

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2012

課題番号：20500371

研究課題名（和文） ヒト医療研究用モデルサル供給ネットワークの構築

研究課題名（英文） Establishment of a network of model-monkey supply for human medical researches

研究代表者

土屋 英明（TSUCHIYA HIDEAKI）

滋賀医科大学・動物生命科学センター・技術専門職員

研究者番号：10378440

研究成果の概要（和文）：移植拒絶を生じさせない特定集団のサル個体群作製は重要な意味を有している。そこで本研究は、同じ主要組織適合抗原複合体（MHC）遺伝子を持つサルを多数獲得しその個体を必要に応じて利用者に供給することを目的とした。すなわち、免疫応答が均一となる個体を作成し、それを共同研究機関あるいは当センター利用者に供給するシステムを開発する。個体部群の供給源として当センターのみならず国内外には多数の個体数を保有する機関・企業が存在しており、これら機関と連携し MHC 抗原の検索母群の個体数を増加させることにより、更に作出の可能性を増大させることが可能となる。このネットワークを構築することにより、当センター以外の機関・企業でも Stage1. カニクイザルにおける MHC 遺伝子に関する情報を共有することが出来た。Stage2. 遺伝的背景の明らかな個体の生殖細胞を提供することでその保存、あるいは同一形質の個体を作成することが出来た。Stage3. 選抜・作出した個体群を用いた臨床応用研究が可能となった。本システムの構築によりモデル動物の供給体制が運用を開始した。

研究成果の概要（英文）：Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) live in a broad range of South-East Asia, and nonhuman primates (NHPs) have emerged as important animal models in infectious diseases and transplantation studies. For those studies, it's necessitating a more extensive characterization of their major histocompatibility complex (MHC) polymorphic regions and MHC homozygous (homo) cynomolgus monkey would have big advantage for immunological research. We have collected a blood samples from many cynomolgus monkey breeding facilities in Japan and South-East Asia, and MHC gene analysis has been initiated. These animals are bred artificially and it is necessary to establish the system to supply. The supply system of these animals was divided into three stages, and it was established. First stage: It cooperates between with each facility and information-material was shared. Second stage: Establishment the indoor artificial breeding system with the materials offered from each facility. Third stage: It supplies in order to use the produced MHC identified monkey for research. In this study, we have demonstrated our model monkey supply system followed by indoor artificial breeding system could show viable MHC identified monkey and it could work even at infectious diseases and transplantation studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000

2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：カニクイザル、人工繁殖、MHC 遺伝子、モデル動物、供給ネットワーク

### 1. 研究開始当初の背景

我々はサルを用いた前臨床的再生医療研究を進めるなかで、サルクローン胚作成を試みているが、体細胞核移植法によるクローン胚作成が予想以上に困難な状況であることを実感している。一方、発生胚の割球を分割し同一の遺伝形質を有する個体をおよそ 4~8 頭作出することが可能な、いわゆる分割クローンの作成も我々は試みている。移植拒絶を生じさせない特定集団の個体群作製は重要な意味を有しているだけでなく、急務であると考えられる。そこで、同じ主要組織適合抗原複合体 (MHC) 遺伝子を持つサルを多数獲得すること、すなわち、MHC 遺伝子の多型解析や MHC 領域のハプロタイプ解析を行い、MHC 抗原を規定する遺伝子領域のゲノム構造を明確化できれば、MHC 抗原が同一な個体を作成することができる。これらの個体間では細胞、組織、さらに臓器の移植における拒絶反応の発生が抑制され、あるいは抑制が容易になり、また投与物質に対する免疫応答も均一となると考えられる。これには我々がすでに確立したサルの発生工学的技術、すなわち人獣共通感染症の危険性を排除した SPF (Specific Pathogen Free : 特定病原菌のない個体) 個体を作成できる体外受精、顕微授精、体外培養、受精胚移植、さらに受精胚の凍結保存と排卵周期の同期化の技術を動員することにより個体群作出についての技術的問題を解決可能としている。すなわち、MHC 遺伝子を明らかにすることによって、MHC ホモの遺伝学的統御個体を作成することが可能である。そこ

