

令和5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 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
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。本申請は最終年度であり、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

昨年度、本研究テーマによりバンドウイルカ血清検体をもちいた性ホルモン動態による妊娠判定に続き、血液検体による妊娠判定に係る調査を進めている。これまでに、オキナワマリリサーチセンターの協力のもとエストロゲンの中で最も活性が高いとされている Estradiol (E2)の交差性が低いことが判明した。これらの情報をもとに、妊娠中のバンドウイルカ血液中で安定して発現するリファレンス遺伝子の選定をおこなった。従来より、異なるサンプル間で mRNA 発現レベルのノーマライゼーションに用いるコントロール遺伝子にはハウスキーピング遺伝子が用いられてきた。だが実際には、これらの遺伝子の発現レベルは特定の状況下で変動する場合は報告されている。これまで、鯨類におけるリファレンス遺伝子の選定は限られており、実際に妊娠中や産後個体から採取された血液中において安定して発現するリファレンス遺伝子の選定に関する報告が無いのが現状である。本検討では、5 頭の雌のバンドウイルカの非妊娠、妊娠、産後を含む計 26 サンプルより、RT-qPCR におけるリファレンス遺伝子の発現安定性評価のアルゴリズムとして広く用いられている geNorm、BestKeeper、NormFinder、 ΔCt 法を用いて候補リファレンス遺伝子の発現安定性の評価を行った。また、渡部らの報告をもとに、それぞれのアルゴリズムより得られた発現安定測度の幾何平均値から総合的検討をおこない、順位を決定した。それらの順位をもとに妊娠中の鯨類の血液中において最も安定したリファレンス遺伝子を特定し、RefFinder でも発現安定性順位を決定した。これまでに報告されている、バンドウイルカの血液中で発現しているハウスキーピング遺伝子 15 個の中から 4 つのアルゴリズムとステージ別の発現変動値から安定順位を算出し、最も安定したリファレンス遺伝子の特定を行った。妊娠中のバンドウイルカ血液 26 サンプルから得られた候補遺伝子の Ct 値と $\Delta \Delta Ct$ 法によって算出された発現量から geNorm、

BestKeeper、NormFinder、 ΔCt 法、RefFinder を実行し発現安定順位を算出し、geNorm、BestKeeper、NormFinder、 ΔCt 法の結果から総合順位を算出した結果、ACTB が最も安定した遺伝子であった。また、妊娠ステージ別に分類した発現量による変動係数 (CV%)でも ACTB が最もばらつきが少なく安定していた。妊娠中のバンドウイルカ血中で最も安定したリファレンス遺伝子は ACTB であ

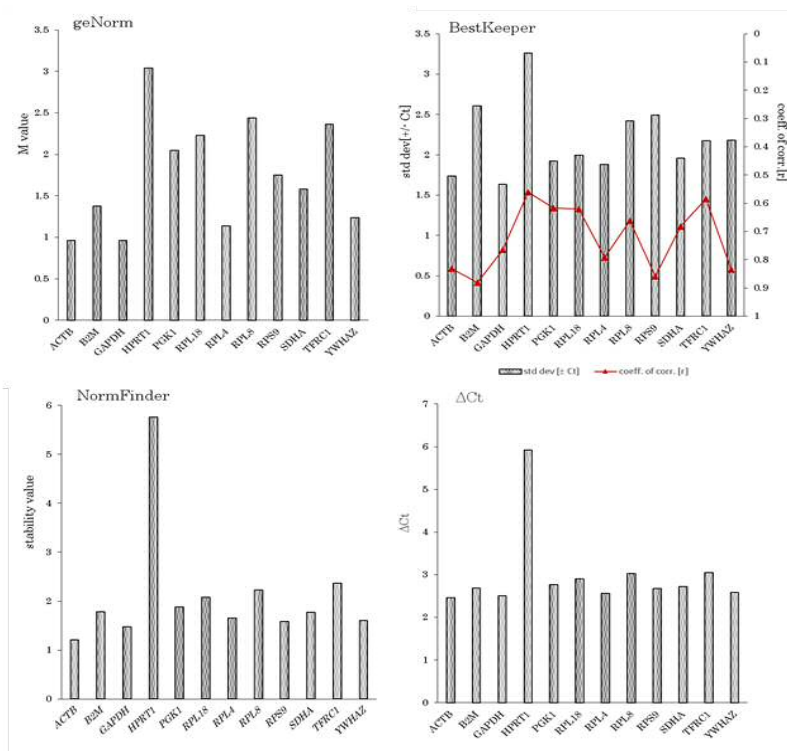


図. 4つのアルゴリズムによって求めた発現安定性

ると結論付けた。今後、妊娠中のバンドウイルカの血中の遺伝子発現解析に用いる遺伝子は *ACTB* を用いることとした。なお、本成果は、第 30 回日本野生動物医学会への報告を予定している。

