

令和4年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 <input checkbox"="" checked="" type="checkbox/>(共同研究助成金) </td> <td><input type="/> 国際共同研究推進助成金	
研究課題名	生物多様性の保全を目指した新規生殖工学技術の開発を中核とした動物園・水族館との協働モデルの展開	
研究者所属・氏名	研究代表者：先端技術総合研究所 生物学技術研究センター・安齋政幸 共同研究者：生物理工学部 遺伝子工学科・松本和也 生物理工学部 遺伝子工学科・三谷匡 生物理工学部 遺伝子工学科・山縣一夫 生物理工学部 遺伝子工学科・宮本圭 先端技術総合研究所 生物学技術研究センター・加藤博己 先端技術総合研究所 生物学技術研究センター・黒坂哲 先端技術総合研究所 生物学技術研究センター・松橋珠子 医学部附属病院 高度先端総合医療センター・竹原俊幸 農学部 生物機能科学科・岡村大治	

1. 研究目的・内容

本研究では、飼育下野生動物種におけるユニバーサルな遺伝資源の評価方法を確立し、生殖・動物再生医療実現に向けたプラットフォームの構築を目指す。①人工繁殖技術の開発を行い飼育園館に自由度の高い且つ高効率な遺伝資源の確保。②異種間核移植胚内の初期化メカニズムの解明・発生改善の検討。③高齢個体由来培養細胞の樹立と研究資源として初期化された幹細胞の樹立方法を開発。④現存の野生動物を用いた研究から得られた成果を駆使した絶滅動物への応用を検討する。

2. 研究経過及び成果

【課題Ⅰ】人工繁殖技術の開発を行い飼育園館に自由度の高い且つ高効率な遺伝資源の確保

令和4年度も、引き続き共同研究機関として、オキナワマリリサーチセンターおよびアドベンチャーワールドにご協力いただき、バンドウイルカ個体より、血液試料を提供いただき実験試料を作製した(図1)。

(1) オキナワマリリサーチセンターの協力により、バンドウイルカの母体血中の性ホルモン濃度の変動を経時的に観察した。測定した性ホルモンは、バンドウイルカへの妊娠マーカーの評価基準となるプロゲステロンの代謝産物である Pregnenediol-3-Glucuronide (PDG)、鯨類において血中エストロゲンマーカーとなる Estron-3-Conjugate (E1Cs) の一つである Estron-3-Glucuronide (E1G)、そしてエストロゲンの中で最も活性が高いとされている Estradiol (E2) の測定を行い、妊娠中のバンドウイルカの体内での事象を推察し、妊娠中の胎児-母体間の内部評価指標を検討した。

アドベンチャーワールドおよびオキナワマリリサーチセンターの協力のもと、バンドウイルカ妊娠中に経時的に得られた血液試料から ELISA 法を用いてステロイドホルモンの経時的動態解析を行った結果、妊娠中バンドウイルカ個体から採取した血液試料を用いて血中に含まれる Pregnenediol-3-Glucuronide (PDG)の増加は、妊娠後

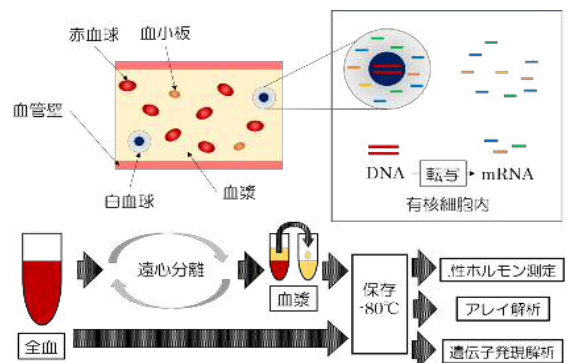


図1. 血液試料の調整

期以降へ増加する傾向を示した。次に、Estron-3-Glucuronide (E1G)は、妊娠中期から後期の初期まで上昇し、その後分娩成立個体では、分娩前 50 日付近から急激に減少することを認めた。

