

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780289

研究課題名(和文) 発生工学技術から展開するネコ胚性幹(ES)細胞株の樹立

研究課題名(英文) Establishment of feline embryonic stem cell derived from developmental engineering

研究代表者

鳩谷 晋吾 (HATOYA SHINGO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40453138

研究成果の概要(和文)：

本研究の目的は、ネコ ES 細胞を樹立し、再生獣医療へ役立てることである。ネコにおける体外受精および ES 細胞株の樹立について検討し、以下のことを明らかにした。

- ①BCB によってネコ卵巣由来卵子を選別した結果、BCB (+) の卵子は、優位に体外成熟し、桑実胚/胚盤胞期胚へも優位に発育することがわかった。
- ②ネコ精子では、パーコール法により質の良い卵子を選別できることがわかった。
- ③ネコ LIF の遺伝子配列を明らかにし、これはヒトやマウス LIF と高い相同性を示した。
- ④ネコの体外培養(IVC)では、Only-one 培地に FBS を加えた培地によって胚盤胞期胚への発育が増加した。
- ⑤体外受精卵から得られた胚盤胞期胚からネコ ES 様細胞のコロニーが得られた。

研究成果の概要(英文)：

The objective of this study was to establish ES cell lines from the cat for regenerative veterinary medicine. I examined feline IVM/IVF/IVC and establishment of feline embryonic stem cells, and the following results were obtained.

- ①The BCB(+) oocytes reached more MII and morula/blastocysts than BCB(-) oocytes.
- ②The isolation of feline sperm by percoll density gradient is effective in selecting the useful sperm.
- ③Sequence alignment and comparison of feline LIF cDNA with human and mouse LIF cDNA revealed a high degree of nucleotide similarity.
- ④The IVC of Only-one medium+FBS developed the feline embryo up to blastocyst stage.
- ⑤Primary feline ES-like cell colonies were formed from IVF derived blastocysts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：再生医療、ネコ、ES細胞、体外受精、卵子

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本ではコンパニオンアニマルであるイヌ・ネコの数が増加し、子供の数をも上回っていると言われている。さらに、ネコは、人々の生活になくてはならない存在となり、獣医療も人の医療と同様に最先端の治療が求められるようになってきた。また、獣医療の進歩によりネコが長寿になり、それと共に慢性腎不全、II型糖尿病、肥大型心筋症、白血病などヒトと同様の疾患が多くみられるようになってきた。これらの疾患に対する新しい治療法として再生医療が注目されており、特にES細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)と並んで、その多分化能力から再生医療の主角と考えられている。

現在までにマウスやヒトでES細胞が樹立され、さまざまな再生医療研究が行われており、研究申請者は、獣医学領域における再生医療の促進を目的として、イヌにおける体外受精の確立 ([Hatoya et al. Theriogenology. 2006 ;66\(5\):1083-90](#)) およびイヌES細胞株の樹立を目指し、イヌES様細胞を分離・培養することに世界で初めて成功している ([Hatoya et al. Mol Reprod Dev. 2006;73\(3\):298-305.](#))。一方、ネコ科動物における再生医療研究は、ほとんど進んでいない。この理由として、ネコES細胞が樹立されていないために、獣医学領域におけるネコ再生医療の基礎研究が進んでいないことがあげられる。

ES細胞株を樹立するためには、受精卵である胚盤胞期胚の内部細胞塊が必要となる。飼育ネコでは、避妊、去勢手術をする割合が近年非常に高まり、その時に摘出・廃棄される卵巣および精巣より得られる、卵子や精子を重要な遺伝子資源として利用できるという利点がある。そこで本研究は、これらをうまく応用することによってES細胞株の樹立を目指すものである。

### 2. 研究の目的

胚性幹細胞(ES細胞)は、受精卵である胚盤胞期胚の内部細胞塊から得られる細胞であり、体を構成するすべての細胞になる多能性、および自己複製能力に優れているために、目的の細胞へ分化誘導させ、移植治療に用いる再生医療に応用できるものと期待されている。本研究では、申請者が今まで蓄積してきた発生工学および再生医療研究の知識・技術を生かして、ネコの去勢・避妊手術から得られた精子・卵子を利用してネコES細胞株を樹立することで、ネコにおける再生獣医療

へと展開するための基盤を確立することが目的である。

計画していた具体的な研究項目は次のものである。

- (1) Brilliant cresyl blue (BCB)によるネコ卵巣由来卵子の選別
- (2) ネコ精子の凍結保存とパーコール法による選別
- (3) ネコ leukemia inhibitory factor (LIF)の作製
- (4) 体外受精・体外培養条件の確立
- (5) ネコES細胞株の樹立