次に、バンドウイルカ血液中での遺伝子発現解析を実施した。O'Brien らは、バンドウイルカ母個体からの血清プロゲステロン濃度を自然交配群および人工授精群の両方で比較したところ、濃度が高値を示しながらも胎児の不在を伴う受胎状態が続く個体の存在があることを報告した (O'Brien et al., 2012)。

母体と胎児を認識するための最初の過程で形成される脱落膜には、胎盤形成時までの着床胚に栄養や成長因子を供給し、加えて胎児と母体の免疫拒絶を防ぐ役割を持つ。この脱落膜組織の形成には、プロゲステロンやエストロゲンなどのステロイドホルモンが重要な働きを持ち、この期間に発現上昇する Death effector domain-containing protein (DEDD) は、DED タンパク質ファミリーとして 1998 年に同定されている。本検討では、DEDD の遺伝子特異的プライマーを設計し、バンドウイルカ妊娠初期から採取した血液試を用いて RT-PCR による定性分析にて発現を確認することで妊娠初期および胎盤機能の評価指標の可能性を検討した。

妊娠一分娩母体ならびに妊娠一死産母体から各検体中 (血液試料) に含まれる DEDD 発現量を比較したところ、妊娠初期における変動には影響が低い可能性があるものの、一方で正常に出産に至った個体と比較し、死産個体は発現量に差が認められた。

鯨類においては妊娠中における白血球数が上昇することが知られている。特に妊娠初期一中期間で有意な上昇がその後の出産に必須とされており、今回、死産に至った母体では初期における脱落膜形成に必要な DEDD タンパク質の発現レベルに差が生じたものと推測している。なお、本成果は、第 7 回野生動物保全繁殖研究会大会へ報告を予定している。

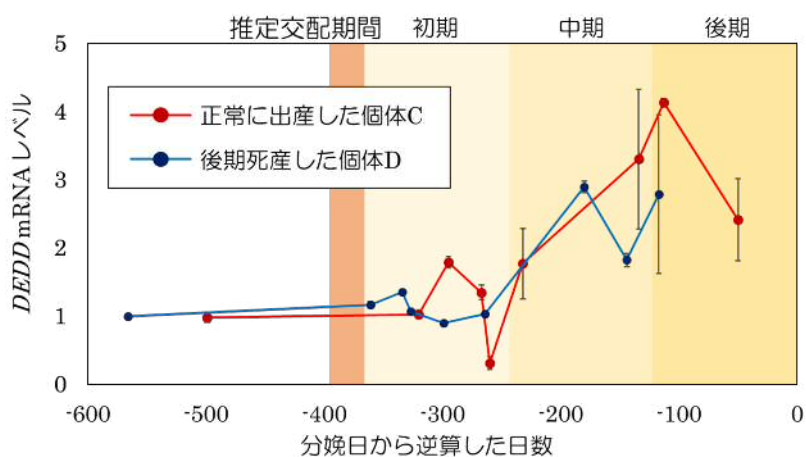


図. バンドウイルカ血中の *DEDD* 遺伝子の発現量
エラーバーは標準誤差を示す。

【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

体細胞核移植 (SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer) によるクローン胚の作製およびクローン個体の作出が多くの動物種で報告されている (Ogura et al., 2013)。この SCNT 技術は、核のリプログラミングや全能性の再獲得に関する研究、刷り込み遺伝子の機能解析、細胞の発生と分化の制御機構等に関する基礎生物学分野における生命現象の解明のみならず、希少動物や家畜動物の人工繁殖分野などに応用されている。しかし、SCNT 技術を用いて作製する再構築胚や個体作出に係る効率が数%と非常に低く、その理由の 1 つとしてはドナー細胞によって持ち込まれたヒス

トンのメチル化異常が観られること(Matoba et al., 2014)が知られている。本検討では、マウスをモデルとし、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(Histone deacetylase inhibitor, HDACi)にかわる化合物として、細胞膜透過性であるジメチル化 α ケトグルタル酸(dm- α KG)を含む胚培養液がマウス体細胞核移植胚の胚盤胞

期胚までの発生能に関する検討を行った。この結果、核移植後、活性化して得られた再構築胚は 72 時間後に 56%(58/103)が桑実期胚へ

表. 各試験区におけるマウス体細胞核移植胚の発生成績

試験区	供試卵数(前核形成卵子数)	胚の発生率(%)			
		2細胞期	4細胞期	桑実期	胚盤胞期
非添加区	48	34(71)	23(48) ^b	20(42)	7(15) ^a
1mM dm- α KG	103	92(89)	75(73) ^c	58(56)	41(40) ^e

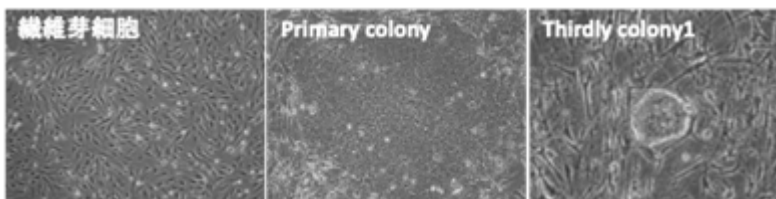
a-e, b-c; p<0.05(有意差あり)

