

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18300140

研究課題名 (和文)

カニクイザル・テーラーメイド ES 細胞を用いた移植医療モデルシステムの構築

研究課題名 (英文)

Establishing cynomolgus monkey transplant models using tailor-made ES cells

研究代表者

鳥居 隆三(TORII RYUZO)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号:50106647

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：カニクイザル、体細胞核移植、テーラーメイド ES 細胞

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、ヒトと同じ霊長類に属するカニクイザルを用いて、テーラーメイド ES 細胞を樹立しそれを用いた細胞移植医療モデルシステムの構築によって細胞移植医療の有効性、安全性を正確に評価、検証することであり、これはまた ES 細胞を用いる再生医療が実現可能なものとなる事が出来るか否かをも決定づける極めて重要な位置にある。即ち、これからの高齢化社会において深刻な問題となるヒトの細胞移植医療、再生医療の有効性および安全性を事前に詳細に検証することにもつながる。しかしながら、世界で初めて報告された韓国のヒトのテーラーメイド ES 細胞樹立の報告が捏造であったことが判明し、体細胞核移植技術の難しさが改めて指摘されたことから、本研究も慎重に検討を進めている。

2. 研究の進捗状況

カニクイザル卵巣刺激法により成熟未受精卵子を採取したのち、除核と体細胞核移植法の確立を行い、体細胞クローン胚の作製に成功しさらに ES 細胞樹立に至った。しかしながら、未分化状態での継代培養中にコロニーの消失が見られた。クローン胚作製向上を目指して核移植後に除核する独自の方法を考案した結果従来法に比べて 4～6 倍もの効率で体細胞クローン胚を作製することには成功したが、ES 細胞樹立には至らなかった。

3. 現在までの達成度

②おのおの順調に進展している。

(理由)

体細胞核移植法として、核移植後に除核する独自の方法によって、従来法の 4～6 倍の効率で体細胞クローン胚を作製することに

成功した。さらに、そこから ES 細胞を 1 株の樹立することに成功したが、途中消滅した。少なくとも、卵巣刺激によって成熟未受精卵子の獲得、除核、核移植、その後の再構築胚の発生にいたる方法は確立できたものと考えられ、80%の達成状況にあると判断する。

4. 今後の研究の推進方策

体細胞核移植クローン胚からの ES 細胞樹立が極めて困難な状況にあることから、その原因を検討するため、今後体細胞移植再構築胚の発生状況を、染色体の分裂を目視できる方法で観察することにより、今までの方法で作製する体細胞クローン胚を形態発生的に評価を試みる。一方、顕微受精胚からの割球からの ES 細胞樹立と産子獲得による同一遺伝子を持つ移植実験モデル系の作製、さらに拒絶反応の生じない iPS 細胞の樹立についても検討し、体細胞核移植胚との比較検討を行う。

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 Iwatani C, Yamasaki J, Tsuchiya H, Okahara N, Narita J, Takada T, Torii R. Laparoscopic evaluation of ovarian reaction to hormone in cynomolgus monkey(*Macaca Fascicularis*), *Exp Anim*, 5(53),304,2006. (査読有)
- ② Tsuchiya H, Iwatani C, Yamasaki J, Okahara JN, Okahara N, Torii R. Laparoscopic evaluation of ovarian reaction to hormone stimulation in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), *Reproduction Fertility and Development*, 19(1), 195, 2007. (査読有)
- ③ Okahara-Narita J, Tsuchiya H, Takada T,

- Torii R. Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), Primates, 48, 232-240, 2007. (査読有)
- ④ Okahara-Narita J, Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. A cynomolgus monkey embryonic stem cell line derived from a single blastomere, Fertility and Development, 20(1), 224-225, 2008. (査読有)
- ⑤ Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Tsuchiya H, Torii R. Success in deliveries of clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), Exp. Anim, 57,3,273, 2008. (査読有)
- [学会発表] (計24件)
- ① Tsuchiya H, Iwatani C, Yamasaki J, Okahara N, Terakado I, Narita J, Torii R. Evaluation of various gonadotropins for oocytes collection in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), The XIIth AAAP Animal Science Congress 2006, Busan, Korea(9/18-22/06).
- ② 山崎樹里、岩谷千鶴、岡原純子、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル卵子の体外成熟培養、第92回関西実験動物研究会、京都(12/8/06).
- ③ Tsuchiya H, Iwatani C, Yamasaki J, Okahara JN, Okahara N, Torii R. Laparoscopic evaluation of ovarian reaction to hormone stimulation in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Jan 6-10, 2007, Kyoto, Japan.
- ④ 岡原(成田)純子、岩谷千鶴、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル体細胞核移植胚の早期染色体凝集(PCC)の形成、第54回実験動物学会総会 東京(5/23-25/07)
- ⑤ 岩谷千鶴、岡原純子、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. 単為発生胚の発生を指標としたカニクイザル体細胞核移植法の検討、第54回実験動物学会総会 東京(5/23-25/07)
- ⑥ Okahara-Narita J, Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Wakimoto K, Kondo Y, Wakayama T, Torii R. Establishment of cynomolgus monkey embryonic stem cell line from a single blastomere, The Fourth Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society, Singapore (11/24-28/07)
- ⑦ Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Tsuchiya H, Torii R. Clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008)
- ⑧ Tsuchiya H, Iwatani C, Okahara-Narita J, Yamasaki J, Torii R. Influence of hoechst staining for nuclear transfer on parthenogenetic embryos in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008)
- ⑨ Yamasaki J, Okahara-Narita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. Effect of epidermal growth factor on in vitro maturation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) oocytes, 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008)
- ⑩ Okahara-Narita J, Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R. A cynomolgus monkey embryonic stem cell line derived from a single blastomere, 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, USA (1/5-9/2008)
- ⑪ 岡原純子、岩谷千鶴、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザルにおける効率よい核移植法の検討、日本生殖再生医学会第3回学術集会、東京(3/30/08)
- ⑫ 岩谷千鶴、岡原純子、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル分割胚によるクローン個体の作出、日本生殖再生医学会 第3回学術集会、東京(3/30/08)
- ⑬ 岩谷千鶴、岡原(成田)純子、山崎樹里、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザル分割クローン個体の作出、日本実験動物科学技術2008(第55回日本実験動物学会総会) 仙台(5/15-5/17)
- ⑭ 岡原(成田)純子、山崎樹里、岩谷千鶴、土屋英明、鳥居隆三. カニクイザルにおける単一割球からのES細胞の樹立、日本実験動物科学技術2008(第55回日本実験動物学会総会)、仙台(5/15-5/17)
- ⑮ Yamanaka M, Hashimoto S, Okahara J, Yamasaki J, Torii R, Morimoto R. Abnormal distribution of cortical granules in monkey one-day old MII oocytes which were immature at oocyte retrieval after controlled ovarian hyperstimulation, American Society for Reproductive Medicine 64th Annual Meeting, San Francisco, California, USA(11/8-12/08)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計1件)
- ・「未成熟卵子の体外成熟培養用添加剤及びそれを用いた成熟卵子の作出方法」：平成19年6月25日、特許出願 2007-165929 (櫻川宣男、鳥居隆三、小林譲)