

令和元年6月6日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06766

研究課題名（和文）カニクイザルにおけるインヒビンワクチンを用いた効率的な新規採卵法の開発

研究課題名（英文）Development of an efficient oocyte collection method using active immunization against inhibin in cynomolgus monkeys.

研究代表者

中家 雅隆（Nakaya, Masataka）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任助教

研究者番号：90805459

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：インヒビンに対するactive immunizationを誘導するために、(1) カニクイザル卵胞で発現しているメジャーなインヒビンのスプライシングバリエーションを同定した。同定したバリエーションの配列を基に免疫誘導を行うための“ヤギ”インヒビンと類似または共通のアミノ酸配列を同定した。(2) また血清AMH値を測定することによる卵巣予備能の高い採卵候補カニクイザルのスクリーニングシステムの構築を行った。(3) さらにカニクイザル発生工学研究の発展型として、Oct3/4のレポーターとしてtdTomatoを発現するカニクイザルES細胞を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インヒビン免疫中和によるFSH投与への個体間の卵巣応答の均一化、AMH測定による採卵候補個体の選抜による採卵コストの低下、樹立したレポーター発現ES細胞を用いることでカニクイザル発生工学研究の効率化が図られ、本邦の基礎生物学研究や医学研究に大きく貢献することが期待される。また、卵巣のホルモン応答への均一化や採卵候補個体の選抜により、供試動物数を削減できることから、本研究の成果は実験動物福祉の観点からも非常に重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study examined the induced active immunization against inhibin. The results are summarized as follows: (1) identified a splice variant of inhibin expressed in cynomolgus monkey follicles. (2) an amino acid sequence similar or common to “goat” inhibin was identified to induce active immunization. (3) developed a screening system for cynomolgus monkey using serum AMH. (4) generated an Oct3/4 reporter cynomolgus monkey ES Cell line.

研究分野：発生工学

キーワード：発生工学 ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

これまで医学・生物学研究には、遺伝子改変の容易さからげっ歯類が頻用されてきたが、ヒト病態を再現できない例が多数報告されている (Blesa and Pizedborski., *Front Neuroanat.*, 2014)。また近年開発されたゲノム編集技術により、今まで遺伝子改変が困難であった動物種においても変異を誘導することが可能となった。これらのことからヒト病態を忠実に再現できる非ヒト霊長類を用いたモデル動物の開発が求められている。

効率的かつ安定的に遺伝子改変動物を得るためには多くの卵子を用いた詳細な条件検討が必要である。しかし、単排卵動物であるカニクイザルは FSH による卵胞発育誘起を行ってもげっ歯類と比べ採卵数が少なく、また採卵個体ごとに実験に供試できる卵子数が大きくばらつくことが実験条件を検討する上で大きな制約となっている。そこでカニクイザル 1 頭から採卵できる高品質な卵子の数を増加させることができれば、実験動物福祉の理念の一つである Reduction に則り、効率良く初期胚におけるゲノム編集基盤技術の開発が可能になると考えた。

## 2. 研究の目的

近年、非ヒト霊長類であるカニクイザルの遺伝子改変技術が確立されたことから (Chansel-Debordeaux and Bezard., *Animal Model Exp Med*, 2019, Review)、ヒト病態を再現するヒト疾患モデルカニクイザルの作出が期待されている。しかしながら、1 頭から採卵できる卵には“数と質のばらつき”があり、実験に供試できる平均卵子数は発生工学で主に用いられるマウスと比べ非常に少ない。疾患モデル個体を作製するためには、非常に緻密な条件設定が必要であり、“卵の数と質のばらつき”が研究を進める上で非常に大きな障壁となっている。そこで、本研究は実験に供する卵の数と質を高める新規採卵方法を確立すること、さらに検証過程で得られた知見を基に、カニクイザル発生工学基盤技術の発展に寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