さらに、Estrone-3-Glucuronide (E1G)の測定は、Estrone (E1)および Estron-3-Sulfate (E1S)にも交差性が高く、妊娠中期から後期において胎児-胎盤機能の評価基準になる可能性が示唆された。また分娩前 80 日前後から経時的に測定することによって分娩の開始予測にもなることが推察された。妊娠中バンドウイルカ血中 17 β -Estradiol (E2)には、大きな変化は認められなかった。よって、妊娠中のバンドウイルカの主なエストロゲンは Estradiol (E2)ではない可能性が高いことを示した (図 2)。

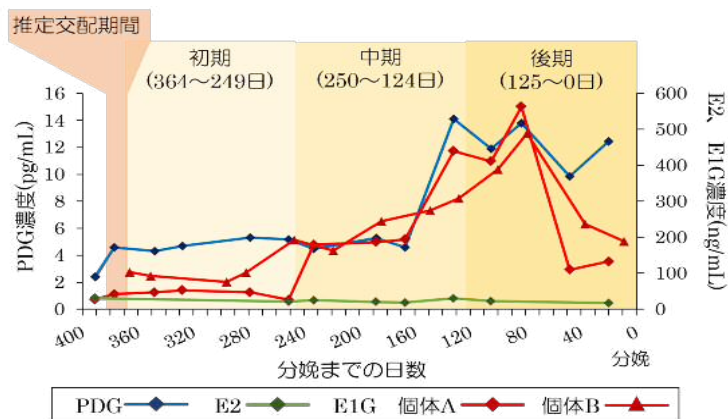


図2. 妊娠中バンドウイルカの血漿中の性ホルモン濃度の推移

(2) イルカ血清から妊娠を反映するバイオマーカーを探索するため、血清中 microRNA と血清タンパク質をターゲットとして解析を行った。

バンドウイルカ 2 個体で人工授精 (AI) 前と AI 後 1 ヶ月の血清中 microRNA をマイクロアレイにより比較解析した結果、妊娠後に血清中含有量が 2 倍以上減少する 2 種類の microRNA がバイオマーカー候補として選出された。次に AI 後 2 ヶ月の血清を加えて SWATH-MS 法による血清タンパク質の同時定量解析を行った。その結果 AI 前、AI 1 ヶ月後、AI 2 ヶ月後を特徴づける血清タンパク質が存在する可能性が示された (図 3)。なお、現在これらの知見をまとめており、その成果の一部は、13th International Mammalogical Congress への報告を予定している。

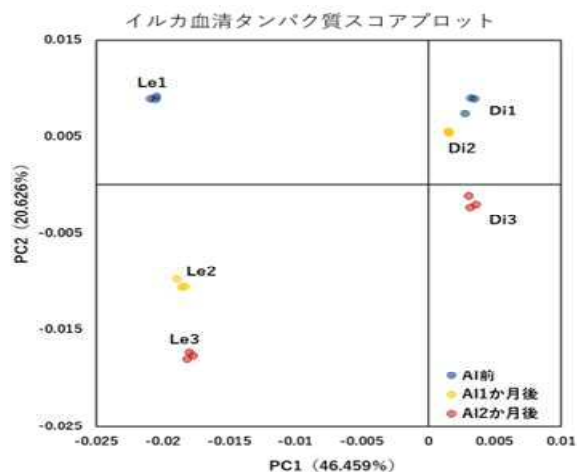


図3 血清タンパク質定量データの主成分分析結果

(3) カンガルー科の雄個体の性成熟は 1~4 年と種によって大きな違いがある。一方、繁殖環境の良い飼育下繁殖では、繁殖効率を制限する目的として一部の個体を外科的処置による精巣・精巣上体切除術を施行することがある。しかし、摘出された組織を用いて細切による精子の回収は、組織片や体液が多く残存し運動性や生存性が低下する可能性がある。

今回、アドベンチャーワールドの協力を得て、外科的処置により摘出された精巣および精巣上体組織を用いて精巣上体尾部から精管灌流法により回収された精子の形態学的観察をおこなっ

