

令和元年6月5日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14977

研究課題名(和文) カニクイザルにおける革新的採卵システムの開発

研究課題名(英文) Development of an innovative oocyte collection system in cynomolgus monkey

研究代表者

清田 弥寿成 (Seita, Yasunari)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任講師

研究者番号：80737023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：効率的かつ安定的に遺伝子組換えカニクイザルを得るためには、多くの卵を安定的に採卵出来る方法を構築することが必要である。そこで、(1)卵の数を増加させる(2)卵の質を高める(3)卵を複数回採卵出来るような、新しい過剰排卵誘起法を開発することが解決策になると考えた。現在までに3)2度目以降の採卵時に、ヒトFSHへの反応性が極端に低下することに関しては、血清中のヒトFSH抗体を測定するELISA系を立ち上げ、2度目以降の過剰排卵時にFSH抗体価が上昇し、その上昇が卵巣のヒトFSHへの反応低下を引き起こすことを明らかにし、ヒトFSH抗体産生に対する解決法としてカニクイザルFSHの合成を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カニクイザルはヒトにもっとも近い使用可能な実験動物である。ゲノム編集技術の発達から今後多くのヒト疾患モデルがカニクイザルを用いて作出されることが予想され、ゲノム編集に使用される卵の安定的な供給は非常に重要である。本研究では複数回採卵時に採卵数が減少する一因(FSH抗体の産生)を明らかにしたことから今後FSH抗体の産生を抑制する採卵方法を開発すれば、卵の安定供給に繋がり、ヒト疾患モデルの効率的な作製に繋がることとが予想される。

研究成果の概要(英文)：Cynomolgus monkeys is considered to be a valuable model organism for human disease modeling. It has been reported by many laboratories that mature oocytes can be recovered from cynomolgus monkey through the ovarian stimulation by human follicle-stimulating hormone (hFSH), yet it is not known whether mature oocytes can be efficiently obtained through second ovarian stimulation by hFSH. We report that some of the ovaries were stimulated efficiently by hFSH even after first ovum pick up, but the others were stimulated poorly by hFSH. The antibodies against hFSH were detected in the serum of female monkeys with the poorly stimulated ovaries. Collectively, these data suggest that production of anti-hFSH antibodies in the serum may cause the poor ovarian response to hFSH stimulation, and the detection of the antibody as well as the observation of the ovary over the course of hFSH administration is useful to predict the favorable second ovarian stimulation by human FSH.