まずカニクイザル卵胞から発現する生殖生理に関するホルモンの動態について、基礎的情報を収集する。カニクイザルのインヒピンには 2 つのスプライシングバリエントがあることが知られていることから、カニクイザルの卵丘細胞を用いた qRT-PCR を行い卵胞で発現しているインヒピンのメジャーなスプライシングバリエントについて検討する。内在性のインヒピンによる投与 FSH に対する負のフィードバックを抑制するために、インヒピンに対して active immunization の誘導を検討する。qRT-PCR の結果を基に active immunization を行うための“ヤギ”インヒピンと類似または共通のアミノ酸配列を同定する。また ELISA 法によるカニクイザル Anti-Mullerian Hormone (AMH) の測定系を確立し、卵巣予備能の高い採卵候補カニクイザルのスクリーニングシステムの構築を行う。さらにカニクイザル発生工学の応用展開として、CRISPR/Cas9 を用い Oct3/4 のレポーターとして tdTomato を発現するカニクイザル ES 細胞株の作製を行う。

## 4. 研究成果

- (1) カニクイザル卵胞で発現しているメジャーなインヒピンのスプライシングバリエントの同定

内在性のインヒピンに対して active immunization を誘導するために、カニクイザル卵胞で発現しているインヒピンのスプライシングバリエントについて卵丘細胞を用いた

qRT-PCR により検討した。その結果、卵胞で主に発現しているスプライシングバリエーションを同定した。また同定したバリエーションの配列を基に active immunization の誘導を行うため “ヤギ” インヒピンと類似または共通のアミノ酸配列を決定した。今後、決定した配列を基にインヒピンペプチドを合成し、アジュバントと混合することでインヒピンワクチンを作製する。ワクチン投与による免疫獲得および FSH に対する卵巣の反応を継続して検討していく。

## (2) 卵巣予備能の高い採卵候補カニクイザルのスクリーニングシステムの構築

血清 Anti-Mullerian Hormone (AMH)測定による、卵巣予備能の高い採卵候補カニクイザルのスクリーニングシステムの構築を行った。AMH は発育過程の卵胞から分泌されるホルモンであり、血清中の AMH 値は卵巣内卵子の数と相関することが分かっている。霊長類特異的 AMH 抗体を用いた ELISA 法による血清 AMH 測定の結果、カニクイザルにおいてもヒトと同様に AMH 値と総採卵数には正の相関が見られた。このことから採卵候補カニクイザルの AMH 値を測定し、卵巣予備能の低い個体を候補から除外することで、一定数以上の卵子を安定して発生工学実験に供試することが可能となった。

## (3) Oct3/4 レポーター発現カニクイザル ES 細胞株の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて Oct3/4 遺伝子座の終止コドンを P2A-tdTomato IRES Zeocin<sup>R</sup> pA カセット配列と置換した Oct3/4 レポーター発現カニクイザル ES 細胞株を作製した。この細胞株は Zeocin<sup>R</sup> を有していることから、Zeocin を培地に添加することにより Oct3/4 を発現していないフィーダー細胞や分化細胞を排除することができる。このことにより、未分化な ES 細胞を簡便に単離することが可能となった。

本研究課題の成果である “インヒピンに対する active immunization の検討” と “AMH 測定による採卵候補個体の選抜”、“Oct3/4 レポーター発現 ES 細胞株” について、更に検討を重ねることで本邦のカニクイザル発生工学研究の進展への相乗効果が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kobayashi K, Tsukiyama T, Nakaya M, Kageyama S, Tomita K, Murai R, Yoshida T, Narita M, Kawauchi A, Ema M. Generation of an OCT3/4 reporter cynomolgus monkey ES cell line using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Res.* 37: 2019. (査読有)

Seita Y, Tsukiyama T, Azami T, Kobayashi K, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakaya M, Tanabe H, Hitoshi S, Miyoshi H, Nakamura S, Kawauchi A, Ema M. Comprehensive evaluation of ubiquitous promoters suitable for the generation of transgenic cynomolgus monkeys. *Biol Reprod.* 2019

### 〔学会発表〕(計 0 件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rcals.jp/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。