮的に採取した精巢上体精子を用いることで 53%の受精率が得られ、受精卵の 38%が胚盤胞へ発生した。しかし、これらの精子を凍結保存した後に体外受精に供試した場合は、何れも受精卵は得られなかった。これに対し、顕微授精では高率に受精卵を作製できた(79%)が、胚盤胞へ発生は低率(6%)であり、手法改善の余地があると考えられた。また、これらの技術を基盤として得られた受精卵を用いて分離試験を実施した結果、4 分離した場合でも胚盤胞まで発生可能であることを確認した。

実際に一卵性多子二ホンザルを作製するため、関連する生殖工学技術の検討と受精卵の移植試験を行った。卵子採取の効率化の為、卵巣刺激処置におけるホルモン投与量を検討し、既報の半量に減じることでよりクオリティの高い卵子が得られる傾向が確認できた。精子の凍結保存について検討し、保存液としてテストヨークバッファを用い、融解後に 1mM Caffeine および 1mM dbcAMP を含む B0 液で処理することで、顕微授精等の受精補助を伴わずに体外受精卵を作製できる手法を確立した。また、受精補助処置として体外受精に先立って卵子の透明帯の一部を切開することで、受精率の向上をはかることができた。二ホンザルの繁殖期に合わせ、体外受精卵について 1 頭、分割受精卵について 2 頭の受胎雌に移植試験を実施したが、いずれも妊娠を確認するには至らなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

外丸祐介 霊長類における体外受精卵作製に関わる生殖工学技術について(2015 年 1 月 22-23 日) 日本マーモセット研究会(犬山)。

外丸祐介、信清麻子、畠山照彦、吉岡みゆき、神田暁史、印藤頼子、兼子明久、永野昌志、柳川洋二郎、高江洲昇、岡本宗裕 ニホンザル凍結保存精子の体外受精能(2014 年 10 月 23-24 日) Cryopreservation Conference 2014(岡崎)。

印藤頼子、外丸祐介、信清麻子、畠山照彦、吉岡みゆき、兼子明久、岡本宗裕 ニホンザル卵子のガラス化保存(2014 年 10 月 23-24 日) Cryopreservation Conference 2014(岡崎)。

今井啓雄、岡本宗裕、印藤頼子、外丸祐介、信清麻子、神田暁史、伊佐正、永野昌志、柳川洋二郎、高江洲昇、北島龍之介、今村公紀、平井啓久 希少霊長類遺伝資源の保存方法の確立(2014 年 10 月 23-24 日) Cryopreservation Conference 2014(岡崎)。

外丸祐介 霊長類の体外培養系卵子について(2014 年 8 月 26-27 日) 京都大学霊長類研究所研究会「霊長類への展開に向けた幹細胞・生殖細胞・エピゲノム研究」(犬山)。

外丸祐介、信清麻子、畠山照彦、吉岡みゆき、印藤頼子、兼子明久、高江洲昇、柳川洋二郎、永野昌志、岡本宗裕 ニホンザルにおける体外培養系受精卵の作製(2014 年 5 月 15-17 日) 日本実験動物学会(札幌)。

信清麻子、印藤頼子、兼子明久、石上晔代、山中淳史、畠山照彦、吉岡みゆき、岡本宗裕、外丸祐介 ニホンザルにおける卵巣刺激処置の効果について(2014 年 5 月 15-17 日) 日本実験動物技術者協会(札幌)。

外丸祐介 霊長類における遺伝的相同個体の作製技術について(2013 年 12 月 12 日) 日本マーモセット研究会(福岡)。

外丸祐介 霊長類におけるクローン技術の開発(2013 年 5 月 16 日) 日本実験動物学会(つくば)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

名称:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本宗裕 (OKAMOTO Munehiro)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70177096

(2)研究分担者

外丸祐介 (SOTOMARU Yusuke)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
研究者番号：90309352

(3)連携研究者

信清麻子 (NOBUKIYO Asako)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教
研究者番号：10294563

畠山照彦 (HATAKEYAMA Teruhiko)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・技術員
研究者番号：50452595

伊佐 正 (ISA Tadashi)
生理学研究所・生命化学研究科・教授
研究者番号：20212805