研究分野：発生工学

キーワード：過剰排卵 カニクイザル

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

1. 研究開始当初の背景

現在まで多くのヒト疾患モデル動物が遺伝子改変が容易なげっ歯類を用いて開発されてきた。しかし、げっ歯類モデルではヒト病態を再現できない例がインフルエンザを含め報告されているため、よりヒトの病態を忠実に再現できる非ヒト霊長類モデルの開発が期待されている。旧世界霊長類は胚や胎盤の構造、内分泌・代謝、さらには血清、血液成分の多くがヒトに酷似しているため、得られたデータのヒトへ外挿が比較的容易である。実験動物用の旧世界霊長類としては、アカゲザルが挙げられるが繁殖に季節性があるため、年間を通じて繁殖可能なカニクイザルの有用性が高いと考えられる。滋賀医科大学動物センターでは、全身で GFP を発現するトランスジェニックカニクイザルの作出に世界で初めて成功した(Seita *et al.*, *Sci. Rep.* 2016)。その後、さらに 4 頭の遺伝子組換え個体を得ていることから、カニクイザルの遺伝子組換え技術を概ね確立したと考えている。現在、変異型 APP(アミロイド前駆体タンパク質)を過剰発現するアルツハイマーモデルサルを製作中であり、まもなく卵にレンチウイルスを感染させ、個体作出を行う予定である。このように GFP 遺伝子を、ヒト疾患に関係する遺伝子に置換することで、今後多くのヒト疾患モデルカニクイザルを作出していく予定であるが、効率的かつ安定的に遺伝子組換え個体を得るためには、以下に述べるように、多くの卵を安定的に採卵出来る全く新しい方法を構築することが必要不可欠と考える。現在、遺伝子組換え個体を作成する時に用いる卵は、ヒト卵胞刺激ホルモン(ヒト FSH)とヒト絨毛性線刺激ホルモン(ヒト CG)の投与により、過剰排卵処理を行うことで得ている。しかし 1) 採卵数にばらつきがあること(総採卵数:12~85 個と大きくばらつく、平均 29 個)、2) 卵の質が低いこと(高品質の卵数: 平均 15 個、約 50%) 3) 2 度目以降の採卵時に、ヒト FSH への反応性が極端に低下することが観察されており、大きな問題となっている。加えて、採卵に用いるホルモン類(約 10 万円/回)、採卵用のドナーカニクイザル(45 万円)、レシピエントカニクイザル(約 45 万円)は極めて高価である。現在、遺伝子組換えカニクイザルを 1 頭出産させるためには、約 6 頭のレシピエントに移植することが必要であることから、500 万円程度の費用がかかる。この高コスト性は、遺伝子組換えカニクイザルを効率的に作出していく上で、大きな障壁となっている。そこで、(1) 卵の数を増加させる(2) 卵の質を高める(3) 卵を複数回採卵出来るような、新しい過剰排卵誘起法を開発することが解決策になると考えた。これにより、低コストかつ効率的に遺伝子組換え個体を作成できることが期待される。具体的には、1) 採卵数のばらつき、2) 卵の質については、インヒビン α 抗血清を使用することにより、インヒビン α によって抑制されている内在性の FSH を増加させ、総卵数の増加・高品質化を達成できると予想している。この方法は、近年げっ歯類や家畜において実績があり、過剰排卵が難しかった近交形、野生マウスにおいて、採卵数の増加や卵の質の改善が報告されている(Hasegawa *et al.*, *Bio. Reprod.* 2015, Takeo *et al.*, *PLoS One* 2015)。このことから、カニクイザルにおいても採卵数の増加、卵の質の改善が期待される。また 3) の 2 度目以降の採卵数の低下についてはヒト FSH への抗体産生によってホルモンへの反応が低下することが原因として考えられるため、カニクイザル

の FSH の大量発現、精製法を開発すれば、この問題を克服できると考えた。

2. 研究の目的

ごく最近、非ヒト霊長類モデルのカニクイザルの遺伝子改変技術が確立されたことから、今後多くのヒト疾患モデルがカニクイザルを用いて作出されることが期待される。しかしそのドナーとして用いられる卵の質、数にばらつきがあることから、安定的な採卵システムを構築することが必要不可欠と考える。そこで本申請では**卵の数、質を高め、さらに複数回採卵可能なカニクイザルの新しい過剰排卵誘起法を開発することを目的とした。**

3. 研究の方法

この研究計画では、卵の数、質を高め、さらに複数回採卵可能なカニクイザルの新しい過剰排卵誘起法を開発する。具体的にはインヒビン抗血清とカニクイザル FSH の過剰排卵への効果を調べる。

研究の進め方として、

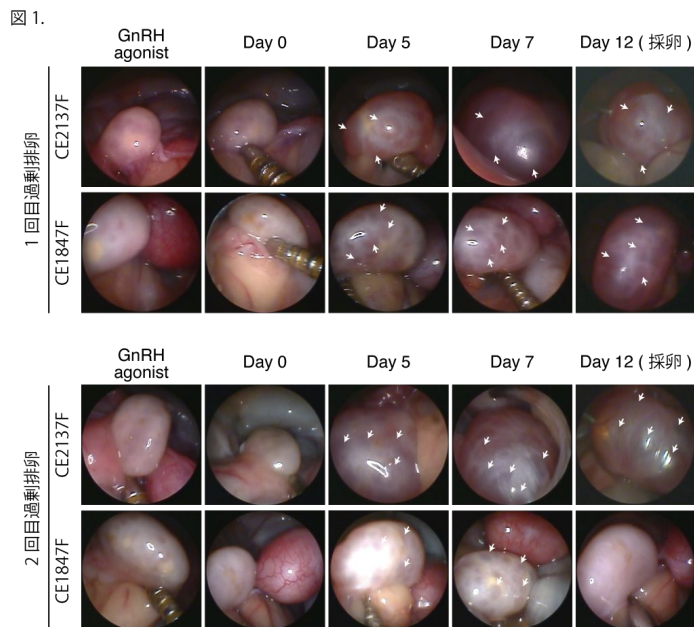
1) 卵の数、質についてはインヒビン・抗血清を作製、投与し内在性の FSH を用いた過剰排卵法を構築する。