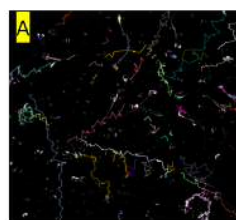


表1. Track Mateによるカンガルー運動精子のパラメーター値

個体No.	平均速度	最大速度	最低速度	速度中央値
A	8.56	22.00	1.20	8.19
B	19.80	43.80	1.68	18.7

図4. 精管かん流により回収されたカンガルー精子運動性解析

平均速度($\mu\text{m}/\text{sec}$) = 平均速度(pixel/frames) \times 10 fps (frames/sec.) \times 0.76 ($\mu\text{m}/\text{pixel}$)

A. 精子運動性解析 (Image J) 精子軌跡を 1 匹毎に識別後、Track mateにより定量化

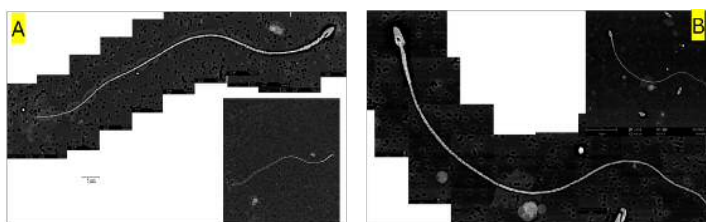


図5. カンガルー精子凍結融解後の走査電子顕微鏡像(A: A個体, B: B個体)

観察像の結果、精子頭部の形態は正常であるものの尾部(鞭毛)の著しい損傷があることが示唆された。カンガルー精子は、グリセロールの強い細胞毒性と浸透圧の変化により運動性ダメージを受けると報告されており (McClean et al., 2006), 低浸透圧中で生じる尾部の膨化が凍結障害の要因であると思われる。

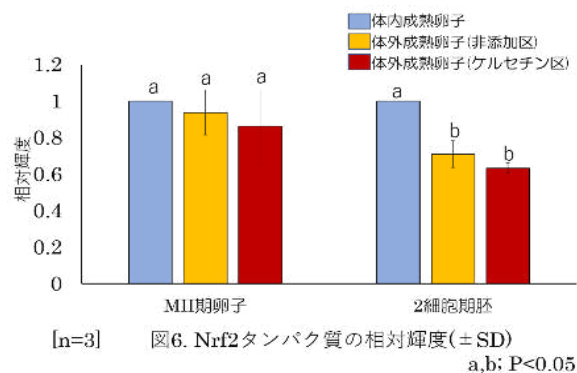
た。精管より回収した2頭の雄アカカンガルー (*Macropus rufus*) 新鮮精子は運動精子画像を取得し、Image J (Track Mate)により可視化軌道精子を抽出後、直進運動性は8.6-20 $\mu\text{m}/\text{sec}$.の速度を有していた(図4, 表1)。また、LIVE/DEAD sperm viability kitにより約65%の細胞膜完全性を保持した精子の存在を認めた。mHTF培地で懸濁された精子を卵黄-グリセロールベース希釈にて凍結した。融解後の精子の一部は、運動性を保持しており、精子全体像を走査型電子顕微鏡にて観察画像を得ることが可能であった(図5)。これらの知見は、第28回日本野生動物医学学会および第5回野生動物保全繁殖研究会にて報告した。

【課題2】異種間核移植胚内の初期化メカニズムの解明・発生改善の検討

近年、マウス体細胞核移植操作における産児作出効率を高める方法として様々な技術的改良が示されている(Ogura A., 2020)。一方で、私たちもこれまでの先行研究として、富山市ファミリーパークから提供されたアカネズミから尾部由来線維芽細胞を用いた体細胞クローン胚の一部では、H3K9me3の発現が低く、異種間クローン技術を妨げる要因の一つであると報告した(Azuma *et al.*, 2020)。これらの知見を基にマウス卵細胞質の代謝経路およびATP合成経路に関する調査を実施した。

(1) マウス卵子の体外成熟操作は、長時間の体外培養による卵子細胞質の成熟が不足していることが問題である。卵母細胞は成熟過程において、ミトコンドリア数の増加とともに細胞質全体に分布し、ATP合成を通じて卵母細胞成熟の進行に寄与する。ポリフェノールフラボノイド化合物であるケルセチンの抗酸化メカニズムは、Nrf2経路を介したカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素を亢進することが示されている(Kobori *et al.*, 2015)。今回、ケルセチンを体外成熟培地へ添加することによる卵母細胞と受精後の胚への発生および卵細胞質に局在するNrf2タンパク質の動態を調べた。

5-50 μM のケルセチン添加mTaM培地による各体外成熟成績は、非添加区と比較し有意な差は認められなかった。しかし、500 μM のケルセチン添加mTaM培地での体外成熟成績(16%; 12/77)は、非添加区(72%; 514/716)と比較し有意に低下した($P < 0.05$)。次に、至適濃度10 μM ケルセチン添加mTaM培地での体外成熟由来卵子を用いて体外受精を行ったところ、体外受精後の胚盤胞期胚への発生率は、非添加区とケルセチン添加区で受精率および胚盤胞期胚への発生率には有意な差は認められなかった。次に、ケルセチン非添加区の体外成熟卵、ケルセチン添加区の体外成熟卵(MI期)と受精後の2細胞期胚でNrf2免疫染色を行った結果、2細胞期胚において、体外成熟卵子ではNrf2の局在は有意に減少した(図6)。Nrf2タンパク質は、非ストレス下においてストレスセンサーであるKeap1と結合し細胞質に存在している。一方で酸化ストレス下ではNrf2タンパク質はKeap1から離れ、核内へ移行しNrf2量のコントロールにより酸化ストレスに応答していることが分かっている(Iso *et al.*, 2016)。このことから、体外成熟卵子の胚発生率が低率である原因の1つとしてNrf2タンパク質が関与している可能性が考えられた。これらの知見は、第70回日本実験動物学会総会へ報告予定である。



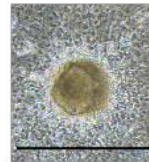
【課題3】高齢個体由来培養細胞の樹立と研究資源として初期化された幹細胞の樹立方法を開発
国際自然保護連合の報告では、現在41,000種以上の動物に絶滅の危惧があるとされており、このうちの27%が哺乳類である。飼育下野生動物も絶滅危惧種や希少種の保全技術を開発・確立するため、多くの機関と連携し研究が進められている。また、配偶子の凍結保存のほかにも有用遺伝資源の保存やiPS細胞のように、体細胞から個体構築の可能性をもつ多能性幹細胞を樹立が検討されている。

(1) 共同研究機関アドベンチャーワールドより生理的寿命により死亡した4個体の組織提供を受けた。令和4年度は、この提供された組織の冷凍保管および初代培養細胞の樹立を検討している。一部の組織からは線維芽細胞の樹立が可能であることを確認した。

(2) 昨年度より、富山市ファミリーパークより提供されたアカネズミ由来尾部線維芽細胞へ初期化因子を導入する条件検討を開始した。今回、遺伝子導入に際して、融合条件と培養条件を修正して検討した。その結果、遺伝子導入 poring puls の範囲が150 - 200V付近にて生存率が57-74%であり、iPS様細胞に特徴的な細胞コロニーの出現を認めた。また、出現したコロニーの培養を継続した結果、2株のiPS様細胞の取得に成功し、再現性の確保に務めた(表2、図7.8)。現在、本コロニーの評価を実施している。

表2. アカネズミ細胞由来のコロニー形成数

Poring Pulse	コロニー数	株数
150V	16	1
175V	2	0
200V	3	1



(スケールバー 1,000µm)

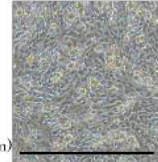


図7. 遺伝子導入後

図8. コロニーピックアップ後

22日目に観察したコロニー

30日目に観察したコロニー

(3) 近年のiPS細胞をはじめとしたリプログラミング技術は、さまざまな細胞へ適応する方法へと発展している。本技術を応用し動物園で飼育されている動物を対象とし、樹立された体細胞を用いてiPS細胞の樹立を試みたが、iPS細胞様のコロニーの出現は認めれたが樹立過程において細胞死が認めれた。複数の培養液を試してみたが結果は同様であった。従来から使用されているレトロウイルスを用いたリプログラミング法では、感染効率は高いものの、細胞分裂をしない細胞株には適さず、またがん化を引き起こすことが知られている。そこで、がん化と細胞死の相関およびその原因を調べたところ、ゾウなどの大型動物においてはがん抑制遺伝子であるTP53遺伝子が38copies存在することがデータベースより明らかになった。リプログラミング過程においてTP53遺伝子は活性化することが知られていることから、本遺伝子が過剰に活性化することでリプログラミングが正常に完了しないことが示唆される。現在、これらの遺伝子についてsiRNAやsmall moleculeなどで制御できないか検討している。

【課題4】④現存の野生動物を用いた研究から得られた成果を駆使した絶滅動物への応用

(1) 昨年度、Tomikawaらが報告した、野生下絶滅種に指定されているシロオリックス由来線維芽細胞(体細胞)を用いた、胚性遺伝子の活性化に細胞分裂およびDNA複製を必要としない新たな体細胞核移植法(NT-ETR法)を開発し、転写リプログラミング誘導技術を確立した(Tomikawa *et al.*,2021, Tomikawa *et al.*,2022)。今年度、異種間核移植技術による転写誘導法の開発研究について、Elsevier誌より、International Open Access Week 2022の一環として、SDGsへの取り組みおよび本論文の研究活動への貢献が幅広い先生方からの支持を受け称された。

(2) Sirtuin family は、NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素のクラスIIIに属し、細胞質および核に分布している。特にSirtuin1およびSirtuin3の作用は活性酸素の消去やDNA修復の亢進に関与している。一方、マウス体細胞核移植操作において培地中へのVitamin C (VC)添加は、DNA脱メチル化およびヒストンアセチル化を亢進することで細胞質機能の改善による代謝経路の特定が期待できる。本検討では、マウス体細胞核移植胚の各ステージから得られたRNA量からSirtuin1および

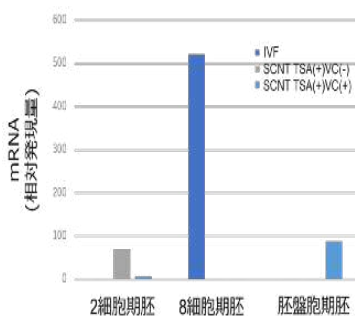


図9. VC処理効果でのSirtuin1の相対発現量

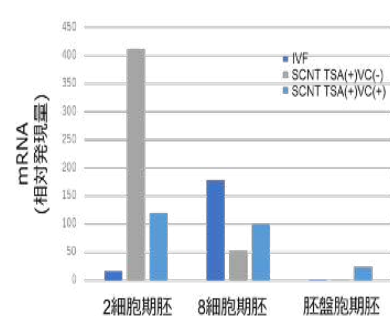


図10. VC処理効果でのSirtuin3の相対発現量

*Sirtuin3*の遺伝子発現を調べた。体細胞核移植から得られた2細胞期胚、8細胞期胚および胚盤胞期胚を用いて、ハウスキーピング遺伝子 (*Gapdh*)でRNA量の補正を行った後、*Sirtuin1*では、2細胞期胚から胚盤胞期胚にかけて発現は低下していた。一方、*Sirtuin3*では、2細胞期胚から胚盤胞期胚にかけて発現が増加している傾向が認められた。*Sirtuin 1*は脱アセチル化酵素であり、ヒストンのアセチル化を外すことで異常な細胞分裂を抑制する。また、p53を脱アセチル化することで生存性を高めている。さらに、*Sirtuin3*はミトコンドリア機能補助を介したNAD合成経路の活性化が可能であることから、クローン胚の発生に必要な補酵素の存在があることが示唆された(図9.10)。これらの知見は、第45回日本分子生物学会にて報告した。

(3) 新規無血清ES細胞用培地DARP培地の開発(岡村グループ)