で解決しなければならない問題点として個体部群の供給源である。滋賀医科大学 動物生命科学研究センター (以下当センター) においては当時 500 頭のカニクイザルを保有していたが、国内にはその数を遙かに上回る個体数を保有する研究機関が存在しており、これら機関と連携し MHC 抗原の検索母群の個体数を増加させることにより、更に作出の可能性を増大させることが可能となると考えられた。

### 2. 研究の目的

主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 遺伝子の多型解析や MHC 領域のハプロタイプ解析を行い、MHC 抗原を規定する遺伝子領域のゲノム構造を明確化する。すでにその方法や分析を進めており、オスのホモ個体を選抜し、メスのヘテロ個体から採卵し、人工的に受精 (体外受精、あるいは顕微授精) させ、レシーピエント個体に胚移植することにより、オス、メスそれぞれにホモとヘテロ個体が均等に作出されるはずである。その中からメスのホモ個体とオスのホモ個体の間で同様の受精と胚移植を繰り返すことによって、MHC ホモ個体が作出できる。本研究では、MHC 遺伝子の多型解析や MHC 領域のハプロタイプ解析に約半年~1 を予定し、同時に分析を終えた個体を用いて、繁殖体制を確立すること、すなわち計画的な繁殖を行うための受精胚の凍結保存法の確立と移植するレシーピエント個体の排卵周期の同調化法を確立し、これを用い

て実際に繁殖を随時行い、MHC ホモ個体が具体的に作出が出来ることを証明しようとするものである。また、それと同時にカニクイザルを保有する研究機関と連携し、血液サンプルの提供を受けMHC 遺伝子の解析を順次実施し、情報の共有化を推進する。後半2年では個体群作出技術の安定化と効率化を図り生殖細胞の譲渡から共同研究開始までの経過を実際的なものとする。

### 3. 研究の方法

#### Stage1. 個体情報の共有化 (カニクイザル MHC 遺伝子データベースの構築)

1. データベースの作製 当センターならびに協力研究施設に所属するカニクイザルの血液サンプルを採集し、繁殖個体の選抜手法を用いて塩基配列の解析を行う。

#### 2. 繁殖個体の選抜

MHC クラス II 抗原を規定する *Mafa-DPBI*, *Mafa-DQB1* 遺伝子、MHC クラス I 抗原を規定する *Mafa-A*, *Mafa-B* 遺伝子の近傍に存在する4種類のマイクロサテライトマーカーの超多型領域の多型解析ならびに集団遺伝学的解析を行い、それにより得られたタイピング結果から繁殖母群 (MHC がホモあるいはヘテロで一致するドナー) の選抜を行う。

#### Stage2. 生殖細胞の凍結保存バンクおよび個体作出

##### 3. 生殖細胞の譲渡システム

Stage1. において構築されるデータベースにより選抜された個体は各研究施設において飼養されている。この個体を当センターに移送することは困難であり、各施設本来の研究に供されることとなる。そこで本システムでは生殖細胞のみを個体から採取し、譲渡を受け当センターに移送し凍結保存、受精卵作出後凍結保存あるいは個体作出に供する。

### 4. 生殖細胞の採取、培養および凍結保存

#### 4-1. 精子の採取および凍結保存

成熟オスカニクイザルから、精子を無麻酔下で電気刺激法により採取し、スィムアップ法にて運動能力の高い精子を選別する。選別した高活性の精子を TTE-G 精液保存液を用いて凍結し、LN2 中にて使用当日まで管理保存する。定期的に採取および凍結保存を実施することで有用性の高い精子の保存バンク化をはかる。