2) 複数回採卵可能な過剰排卵法については抗体産生を抑制できるカニクイザル FSH を作製し投与することで2度目の採卵が可能かどうか検討する。

4. 研究成果

研究の当初計画では第一にインヒビン・抗血清を作製、投与し内在性の FSH を用いた過剰排卵法を構築するとしたが、インヒビン a 抗血清の作成手法の構築自体が困難であり作成は上手く行かなかった。そこで 2) の複数回採卵可能な過剰排卵法について検討を行った。

効率的な遺伝子組換えカニクイザル作出には安定的な卵の供給が欠かせないが、2度目以降の採卵ではヒト FSH への卵巣の反応が極端に低下する事が観察されている(図1)。その原因として、**ヒト FSH への抗体産生**が挙げられる。カニクイザルの FSH を投与すればこの問題を克服できると予想される。そこで、カニクイザルにおいてヒト

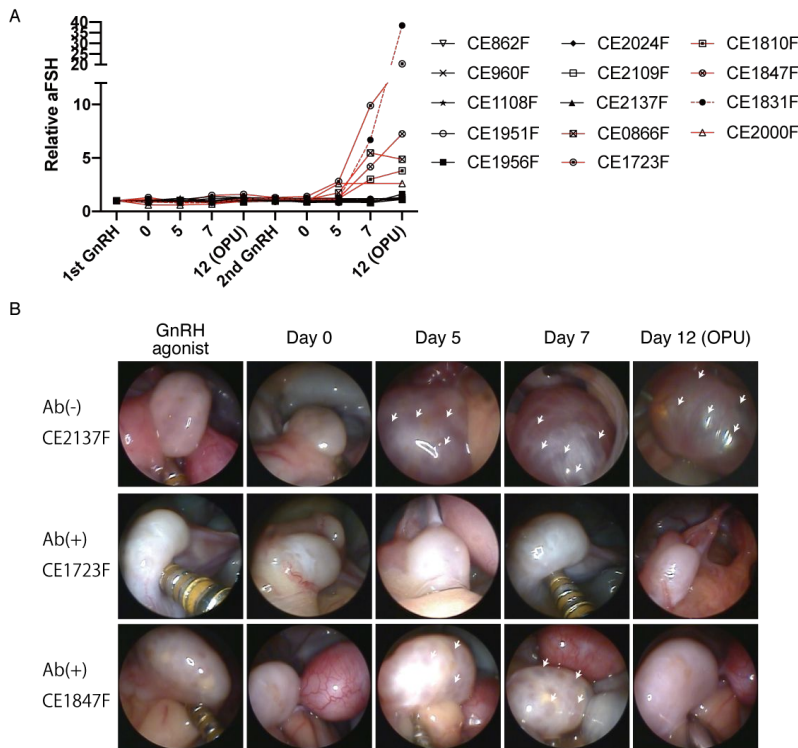


1回目過剰排卵、2回目過剰排卵時の卵巣像。2回目では卵巣がFSHに反応しない個体が観察された

FSH に対する抗体の産生が 2 度目以降の採卵時のホルモンに対する卵巣の反応低下の原因であるかを明らかにし、抗体産生が起こらないカニクイザル FSH の作製を目的に研究を行った。

2 回採卵を行った個体の血清を用いて FSH 抗体の測定を行ったところ 2 回目に採卵数が 50%以下に低下した 5 個体(図 3)全てから FSH 抗体の上昇が認められた(図 2A)。