発生工学的手法を用いて絶滅危惧種の保全を行う場合、当該動物種の生殖細胞と同じように、体細胞から樹立するiPS細胞などの多能性幹細胞が極めて重要な要素であると考えられる。世界で広く用いられているマウスES細胞やiPS細胞は、現在においてもウシ胎児血清の培養液への添加に依存した細胞培養を行っている。無血清培地も開発されているが、一部の添加物は商用製品のため、その成分が明らかとなっておらず、今後様々な動物種からiPS細胞やES細胞を樹立していく中で、成分が全て明らかであるChemically-definedな無血清培地の開発が求められていた。岡村らのグループは、培養液の化学的組成が全て明らかなマウスES細胞用無血清培地の開発に成功し、その遺伝子発現やキメラ形成能が従来の培養液で維持されたES細胞と遜色ないことを証明した(図11)(投稿準備中)。今後、この培地を多種多様な動物種に利活用していくことが期待される。

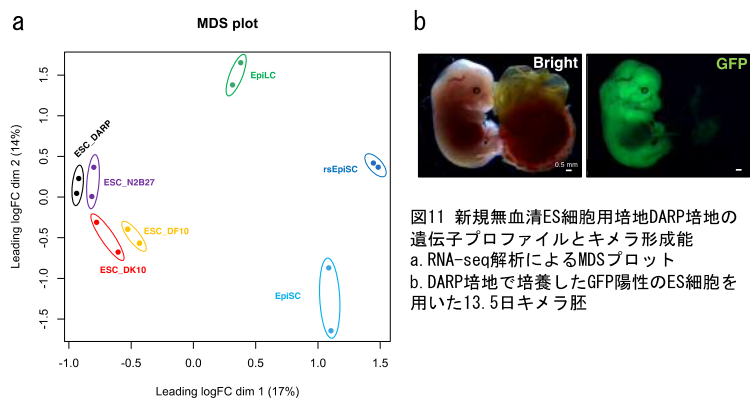


図11 新規無血清ES細胞用培地DARP培地の遺伝子プロファイルとキメラ形成能
a. RNA-seq解析によるMDSプロット
b. DARP培地で培養したGFP陽性のES細胞を用いた13.5日キメラ胚

3. 本研究と関連した今後の研究計画

令和4年度もコロナ禍に加え鳥インフルエンザへの防疫措置の影響や研究資材の高騰と納期遅延等の影響もあったが、共同研究者の皆様には調査への協力や情報提供をいただき、多くの知見が得られたと共に本研究を通じて複数の機関との共同研究契約の締結するに至っている。引き続き、協力機関と連携し研究を進める。

精液保存操作に向けて新たに細胞膜保護剤として高分子物質の代替化合物の探索において、基礎実験としてマウスを用いた諸条件の検討を開始しており、一部結果を参考にバンドウイルカ精液に応用可能か否か検討する。また、新たな凍結デバイスの試行評価系を確立する目的で、同様にマウス胚・配偶子を用いた実験系の条件検討を開始する予定である。

飼育下ペンギン属の適正な孵化への障害の一つとして卵殻の状態変化に着目しており、非妊娠卵への構造解析を予定している。また、飼育下鯨類試料を用いた妊孕性評価においては症例数を増やす予定である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
STAR Protocols. 3(2). 101284.	論文(査読有)	2022年6月
近畿大学先端技術総合研究所紀要. 28. 15-27.	総説(査読有)	2023年3月
近畿大学先端技術総合研究所オープンラボ	講演	2022年8月7日
第69回日本実験動物学会総会	学会(ポスター発表)	2022年5月19日

第 55 回日本発生生物学会年会	学会 (ポスター発表)	2022 年 6 月 1 日
第 5 回野生動物保全繁殖研究会	学会 (ポスター発表)	2022 年 9 月 7 日
第 28 回日本野生動物医学会大会	学会 (ポスター発表)	2022 年 9 月 23 日
第 56 回日本実験動物技術者協会総会	学会 (ポスター発表) 2 件	2022 年 10 月 15 日
第 45 回日本分子生物学会年会	学会 (ポスター発表)	2022 年 12 月 1 日
第 70 回日本実験動物学会総会	学会 (ポスター発表)	2023 年 5 月 24 日(予定)
13 th International Mammalogical Congress	学会 (ポスター発表)	2023 年 7 月 14 日(予定)
Your open access research is helping solve the world's greatest challenges	インターネットメディア (Elsevier)	2022 年 10 月 27 日