発生し、96 時間後には 40%(41/103)の桑実期胚が胚盤胞期胚まで発生し、非添加区と比較して胚発生の改善が認められた。

【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個体の組織提供を受け、初代培養により 3 種の線維芽細胞を樹立した。この細胞は超低温下にて保存されている。また、精管灌流法による不動精子の回収技術について、複数園館との意見交換レクチャーを実施している。

(2) アフリカサヴァンナゾウなど希少動物を含むさまざまな動物種から人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の樹立を試みた。最近の幹細胞研究から iPS 細胞樹立技術は、レトロウイルスベクターを用いるものから、効率化やゲノムを傷つけない方法として、piggybac センダイウイルスや RNA トランスフェクションが開発されている。マウスおよびヒトを含む霊長類では、上述した方法で樹立が可能であったが、野生動物由来線維芽細胞では初期化効率が低く、また出現してくる細胞状態が不安定なため、継続して培養できず消失した。近年、多能性幹細胞には 2 つの状態：Naïve 型と Primed 型が存在し、形態や性質が異なる。特に、マウス以外の種では Primed 型として培養が可能であるが、Primed 型は Naïve 型に比



べ、増殖や性質が不安定であることが報告されている。本研究結果から、アフリカゾウ由来 iPS 細胞はヒトと同様 Primed 型であることが示された。一方で、ヒトなどの報告されている iPS 細胞維持培養液では、アフリカゾウ由来 iPS 細胞の多能性状態を維持する必要因子が異なる可能性が示唆された。iPS 細胞技術による希少動物の保護の可能性が示されたと同時に、種間の違いに

よる多能性状態の比較は、新たな多能性の理解につながる。

【課題 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
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でないマウス 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

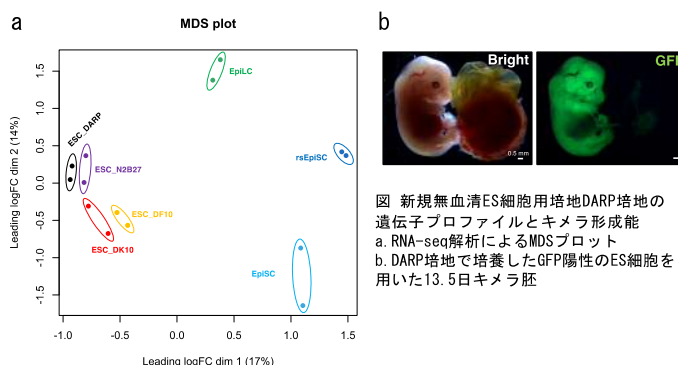


図 新規無血清ES細胞用培地DARP培地の遺伝子プロファイルとキメラ形成能
a. RNA-seq解析によるMDSプロット
b. DARP培地で培養したGFP陽性のES細胞を用いた13.5日キメラ胚

(図) (Katayama et al., Front. bioeng. biotechnol., 2024)。さらにこの新規無血清培地は ES 細胞のみならず、細胞特性の異なるマウス多能性幹細胞であるエピブラスト幹細胞においても使用可能であることも明らかとなった。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。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

最終年度となり、遺伝資源の保全に資する研究活動において多くのご支援をいただき様々な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等の締結するに至った。特に、(株)アワーズ・アドベンチャーワールドでは、共同研究の一つである飼育下ペンギン施設を改修大規模繁殖施設を設置 (2023年12月公開) したことは、今後の国内飼育園館への人工繁殖施設の模範となることであろう。引き続き、外部資金の導入、助成金の申請等にも協力機関と連携し進めていきたい。

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)
実験動物技術 58(1).1-9	論文 (査読有)	2023年6月1日
Life science alliance 6(11)	論文 (査読有)	2023年11月
Front. bioeng. biotechnol. 12:1390386	論文 (査読有)	2024年5月15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
13 th International Mammalogical Congress	学会 (ポスター発表)	2023年7月17日
第41回日本受精着床学会総会・学術講	学会 (ポスター発表)	2023年7月17日

演会		
第 56 回日本発生生物学会	学会（ポスター発表）	2023 年 7 月 23 日
第 6 回野生動物保全繁殖研究会	学会（ポスター発表）	2023 年 8 月 28 日
第 29 回日本野生動物医学会大会	学会（ポスター発表：2 件）	2023 年 9 月 25 日
第 57 回日本実験動物技術者協会総会	学会（ポスター発表：3 件）	2023 年 10 月 19 日
日本実験動物技術者協会三支部交流会	講演	2024 年 2 月 24 日
日本実験動物技術者協会 2023 年度春季大会	学会（口頭）	2024 年 5 月 11 日
第 71 回日本実験動物学会総会	学会（ポスター発表）	2024 年 5 月 30 日
第 7 回野生動物保全繁殖研究会	学会（ポスター発表）	2024 年 9 月 10 日（予定）
日本哺乳類学会 2024 年度大会	学会（ポスター発表）	2024 年 9 月 6 日（予定）