

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：平成 19 年 4 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日  
 課題番号：19700377  
 研究課題名（和文） カニクイザル胚性幹細胞のコロニーの構造とその特性に関する研究  
 研究課題名（英文） Characteristic of embryonic stem cell of the cynomolgus monkey  
 (*Macaca fascicularis*)  
 研究代表者 岡田浩典

## 研究成果の概要：

霊長類のES細胞は、マウスES細胞と異なる性状を有している。たとえば、ES細胞を継代するときに細胞を単離してしまうと、霊長類の場合、ES細胞は新たなコロニー形成が困難になる。本研究ではカニクイザルES細胞のコロニーの特性を明らかにすることを第一の目的とし、品質を維持しながら継続培養する方法の確立を目指した。

本研究で用いたES細胞は当センターで樹立したカニクイザルのES細胞（TRSK-1）であり、テラトーマ形成能や細胞表面マーカーから未分化細胞であることが確認されている。また、扁平な形態のコロニーを形成するという霊長類ES細胞の特徴を有していた。酵素を用いて細胞を単離した場合、コロニーの形成は認めなかった。コロニーをピペッティング等で大まかに分離したときにはコロニーが形成され、半年以上にわたって未分化能を維持したまま継代が可能であることが確認された。その継代培養時にFGF2の添加を必要としないことが明らかとなり、少なくともこのES細胞はFGF2低依存性であることが判明した。FGF2非添加の状態でレチノイン酸による神経系細胞への分化誘導実験を試みたら、ニューロンへの選択的分化を認めた。さらに、分化誘導時にFGF2を添加したところ、ニューロンに加えて\*\*\*\*への分化を確認した。すなわち、FGF2は\*\*\*\*へ分化させるための必須のグロースファクターである可能性が示唆された。このような特徴はTRSK-1株特有のものか、霊長類ES細胞に共通のものかは判明していない。

また、関連実験として始原生殖細胞（PGc）の単離培養実験を行ってきた。カニクイザルのPGcに関する研究により、日本生殖医学会学術奨励賞を受賞した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	240,000	2,840,000

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：(1)再生医学 (2)細胞・組織 (3)発生・分化

#### 1. 研究開始当初の背景

霊長類のES細胞は、マウスES細胞と異なる性状を有している。たとえば、カニクイザルES細胞株は扁平であるのに対しマウスのそれは立体構造をなしている。また、ES細胞を継代するときに細胞を単離してしまうと、霊長類の場合、ES細胞は新たなコロニー形成が困難になるという背景もあった。さらに、同じ霊長類であってもES細胞株ごとに性状が異なる可能性も有しており、その特性の解析は重要課題であった。

#### 2. 研究の目的

本研究では医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで樹立したカニクイザルのES細胞を用いて、そのES細胞株の特性を明らかにし、品質を維持しながら継続培養する方法を見出すことを目的とした。当初、継代時の細胞の単離にその特性を見出すヒントがあると考えていたが、多くの研究者がその現象に注目し、現在、その要因が解明されつつある。

#### 3. 研究の方法

カニクイザルの顕微操作 (ICSI) により構築した受精卵の発育培養により胚盤胞を作成し、その胚盤胞から ES 細胞を樹立した。この ES 細胞を TRSK-1 と命名し、本研究はこの ES 細胞株の特性を解明することに重点をおいた。

この ES 細胞株は継代過程で必須と考えられていた FGF2 に対し低依存性である可能性を見出し、FGF2 非添加の培地で継代を繰り返し、その株の未分化状況を検索した。

また、FGF2 は神経系細胞への分化誘導因子でもあるため、FGF2 非添加というシンプルな条件で神経系細胞への分化誘導実験を試みその特性を解析した。

#### 4. 研究成果

本研究で用いたカニクイザルの ES 細胞である TRSK-1 株は、細胞表面抗原およびテラトーマ形成能の検索により未分化能を有していることが確認された。この株は FGF2 非添加の培地で継代しても半年以上にわたり未分化能を維持することが明らかとなった。

FGF2 非添加の環境下で、レチノイン酸に

よる神経系細胞への分化誘導を試みたところ、ニューロンのみを選択的に分化することが明らかとなった。また、FGF2 を添加することでニューロンに加えて・・・へ分化させることができた。

#### 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 1 件)

H. Okada, M. Hatori, N. Shimozawa, H. Tsuchiya, T. Kuwana, T. Sankai

Collection and culture of primordial germ cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)  
*Reproductive Medicine and Biology*, 6: 203-210, 2007

[学会発表] (計 3 件)

M. Hatori, H. Okada, N. Shimozawa, F. Sultana, K. Yagami, T. Sankai

Comparison of the proliferation of embryonic stem (ES) cells, embryonic fibroblast of cynomolgus monkeys and the ES cells of mouse  
16<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan)

羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、八神健一、山海直  
カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖様式の比較  
第 54 回日本実験動物学会 2007 年 5 月 (東京)

岡田浩典、下澤律浩、羽鳥真功、山海直  
二種類のカニクイザル ES 細胞株へのリポフェクションによる遺伝子導入条件の検討  
第 54 回日本実験動物学会 2007 年 5 月 (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
岡田浩典

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし