
サルEG細胞の樹立と生殖細胞への分化に関する研究

(課題番号：14380382)

平成14年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B)) 研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 鳥居隆三
(滋賀医科大学動物生命科学研究センター教授)



2005015012

はしがき

ヒト医学研究には、動物実験は欠くことが出来ない手段であるが、一般的に使用されるマウスはヒトと比較して形態学的、生理学的、薬理学的に相違点も多く、特に高次脳機能、寿命、行動、生殖、胚発生に関しては異なる点も多い。そこで、これらに関してヒトに最も近いサル類が実験動物として活用できれば研究は飛躍的に発展すると考えられる。我々は既にサル ES 細胞を樹立しているが *in vitro* での生殖細胞への分化は容易ではない。またサルは妊娠期間が約 6 ヶ月、性成熟に約 4 年を要するためマウスで行われるような ES 細胞キメラを介した遺伝子改変動物作製は時間がかかり過ぎ現実的ではない。そこで生殖系列細胞株 EG (Embryonic germ) 細胞を樹立できればキメラを介さず比較的容易に生殖細胞に分化させられると考えた。さらに生殖系列の細胞株は遺伝子改変ザルの作製のみならず、ヒトの生殖細胞の分化を研究する良いモデルともなりうる。

近年、少子化の一方で不妊が大きな問題となっており、不妊治療、体外受精、顕微授精などの補助生殖医療が一般化し、増加の一途を辿っている。しかしながら体外受精、顕微授精等に代表される不妊治療、生殖医療はその安全性の確認が十分なされておらず、またその実施に関しても明確な基準が設定されていないため問題も報告されている。そこで、生殖や胚発生などに関してもヒトに最も近いサル類でモデルシステムが構築できれば不妊治療、生殖医療はより安全なものとなるであろう。

本研究は、高次脳機能、生殖医療研究、およびヒト病態モデル作製のため、特に ES 細胞で行われてきた遺伝子改変技術を霊長類の生殖系列の細胞に応用することを最終目標に EG (Embryonic germ) 細胞の樹立に取り組んだ。動物愛護の観点から、最小限の使用胎子数で出来る限り多くの情報を得られるように実験を行ったが、妊娠に約 6 ヶ月を要するサルでは予想以上に短い研究期間であった。しかしながら、胚移植を行うための腹腔鏡を用いた移植適期のレシピエント個体の選別技術を確立すると同時に、サル胎子と生殖腺の成長と発生、またサルにおける始原生殖細胞の動態の貴重なデータを得ることが出来た。アルカリフォスファターゼ陽性の生殖細胞を数ヶ月維持することにも成功した。本研究からサルにおける生殖細胞株の樹立に関してはマウスやヒトの場合と異なる条件が必要である可能性が強く示唆されたため、今後は EG 細胞のみならず生殖幹 GS (Germline stem) 細胞などより広い視野から生殖細胞株の樹立を検討する必要があると考えられる。なお、本研究は滋賀医科大学・動物実験委員会、および動物生命科学研究所倫理委員会の承認を得て行われたものである。

平成 18 年 3 月 鳥居隆三

研究組織

平成14年度

研究代表者：鳥居隆三（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・教授）
研究分担者：高田達之（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・助教授）
研究分担者：木村博（滋賀医科大学医学部・教授）
研究分担者：近藤靖（田辺製薬（株）・創薬研究所 主任研究員）

平成15年度

研究代表者：鳥居隆三（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・教授）
研究分担者：高田達之（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・助教授）
研究分担者：木村博（滋賀医科大学医学部・教授）
研究分担者：近藤靖（田辺製薬（株）・創薬研究所 主任研究員）

平成16年度

研究代表者：鳥居隆三（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・教授）
研究分担者：高田達之（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・助教授）
研究分担者：土屋英明（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・助手）
研究分担者：木村博（滋賀医科大学医学部・教授）
研究分担者：桑名貴（国立環境研究所・環境研究基盤技術ラボラトリー・室長）
研究分担者：山海直（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・主任研究員）

平成17年度

研究代表者：鳥居隆三（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・教授）
研究分担者：高田達之（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・助教授）
研究分担者：土屋英明（滋賀医科大学動物生命科学研究センター・助手）
研究分担者：木村博（滋賀医科大学医学部・教授）
研究分担者：桑名貴（国立環境研究所・環境研究基盤技術ラボラトリー・室長）
研究分担者：山海直（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・主任研究員）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	4,400	0	4,400
平成15年度	3,000	0	3,000
平成16年度	2,500	0	2,500
平成17年度	2,700	0	2,700
総計	12,600	0	12,600

研究発表

研究発表

(1) 学会誌等

鳥居隆三、末盛博文、サルES細胞研究の最前線、分子細胞治療、1 (1)、15-22, 2002.

Torii R, Takada T, Suzuki Y, Kadota N, Kobayashi K, Kondo Y, Nito S, Kimura H, Hosoi Y, Iritani A, Establishment of pluripotent cynomolgus monkey ES Cell line expressing GFP, Exp. Anim., 51(3), 292, 2002.

細井美彦、入谷明、鳥居隆三、末盛博文、霊長類における顕微授精ならびに関連技術の特性、産婦人科の世界 54 (6:27-36), 575-584, 2002.

Takada T, Suzuki Y, Kondo Y, Kadota N, Kobayashi K, Nito S, Kimura H, Torii R, Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein, Cell Transplantation, 11(7), 631-635, 2002.

Takagi Y., Yamaguchi A., Kawakubo M., Nakayama J., Sugano S., Takada T., Kimura H. Enrichment of spermatogonia of the EGFP-transgenic mouse using fluorescence-activated cell sorting analysis Biol. Reprod., 66, Supple 481, (2002)

鳥居隆三、サル胚性幹細胞でできること、大津医学生会誌、27、22-25, 2002.

Narita J, Takada T, Kimura H, Sakuragawa N, Torii R, Cynomolgus monkey blastocysts produced by nuclear transfer using amniotic epithelial cells, Theriogenology, 59, 276, 2003.

Torii R, Shiomi M, Ito T, Yamada S, Eguchi Y, Ikeda N, Cholesterol-fed ovariectomized monkeys are good animal model for human atherosclerosis of postmenopausal women, Primates, 44(3), 247-252, 2003.

Hosoi Y, Torii R, Fujinami N, Matsumoto K, Saeki K, Iritani A, Fertilization by intracytoplasmic sperm injection and subsequent embryo development in vitro to blastocysts in Japanese monkey (*Macaca fuscata*), J. Mamalian Ova Research, 20, 34-40, 2003.

Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y, Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells, Transplantation, 76, 1061-1067, 2003.

高田達之、成田純子、鳥居隆三、カニクイザル体細胞を用いたクローン胚作製、遺伝子医学、112-115, Vol. 3, No.2, 2003.

鳥居隆三、滋賀医科大学・動物生命科学研究センターの紹介、岡山実験動物研究会報、第20号、59-62、2003.

Torii R, Okahara N, Narita J, Nakagawa T, Takada T, Ovulation Synchronization in Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*) Exp. Anim., 53 (3) S62, 2004.

Narita J, Takada T, Torii R, Parthenogenesis in Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Exp. Anim., 53 (3) S80, 2004.

Hayasaka I, Yoshimoto N, Mori Y, Suzuki K, Honda R, Okamura H, Ide Y, Sakamoto W, Nakashima T, Nakagata N, Torii R, Yoshikawa Y, Ovum recovery and blastocyst development following intracytoplasmic sperm injection in chimpanzees, *Reproduction, Fertility and Development*, 16(1,2), 256, 2004.

Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, Shiota M, Suemori H, Luo HY, Chui DHK, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T, Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro, *Development and disease*, 131, 1869-1879, 2004.

Ueyama H, Torii R, Tanabe S, Oda S, Yamada S, An insertion/deletion TEX28 polymorphism and its application to analysis of red/green visual pigment gene arrays, *J. Hum. Genet.*, 49, 548-557, 2004.

高田達之、鳥居隆三、カニクイザル ES 細胞とその遺伝子改変ザル作製への利用、*バイオインダストリー*、2, 17-23、2005.

Takada T, Nemoto K, Yamashita A, Katoh M, Kondo Y, Torii R, Efficient gene silencing using siRNA in mouse and monkey ES cells and differentiation, *Reproduction, Fertility and Development*, 17(1,2), 240-241, 2005.

Narita J, Tsuchiya H, Takada T, Torii R, Investigation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Fetus Fibroblast Cell Nuclear Transfer, *Reproduction, Fertility and Development*, 17(1,2), 178, 2005.

Yoshimoto N, Shimoda K, Honda R, Okamura H, Ide Y, Nakashima T, Nakagata N, Torii R, Yoshikawa Y, Hayasaka I, Ovarian follicular development stimulated by leuprorelin acetate plus human menopausal gonadotropin in chimpanzees, *J. Med. Primatol*, 34, 73-85, 2005.

Takada T, Nemoto K, Yamashita A, Kato M, Kondo Y, Torii R, Efficient gene silencing and cell differentiation using siRNA in mouse and monkey ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 1039-1044, 2005

鳥居隆三、霊長類への発生工学的手法の導入ーそこから生まれた ES 細胞とその活用ー、*日本生殖医療エンジニアリング研究会*、1 (1)、58-71、2005.

鳥居隆三、カニクイザル ES 細胞の樹立とその有用性、*アニテクス*、17, 6, 212-217, 2005.

Yamashita A, Takada T, Narita J, Yamamoto G, Torii R, Osteoblastic differentiation of monkey embryonic stem cells in vitro, *Cloning Stem cells* 7, 232-237, 2005.

Abdelalim, E., Takada, T., Toyoda, F., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Tooyama, I., and Torii, R. In vitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 689-695, 2006

Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T, Isolation and Characterization of Embryonic Stem-like Cells From Canine Blastocysts, *Molecular Reproduction and Development* 73, 298-305, 2006.

Takada T, Kondo Y, Torii R,
Generation of GFP-expressing monkey ES cells, *Methods in Molecular Biology*
329, 305-312, 2006

Yamashita A, Takada T, Omatsu-Kanbe M, Nemoto K, Matsuura H, Yamamoto G, Torii R.
Monkey embryonic stem cells differentiate into adipocytes in vitro, *Cloning Stem Cells*, 8, 3-9, 2006

Sano K, Shiina T, Kohara S, Yanagiya K, Hosomichi K, Shimizu S, Anzai T, Watanabe A, Ogasawara K, Torii R, Jerzy K. Kulski, Inoko H. Novel cynomolgus macaque Mhc-DPB1 polymorphisms in three South-East Asian populations, *Tissue Antigens*, 67, 297-306, 2006.

Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, Shimoda G, Fujino T, Baba S, Shiota M, Ma F, Suemori H, Luo HY, Chui DHK, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T, Identification and characterization of hemangiogenic progenitors during cynomolgus monkey ES cell differentiation, *Stem Cells*, (in press)

Tsukada H, Takada T, Shiomi N, Tani T, Torii R, Acidic fibroblast growth factor promotes hepatic differentiation of monkey embryonic stem cells. *In vitro Cell. Dev-An.* (in press)

Yamashita A, Takada T, Yamamoto G, and Torii R, Stable maintenance of monkey embryonic stem cells in the absence of bFGF, *Transplantation proceedings* (in press)

Abdelalim, E, Takada T, Torii R, and Tooyama, I, Molecular cloning of BNP from heart and its immunohistochemical localization in the hypothalamus of monkey, *Peptides* (in press)

Hatoya S, Sugiyama Y, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Inaba T, Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVF, IVF and IVC of canine oocytes, *Theriogenology* (in press)

(2) 口頭発表

鳥居隆三、サルES細胞の樹立と再生医学研究-発生工学的手法の活用-、第54回国際CARDシンポジウム、熊本(1/11/2002)。

Suemori H, Yasuchika K, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kondo Y, Imahie H, Kobayashi K, Suzuki Y, Iritani A, Nakatsuji N, Establishment of embryonic stem cell lines from blastocysts of the Cynomolgus monkey, *Keystone Symposium, USA, Colorado* (3/17-23/2002)。

Suzuki Y, Kondo Y, Kadota N, Kobayashi K, Nito S, Kimura H, Takada T, Torii R, Establishment of Cynomolgus monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein, *Keystone Symposium, USA, Colorado* (3/17-23/2002)。

成田純子、鳥居隆三、櫻川宣男、サル羊膜細胞由来のサルES細胞株樹立への試み、第1回日本再生医療学会、京都(4/18-19/02)。

門田奈依、高田達之、鈴木豊、近藤靖、仁藤新二、木村博、鳥居隆三、GFP発現カニクイサルES細胞株の樹立、第1回日本再生医療学会、京都(4/18-19/02)。

鳥居隆三、サルE S細胞の役割と展望、第127回科学技術セミナー、滋賀(6/13/02)。

鳥居隆三、サルE S細胞と再生医療、安全性評価研究会セミナー、大阪(6/1/02)。

鳥居隆三、高田達之、鈴木豊、門田奈依、小林欣治、近藤靖、仁藤新二、木村博、細井美彦、入谷明、GFP発現サルE S細胞株の樹立とその多能性、第49回日本実験動物学会、名古屋(5/23-25/02)。

Torii R, Ito T, Yamada S, Ikeda N, Shiomi M, Evaluation of atherosclerosis of cholesterol-fed ovariectomised japanese monkeys by angioscopy, 4th International Congress of Pathophysiology, Budapest, Hungary(6/29-7/5/02)。

Torii R, Eguchi U, Ikeda N, Ito T, Yamada S, Shiomi M, Angioscopic observation of the atherosclerosis of cholesterol-fed ovariectomised japanese monkeys, 73rd European Atherosclerosis Society, Zarzberg, Austria(7/7-7/10/02)。

成田純子、鳥居隆三、寺尾恵治、櫻川宣男、サル羊膜細胞の核移植による胚の発生、第18回日本霊長類学会大会、東京(7/19-21/02)。

Takagi, Y., Yamaguchi, A., Kawakubo, M., Nakayama, J., Sugano, S., Takada, T., and Kimura, H., Enrichment of spermatogonia of the EGFP-transgenic mouse using fluorescence-activated cell sorting analysis
35th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, Baltimore, MD, U.S.A., 7/28-31/2002

鳥居隆三、サルE S細胞のこれからの展開、ケーエーシー第7回技術発表会、特別講演、大阪(9/28/02)

鳥居隆三、再生医学研究におけるサルE S細胞の有用性、第5回移植遺伝子工学会、(シンポジウム)、東京(10/17/02)。

Narita J, Takada T, Kimura H, Terao K, Sakuragawa N, Torii, Cynomolgus monkey blastocysts produced by nuclear transfer using amniotic epithelial cells, 29th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Auckland, New Zealand (1/12-15/03)。

成田純子、高田達之、寺尾恵治、櫻川宣男、鳥居隆三、カニクイザル羊膜細胞を用いた核移植による胚盤胞期胚の作製、第2回日本再生医療学会、神戸(3/10-11/03)。

浅野隆之、揚山直英、百枝幹雄、竹内公一、近藤靖、鳥居隆三、佐々木京子、上田泰次、長谷川護、波利井清紀、寺尾恵治、小澤敬也、花園豊、サルE S細胞の胎仔への同種移植、第2回日本再生医療学会、神戸(3/10-11/03)。

梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、末盛博文、鳥居隆三、中辻憲夫、中畑龍俊、カニクイザルE S細胞を用いた一次造血・二次造血の分化誘導、第2回日本再生医療学会、神戸(3/10-11/03)。

Eguchi Y, Kato Y, Torii R, Eguchi N, Urade Y, Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (LPGDS)/PGD in human and atherosclerotic monkey-model in cardiovascular disease. The 76th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society & The 80th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, 福岡(3/24-26/03)。

成田純子、高田達之、寺尾恵治、櫻川宣男、鳥居隆三、サル羊膜細胞の核移植クローン胚の作製、第50回日本実験動物学会総会、大宮(5/28-31/03)。

Hanazono Y, Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano K, Suzuki Y, Torii R, Terao K, Ozawa K. Engraftment and teratoma formation after allogenic in utero translatation of nonhuman, primate embryonic stem cells, 1st International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Washington, USA(6/8-11/03)。

早坂郁夫、吉本信彦、森裕介、鶴殿俊史、江見美子、本田律生、岡村均、井手幸恵、坂本 亘、中島竜之、中舘直己、鳥居隆三、吉川泰弘、ICSIによるチンパンジー胚の作製、第19回日本霊長類学会大会、仙台(6/27-29/03)。

Hanazono Y, Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Ookawara S, Hasegawa M, Terao K, and Ozawa K. Engraftment and teratoma formation after allogenic in utero translatation of gene-modified primate embryonic stem cells, 日本遺伝子治療学会、東京(7/18-21/03)。

Matsumoto T, Eguchi Y, Torii R, Eguchi N, Urade Y, L-PGDS in cardio-vascular system of atherosclerotic monkey-effect of estrogen replacement therapy, 第76回日本生化学会大会、横浜(10/15-18/03)。

犬伏俊郎、遠山育夫、鳥居隆三、鈴木文夫、新田、加藤雅也、近藤靖、門田奈依、鈴木豊、移植神経幹細胞のMR画像による非侵襲的追跡、第26回分子生物学会、神戸(12/10-13/03)。

鳥居隆三、サルES細胞樹立と再生医療研究への活用、岡山実験動物研究会(招待講演)、岡山(11/28/03)。

鳥居隆三、サルES細胞と再生医療研究、感染研究所・学友会シンポジウム(招待講演)、新宿(12/17/03)。

Hayasaka I, Yoshimoto N, Mori Y, Suzuki K, Honda R, Okamura H, Ide Y, Sakamoto W, Nakashima T, Nakagata N, Torii R & Yoshikawa Y, Ovum recovery and blastocyst development following intracytoplasmic sperminjection in chimpanzees, 2004 IETS Annual conference, Oregon (1/10-13/04)。

鳥居隆三、サルES細胞樹立と再生医療研究への活用、第26回滋賀県医学検査学会(特別講演)、長浜(3/7/04)。

東田宏明、高田達之、塩見尚礼、谷徹、鳥居隆三、カニクイザルES細胞の肝細胞への分化におけるaFGFの影響、第3回日本再生医療学会、千葉(3/23-25/04)。

山下晃弘、高田達之、成田純子、山本学、鳥居隆三、カニクイザルES細胞の骨芽細胞への分化誘導の検討、第3回日本再生医療学会、千葉(3/23-25/04)。

高田達之、根本憲一、加藤雅也、山下晃弘、近藤靖、鳥居隆三、マウス及びサルES細胞におけるsiRNAを用いた遺伝子発現抑制と分化、第3回日本再生医療学会、千葉(3/23-25/04)。

遠山育夫、犬伏俊郎、鳥居隆三、高田達之、鈴木文夫、新田直樹、加藤雅也、門田奈依、道端英雄、近藤 靖、ラット線条体に移植した神経幹細胞、PC12細胞、アストロサイトのMRI追跡、第3回日本再生医療学会、千葉(3/23-25/04)。

犬伏俊郎、遠山育夫、鳥居隆三、高田達之、鈴木文夫、新田直樹、加藤雅也、門田奈依、

道端英雄、近藤 靖、MR 画像を用いる移植幹細胞の無侵襲追跡、第 3 回日本再生医療学会、千葉(3/23-25/04)。

梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、末盛博文、鳥居隆三、渋谷正史、中辻憲夫、中畑龍俊、長類 E S 細胞を用いた一次造血・二次造血の分化誘導、第 3 回日本再生医療学会、千葉(3/23-25/04)。

鳥居隆三、サル類の繁殖における発生工学的研究の現状と将来、シンポジウム、サル類の飼育・繁殖現場から生まれる最新医療研究、第 51 回日本実験動物学会、長崎(5/20/04)。

鳥居隆三、岡原則夫、成田純子、中川孝博、高田達之、カニクイザル、ニホンザルの卵巣周期の同期化、第 51 回日本実験動物学会、長崎(5/20-22/04)。

成田 純子、高田 達之、鳥居 隆三、カニクイザル未受精卵における単為発生条件の検討、第 51 回日本実験動物学会、長崎(5/20-22/04)。

杉山雄輝、鳩谷晋吾、鳥居隆三、Viskam Wijewardana、熊谷大二郎、杉浦喜久弥、玉田尋通、澤田勉、稲葉俊夫

イヌ未成熟卵子の体外成熟に関する研究、第 138 回日本獣医学会学術集会 札幌(9/10-12/04)。

犬伏俊郎、森川茂廣、遠山育夫、鳥居隆三、鈴木文夫、加藤雅也、近藤靖、磁気的標識を用いた生体内移植神経幹細胞の MR 画像による追跡、第 32 回日本核磁気共鳴医学会大会、大津(9/16-18/04)。

森川茂廣、犬伏俊郎、遠山育夫、鳥居隆三、佐藤浩一郎、出村公一、徳田淳一、Haque HA 高解像 MR 画像 3D ボリュームレンダリングによる脳組織観察と切片作成 計画、第 32 回日本核磁気共鳴医学会大会、大津(9/16-18/04)。

渡邊淳史、椎名隆、鳥居隆三、小笠原一誠、猪子英俊、カニクイザル MHC 領域の BAC コンテイングの作製によるゲノム解析、日本組織適合性学会(9/21-23/04)。

柳谷和代、清水佐良子、椎名隆、小原栄、鳥居隆三、小笠原一誠、猪子英俊、カニクイザルの MHC クラス II 遺伝子の多型解析、日本組織適合性学会(9/21-23/04)。

Takada, T., Iida, K., Sasaki, H., Taira, M., and Kimura, H., Expression of ARL6 during mouse embryonic development, The 53rd Fujihara International Seminar, New Challenges in Research on ADP-ribose Metabolism, Tomakomai, Japan(7/26-29/04)。

高田達之、根本憲一、山下晃弘、加藤雅也、近藤靖、鳥居隆三、サルおよびマウス ES 細胞における siRNA を用いた遺伝子発現抑制、分子生物学会、神戸(12/8-11/04)。

土屋英明、中川佳子、岡田浩典、下澤律浩、高田達之、鳥居隆三、桑名貴、山海直、カニクイザル始原生殖細胞の検出と培養の試み、第 84 回関西実験動物研究会、京都(12/10/04)。

Torii R, Okahara N, Narita J, Nakagawa T, Tsuchiya H, Takada T, Synchronization of Ovarian Cycle in Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and Japanese (*Macaca fuscata*) Monkeys, Model Animals for Advanced Reproductive Technology, The 10th International Workshop of Monkey Diseases, Tsukuba, Japan(12/10/04)。

Takada T, Torii R, Efficient gene silencing and cell differentiation using siRNA in mouse and monkey ES cells, Seminar, Pulmonary-Critical Care Medicine Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda,

MD, USA, (12/10/04) .

Takada T, Nemoto K, Yamashita A, Katoh M, Kondo Y, Torii R, Efficient gene silencing using siRNA in mouse and monkey ES cells and differentiation, 31st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Copenhagen, Denmark (1/9-11/05)

Narita J, Tsuchiya H, Takada T, Torii R, Investigation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Fetus Fibroblast Cell Nuclear Transfer, 31st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Copenhagen, Denmark (1/9-11/05) .

鳥居隆三、サル ES 細胞と再生医学、彦根市立病院学術講演会、彦根 (2/5/05)

山下晃弘、高田達之、成田純子、山本学、鳥居隆三、カニクイザル ES 細胞の骨芽細胞への分化誘導におけるレチノイン酸と BMP-2 の効果、第 4 回日本再生医療学会、大阪 (3/1-2/05) .

梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、篠田現、馬峰、末盛博文、鳥居隆三、渋谷正史、中辻憲夫、中畑龍俊、霊長類 ES 細胞の分化誘導における hemangioblast の同定、第 4 回日本再生医療学会、大阪 (3/1-2/05) .

高田達之、根本憲一、山下晃弘、加藤雅也、近藤靖、鳥居隆三 (2005)
siRNA を用いた遺伝子発現抑制技術のマウスおよびサル ES 細胞における応用、第 5 2 回日本実験動物学会総会、東京 (5/18-20/05) .

成田 純子、土屋英明、高田達之、鳥居隆三 (2005)
カニクイザルにおける胎子線維芽細胞を用いた核移植の試み、第 5 2 回日本実験動物学会総会、東京 (5/18-20/05) .

鳥居隆三 (2005)
サルの実験利用と ES 細胞の活用 -現状と問題点-、大阪府立大学大学院生命環境科学研究会第 3 4 7 回獣医学専攻学術集談会、大阪 (7/20/05)

Torii R, Tsuchiya H, Okahara N, Narita J, Nakagawa T, Takada T (2005)
Synchronization of ovarian cycle in cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and Japanese (*Macaca fuscata*) monkeys, The 4th symposium of the society for Biology of Reproduction & Joint Polish-Japanese Seminar , 9/22-24/05, Cracow, Poland (9/22-24/05) .

Takada T, Nemoto K, Yamashita A, Kato M, Kondo Y, and Torii R (2005)
Transient gene silencing using siRNA in mouse and monkey ES cells and cell differentiation, International Symposium on "Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells" Kyoto, Japan (11/15-18/05)

Yamashita A, Takada T, and Torii R (2005)
Osteoblast Differentiation from Monkey Embryonic Stem Cells in vitro, International Symposium on "Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells" Kyoto, Japan (11/15-18/05)

Abdelalim E, Takada T, Tooyama I, and Torii R (2005)
In vitro expression of Natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells, International Symposium on "Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells" Kyoto, Japan (11/15-18/05)

鳥居隆三 (2005)

サルの繁殖と ES 細胞の活用、発生工学・疾患モデル研究会第 5 4 回定例会、東京 (11/29/05)

鳥居隆三 (2005)

霊長類への発生工学的手法の導入 -そこから生まれた ES 細胞とその活用-、日本生殖医療エンジニアリング研究会、第 1 回学術集会、東京 (12/4/05)

山下晃弘、高田達之、鳥居隆三 (2005)

サル ES 細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導、第 2 8 回日本分子生物学会、福岡 (12/7-10/05)

山下晃弘、高田達之、尾松万里子、松浦博、山本学、鳥居隆三 (2006)

カニクイザル ES 細胞の脂肪細胞への分化誘導 第 5 回日本再生医療学会、岡山 (3/8-9/06)

Abdelalim E, Takada T, Toyoda F, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Tooyama I, and Torii R, (2006)

Monkey embryonic stem cell-derived cardiomyocytes express natriuretic peptides in vitro 第 5 回日本再生医療学会、岡山 (3/8-9/06)

鳥居隆三 (2006)

サル ES 細胞の樹立と先端医学研究への活用、(株) 新日本科学、学術講演会、鹿児島 (3/28/06)

研 究 成 果

研究成果

以下に本研究課題の成果を要約する。発表済みの結果は添付した。

本研究はサルから生殖細胞系列の細胞株 EG (Embryonic germ) 細胞を樹立し、生殖細胞への分化を行うことを目的とした。EG 細胞の樹立には妊娠初期の胎子を使用する必要があり、その材料となる始原生殖細胞 : PGC (primordial germ cell) は胚発生の初期に尿膜基底部周辺に現れ、胚発生に従って移動し、生殖巣の原基である生殖隆起に定着後、卵子、精子に分化する。サル胎子、およびその生殖巣の発生と始原生殖細胞の位置に関してはほとんど研究されていないため、まず人工授精、体外受精-胚移植の手技を活用して妊娠させ、各妊娠ステージで胎子を摘出し、生殖巣の発生と始原生殖細胞の動態を調べることから研究を開始した。

1. 受精卵移植を行うための腹腔鏡を用いた移植適期のレシピエント個体の選抜技術を確立した。
2. 排卵後、3-4 週において血清中の β -mCG 濃度を EIA 法により測定し、妊娠診断が可能であることを明らかにした。
3. カニクイザルにおいて生殖隆起は受精 30 日胚では確認されず、受精後 33 日で形成され始め、受精後 36 日においてその形成が完成することがわかった。
4. 始原生殖細胞を直接確認した結果、受精後 30 日胚で後部腸、33 日で腸間膜から生殖隆起に移動し、36 日で生殖腺に位置することがわかった。
5. これらの結果からマウスで始原生殖細胞株が樹立される 10.5dpc 胚、12.5dpc 胚は、サルの場合、それぞれ受精後 30 日胚、36 日胚にほぼ相当するということが明らかとなった。
6. さらにサル EG 細胞樹立には受精後 33 日胚が適していると考えられた。
7. 33 日胚の背部腸間膜から始原生殖細胞を取り出し、ヒト EG 細胞樹立の条件で hLIF (human leukemia inhibitory factor), hbFGF, フォルスコリン、hSCF (human stem cell factor) 等を添加して培養を試みたところマーカーであるアルカリフォスファターゼ活性, PAS 染色陽性を示す細胞は数週間から数ヶ月間維持が可能であった (図 1)。
8. 一方 66 日胚の生殖腺から得た生殖細胞を同様な条件で培養した結果、アルカリフォスファターゼ活性を示す細胞を約 2 ヶ月間維持することが可能であった。
9. 始原生殖細胞の調整方法は酵素消化より機械的破砕法が細胞にダメージを与えないこと、フィーダーにはマウス胎子線維芽細胞や STO 細胞より、サル胎子線維芽細胞の方が適しているらしいということが分かった。
10. 最近報告された生殖幹細胞 (germline stem : GS 細胞) の樹立も試みたが細胞の維持

は可能であったが特有のコロニーを形成させるには至らなかった。

本研究の結果、サル胎子と生殖腺の発生およびそれらの相関が明らかとなり、またサルにおける始原生殖細胞の動態も明らかにすることが出来た。アルカリフォスファターゼ陽性細胞は数ヶ月維持することが可能であったがEG細胞特有のコロニーを形成する細胞株の樹立には至らなかった。これらの結果からサルにおける生殖細胞株の樹立に関してはマウスやヒトの場合と異なる条件が必要である可能性が強く示唆された。サルの場合は動物福祉、動物愛護の観点からも使用胎子数は限られてくる。今後、より効率良い人工授精、体外受精-胚移植の手技を開発し、サルにおける発生工学基盤技術を充実させ、今回得られた知見を基に生殖幹 GS (Germline stem) 細胞を含めた生殖系列細胞の樹立を試みる必要があると考えられる。そのような細胞株は遺伝子改変サルの作製のみならず、ヒトにおける生殖細胞の分化、不妊治療、補助生殖医療分野においても非常に有用な材料となるであろう。

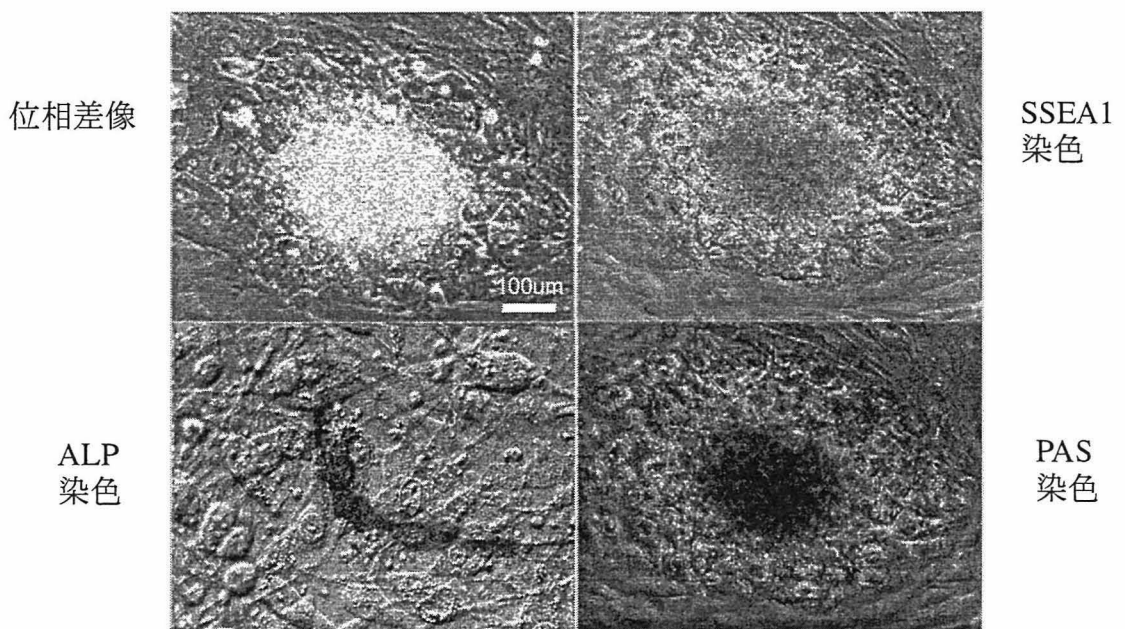


図 1. 33 日胚由来の EG 様細胞