#### 4-2. 卵子の採取

成熟カニクイザルに月経が見られた日に麻酔下において腹腔鏡により卵巣の状態を観察し、卵胞および黄体形成の無いことを確認後 GnRH(0.88mg/kg)を皮下投与する。14日後からFSH(25IU/kg)を9日間筋肉内投与し、麻酔下において腹腔鏡を用いて卵巣および卵胞の発育状態を観察する。卵胞の発育を確認した後、hCG(400IU/kg)を筋肉内投与し40時間後に、麻酔を施した後、下腹腔鏡観察下において卵巣から直接成熟卵子の採取を行う。

#### 4-3. 受精卵 (胚) の作出

採取した卵子と精子 (凍結・融解精子) を用いて顕微授精・体外受精を行い受精卵を作出する。体外培養を2~7日行うことにより4細胞期胚~胚盤胞期胚を得る。このとき顕微授精・体外受精、およびその後の胚培養に使用する培養溶液、培養条件を更に検討し、胚発生の至適培養条件を見出す。

#### Stage3. 個体の供給ならびに共同研究の推進

既に実用化している技術ならびに研究過程において確立する基盤技術を利用し実際に医学研究に即応可能なMHC ホモ個体を順次計画的に作出する。作出した個体群を順次協力研究施設へ供給するシステムを整備する。

### 4. 研究成果

**Stage1. 個体情報の共有化 (カニクイザル MHC 遺伝子データベースの構築) :** 日本国内においては次に挙げる、カニクイザルを飼養し研究

等に用いている公的研究機関および民間企業と連携を図り血液サンプルの譲受および情報の提供を実施した。

・独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター、・株式会社イナリサーチ、・株式会社新日本科学、株式会社ケアリー、・有限会社日本野生動物研究所、以上の機関からインドネシア産、ベトナム産、フィリピン産カニクイザル由来材料を約 1,000 サンプルの提供を受け、解析情報は各機関へ提供した。また、次の海外の使用施設 3カ所から約 1,000 頭分の血液サンプルの譲受および情報の提供を実施した。フィリピン共和国 DEL MUND TRADING, INA Research Philippines Inc., SICONBREC Inc. これら約 2,000 頭の個体から MHC 遺伝子をホモで保有する個体、29 頭を選抜した。これらの個体は MHC 遺伝子ハプロタイプ (HT) がそれぞれ異なっており、HT1-14 までにグループ分けすることが可能であった。グループの詳細は次の通りであった。HT1 (オス 2、メス 1)、HT2 (オス 1、メス 1)、HT3(オス 1)、HT4(オス 3、メス 1)、HT5 (オス 1)、HT6 (オス 1、メス 2)、HT7 (メス 1)、HT8 (オス 2)、HT9 (オス 2)、HT10 (オス 3)、HT11 (メス 1)、HT12 (メス 1)、HT13 (オス 1)、HT14 (メス 1)

**Stage2. 生殖細胞の凍結保存バンクおよび個体作出：**本研究実施期間中に検出された MHC ホモ個体はすべてフィリピン共和国内で飼養される野生由来であったため、コチあの輸入は不可能であった。そこで当該施設において生殖細胞の採取・保存操作を実施した。対象 5 個体にペニス法では 18 回の刺激を実施し、4 個体から 6 回精液を採取した。また、直腸電気刺激法では 4 個体に 11 回の刺激を実施し、2 個体から 6 回精液を採取した。凍結細胞作成数はペニス法で 29 本、直腸法で 32 本であった。日本国内に輸入した凍結精液

は直腸法にて採取した 2 個体分のバイアルそれぞれ 1 本を融解し、精子数、生存率、活性を観察したところ、No.1 :  $1.2 \times 10^8$ , 30, ++, No.2 :  $9.0 \times 10^8$ , 80, +++ ,であった。MHC ホモのカニクイザルの生産には、個体の輸入が不可能であればその生殖細胞を用いることが可能である。MHC ホモ個体由来生殖細胞を用いた室内人工繁殖では HT1 ホモ個体を 3 頭、ヘテロ個体を 1 頭の作出に成功した。また HT は未解析であるが HT1 ホモオス精子と HT1 ヘテロメス卵子を用いて 2 個体を作成している。