図 2

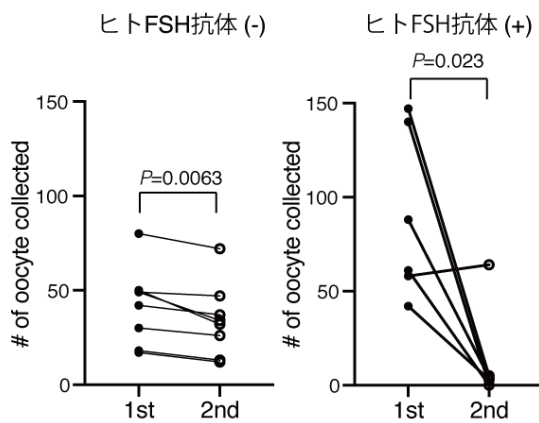


(Seita et al., 2019b)

そこで抗体産生が抑制されることが期待されるカニクイザル FSH の合成を行った。カニクイザル FSH 発現ベクターを作製し、CHO 細胞にトランスフェクションを行なった。薬剤選抜による FSH 発現細胞の濃縮、限界機積法による 1 細胞由来コロニーの樹立、FSH-ELISA によるコロニーの選抜によって FSH 高分泌株の作製に

FSH 抗体の上昇がみられた個体 (A. 赤線) では卵胞の発育がみられなかった (B.Ab+ 矢頭)

図 3.

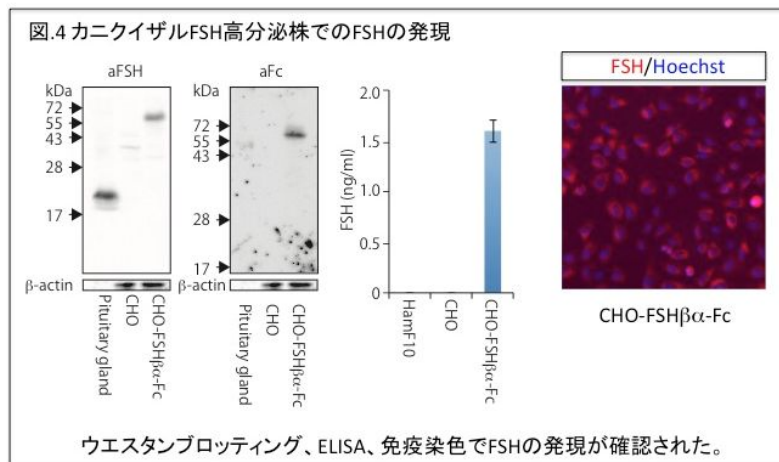


抗体が上昇した個体では採卵数が大きく減少した

成功した(図 4)。

本研究ではヒト FSH に対する抗体の産生が 2 度目以降の採卵時のホルモンに対する卵巣の反応低下の原因であるか事を明らかにし、さらにそれを克服することが期待されるカニクイザル FSH の作製に成功した。今後、作製したカニクイザル FSH 高分泌株から分泌されたカニクイザル FSH を生成し、カニクイザルに投与しその有効性を

検討する予定である。



〔雑誌論文〕(計2件)

1. **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.** *Biology of Reproduction* (2019a) Accepted, doi: 10.1093/biolre/ioz040.
2. **Seita Y***, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Kimura F, Murakami T, Ema M. Poor second ovarian stimulation in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) is associated with the production of antibodies against human follicle-stimulating hormone. ***Journal of Reproduction and Development*** (2019b) Accepted, doi: 10.1262/jrd.2018-156. *co-corresponding author

〔学会発表〕(計4件)

1. 清田 弥寿成、築山 智之、浅見 拓哉、岩谷 千鶴、土屋 英明、中家 雅隆、中村 紳一郎、依馬 正次. カニクイザルで安定的に高発現するユビキタスプロモーターの検討. 第19回日本生殖工学会学術講演会 (2019)
2. 清田 弥寿成、築山 智之、浅見 拓哉、岩谷 千鶴、土屋 英明、中村 紳一郎、依馬 正次. トランスジェニックカニクイザル作製のためのユビキタスプロモーターの検討. 第111回日本繁殖生物学会大会 (2018)
3. **Seita Y**, Matsushita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Ema M. Anti-FSH antibodies associate with poor response of ovarian stimulation in IVF of cynomolgus monkey. ***50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*** (2017)
4. **Seita Y**, Matsushita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Ema M. Reduced ovarian response after 2nd human FSH administration is caused by production of antibody against human FSH in cynomolgus monkey. ***The Forth World Congress for Reproductive Biology*** (2017)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。