### 3. 研究の方法

#### (1) BCBによるネコ卵巣由来卵子の選別

①避妊手術で得たネコ卵巣から未成熟卵子を回収し、卵丘細胞が付着しているGrade1,2群、卵丘細胞があまり付着していないGrade3,4群の2群に分けた。さらにBCB染色による卵子の染色の有無(+/-)によりGrade1,2+群、Grade1,2-群、Grade3,4+群、Grade3,4-群の4群に分けた。M-199培地で各群を24時間培養し、IVM卵子の核成熟度をHoechst染色により比較した。

②さらに、4群の卵子を各群IVM後、(2)で検討したパーコール洗浄済み凍結融解精液と共培養した後、6日間培養し、卵割率、桑実胚/胚盤胞率を比較した。

#### (2) ネコ精子の凍結保存とパーコール法による選別

去勢手術で得たネコ精巣上体から精子を回収し、凍結保存した。凍結精液を融解後パーコール洗浄したパーコール群と無洗浄のコントロール群に分け、先体を持つ精子の割合、精子生存指数をそれぞれ比較した。

#### (3) ネコLIFの作製

LIFを多く発現していると考えられるネコ胎子線維芽細胞からcDNAを作成し、ヒト、マウスなどで相同性が高い部分で作成したプライマーを用いてPCRによりネコLIF DNAを増幅する。増幅したDNAをシーケンスしネコLIFのアミノ酸配列を確認し他の哺乳類LIFとの比較検討を行った。

#### (4) 体外受精・体外培養条件の確立

それぞれの卵子をM199培地で30時間体外成熟し、HTF培地に移して18時間体外受精

を行った。その後の体外培養では、①0.3% BSA 含有 Only-one 培地で 6 日間 (one-step 群) ②0.3%BSA 含有 Only-one 培地で 2 日間、5%FBS 含有 Only-one 培地で 4 日間 (one-step + FBS 群) ③0.3%BSA 含有 Early-Culture 培地で 2 日間、0.3%BSA 含有 Blastocyst 培地で 4 日間 (two-step 群) ④0.3%BSA 含有 Early-Culture 培地で 2 日間、5%FBS 含有 Blastocyst 培地で 4 日間 (two-step + FBS 群) の 4 群に分けて培養した。

### (5) ネコ ES 細胞株の樹立

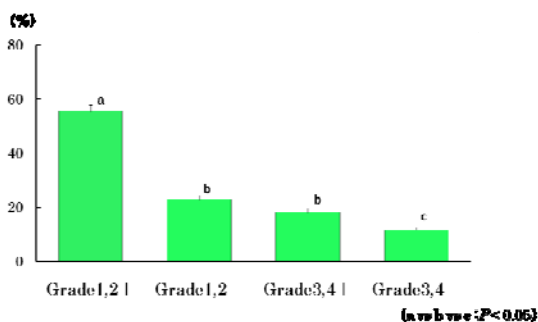
(4) で準備した胚盤胞期胚より内部細胞塊を取り出し、マウス胎子線維芽細胞と共培養することによって、ネコ ES 細胞の分離・培養を行った。

## 4. 研究成果

### (1) BCB によるネコ卵巣由来卵子の選別

①成熟 (MII) 卵子の割合は、他群と比較し、Grade1,2+群で有意に高値を示した。

②卵割率、桑実胚/胚盤胞率は、他群と比較し、Grade1,2+群で有意に高値を示した。

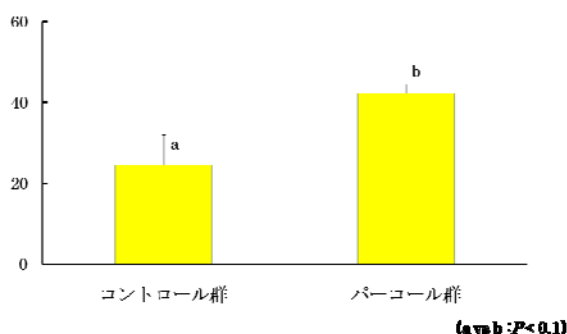


図：桑実胚/胚盤胞率

### (2) ネコ精子の凍結保存とパーコール法による選別

先体を持つ精子の割合は、コントロール群と比較し、パーコール群で有意に高値を示した。精子生存指数は、コントロール群と比較し、パーコール群で増加する傾向を示した。

図：精子生存指数

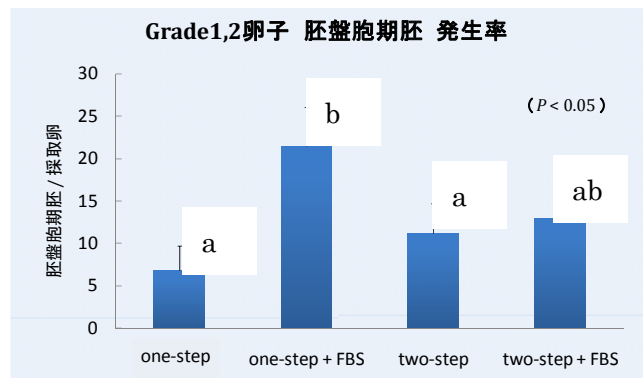


### (3) ネコ LIF の作製

増幅した DNA をシーケンスしネコ LIF の配列を確認したところ、ヒトやマウス LIF と相同性の高い遺伝子配列が確認された。

### (4) 体外受精・体外培養条件の確立

すべての群で胚盤胞期胚への発生が認められ、特に one-step + FBS 群において、胚盤胞期胚の発生率が有意に増加した。



### (5) ネコ ES 細胞株の樹立

胚盤胞期胚から内部細胞塊 (ICM) を分離し、ES 細胞様コロニーの作製について検討したところ、細胞間境界が明瞭で、核に対して細胞質が少なく核小体が明瞭な、ヒト ES 細胞に類似した形態を示すコロニーが観察されたことから、ネコ ES 様細胞が得られたことが示唆された。

## 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 10 件)

1. Hatoya S, Kumagai D, Takeda S, Yamamoto E, Nakanishi M, Kuwamura M, Sugiura K, Sasai H, Yamate J, Inaba T.: Successful Management with CHOP for Pulmonary Lymphomatoid Granulomatosis in a Dog. J Vet Med Sci. 73(4):527-30, 2011 査読有
2. Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, Inaba T.: Locomotor improvement after autologous bone marrow stromal cell intrathecal delivery in dogs with chronic spinal cord injury. Am J Vet Res, in press 査読有
3. Ohmura M, Torii R, Hatoya S, Sugiura K, Tamada H, Kawate N, Takahashi M,

- Sawada T, Inaba T.: Induction of fertile oestrus in dioestrous bitches by prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  and a GnRH-agonist. Vet Rec, in press 査読有
4. Pathirana IN, Ashida Y, Kawate N, Tanaka K, Tsuji M, Takahashi M, **Hatoya S**, Inaba T, Tamada H.: Comparison of testosterone and insulin-like peptide 3 secretions in response to human chorionic gonadotropin in cultured interstitial cells from scrotal and retained testes in dogs. Anim Reprod Sci. 124(1-2):138-44, 2011 査読有
  5. Mito K, Sugiura K, Ueda K, Hori T, Akazawa T, Yamate J, Nakagawa H, **Hatoya S**, Inaba M, Inoue N, Ikehara S, Inaba T.: IFN-gamma markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. Cancer Res. 70(18):7093-101, 2010 査読有
  6. Sugiura K., Wijewardana V., Fujimoto M., Akazawa T., Yahata M., Mito K., **Hatoya S.**, Inoue N., Inaba T.: Effect of IL-12 on the canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. Vet. Immunol. Immunopathol. 137(3-4):322-6, 2010 査読有
  7. Tamada H, Kawate N, Kawata N, Inaba T, Kida K, **Hatoya S**, Akune A, Nakama K, Kohsaka T, Sawada T.: Detection of relaxin mRNA in the corpus luteum, uterus, and uterine cervix in the bitch. J Vet Med Sci. 72(10):1383-6, 2010 査読有
  8. Pathirana IN, Tanaka K, Kawate N, Tsuji M, Kida K, **Hatoya S**, Inaba T, Tamada H.: Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the estrogen receptor 1 gene in normal and cryptorchid Miniature Dachshunds and Chihuahuas. J Reprod Dev. 56(4):405-10, 2010 査読有
  9. Kida K, Maezono Y, Kawate N, Inaba T, **Hatoya S**, Tamada H.: Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra. Theriogenology. 73(1):36-47, 2010 査読有

10. **Hatoya S.**, Sugiura Y., Nishida H., Okuno T., Torii R., Sugiura K., Kida K., Kawate N., Tamada H., Inaba T.: Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. Theriogenology 71(4):560-567, 2009. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①瀧野麻衣亜、奥野 剛、**鳩谷晋吾**、大村 雅、鳥居隆三、杉浦喜久弥、玉田尋通、川手憲俊、高橋正弘、稲葉俊夫

サル ES 細胞からのオリゴデンドロサイトへの簡便な分化誘導法

日本獣医学会第 150 回大会

2010 年 9 月 17 日 帯広

②永見俊典、**鳩谷晋吾**、鳥居隆三、杉浦喜久弥、大村 雅、川手憲俊、玉田尋通、高橋正弘、稲葉俊夫

FSH および LH によるイヌ卵子の体外成熟率の改善

日本獣医学会第 150 回大会

2010 年 9 月 16 日 帯広

③**鳩谷晋吾**

再生医療とは？基礎から動物の ES・iPS 細胞研究まで

日本小動物獣医師会 2010 年次学会

2010 年 8 月 28 日 東京

④**鳩谷晋吾**

再生医療の最前線～獣医臨床応用に向けた課題～

「幹細胞：犬 ES 細胞（胚性幹細胞）の開発」第 149 回 日本獣医学会学術集会

2010 年 3 月 27 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳩谷 晋吾 (HATOYA SHINGO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40453138

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：