### Stage3. 個体の供給ならびに共同研究の推進

Stage1.において検出された、HT1 ホモ個体由来するカニクイザル iPS 細胞株が当センターにおいて樹立され依頼に応じて研究機関へ提供可能な体制が確立された。HT1 ヘテロ個体 3 頭 (メス) は移植研究に使用するため京都大学 iPS 細胞研究所へ提供した。この他にも滋賀医科大学との共同研究契約により研究内容に応じた各種 MHC HT を有するカニクイザルの供給体制を確立した。

### 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 4 件)

①Moricchika J, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Sankai T, Torii R Triplet pregnancy in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) after double embryo transfer. *Comparative Medicine*, 62(2), 69-72, 2012. 査読有

②Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Okahara J, Sankai T, Torii R Vitrification and transfer of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 76, 33-38, 2011. 査読有

③Kita YF, Hosomichi K, Kohara S, Itoh Y, Ogasawara K, Tsuchiya H, Torii R, Inoko H, Blancher A, Kulski JK, Shiina T. MHC class I A loci polymorphism and diversity in three Southeast Asian populations of cynomolgus macaque. Immunogenetics. 61(9), 635-648, 2009. 査読有

④Itoh Y, Ozaki H, Tsuchiya H, Okamoto K, Torii R, Sakoda Y, Kawaoka Y, Ogasawara K, Kida H. A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus stain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus monkey, Vaccine, 26, 562-572, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

①土屋英明、中川孝博、河本育士、岩谷千鶴、中村紳一郎、山中久、椎名隆、小笠原一誠 (2013) ヒト医療研究用モデルザル供給ネットワークの構築、日本実験動物技術者協会 第 47 回総会、岡山

②岩谷 千鶴、山崎 樹里、土屋英明、岡原 純子、鳥居 隆三(2010)成熟卵子採取のためのインフュージョンポンプによるカニクイザル卵巣刺激法、日本生殖再生医学会 第 5 回学術集会、東京

③山崎樹里、山縣一夫、岩谷千鶴、土屋英明、岡原純子、若山照彦、鳥居隆三(2010)カニクイザル顕微授精胚へのライブセルイメージング法の適用、日本生殖再生医学会 第 5 回学術集会、東京

④岩谷 千鶴、山崎 樹里、土屋英明、岡原 純子、鳥居 隆三 (2010)カニクイザルにおける適切な性腺刺激ホルモン微量連続投与法の検討、第 57 回 日本実験動物学会総会、京都

⑤山崎樹里、山縣一夫、岩谷千鶴、土屋英明、岡原純子、若山照彦、鳥居隆三(2010)カニクイザル顕微授精胚のライブセルイメージングによる染色体分裂像の観察、第 5 7 回日本実験動物学会総会、京都

⑥小山周三、藤波菜穂子、土屋英明、福田浩司、松下聡紀、渡邊翔、小原栄、宇野康宏、鳥居隆三、細井美彦(2010)カニクイザル受精卵における着床前遺伝子診断用サンプル採取の検討、第 5 7 回日本実験動物学会総会、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：カニクイザル MHC 全遺伝子ホモ接合体を作製するためのキット及び方法

発明者：小笠原一誠、鳥居隆三、椎名隆

権利者：滋賀医科大学、東海大学

種類：特許

番号：特願2010-105956

出願年月日：平成 22 年 4 月 30 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqanimal/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土屋 英明 (TSUCHIYA HIDEAKI)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・技術専門職員

研究者番号：10378440

### (2) 研究分担者

伊藤 靖 (ITO YASUSHI)

滋賀医科大学 医学部 准教授

研究者番号：90324566

椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)

東海大学 医学部 准教授

研究者番号：00317744

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：