

令和元年度（平成31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"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	展示動物からの細胞・配偶子を用いた新規生物多様性保全技術の開発と動物園・水族館との統合研究連携モデルの構築	
研究者所属・氏名	研究代表者：生物理工学部 遺伝子工学科 教授 三谷 匡 共同研究者：先端技術総合研究所生物学技術研究センター 教授 加藤 博己 生物理工学部 遺伝子工学科 教授 松本 和也 先端技術総合研究所生物学技術研究センター 准教授 安齋 政幸 生物理工学部 遺伝子工学科 准教授 山縣 一夫 生物理工学部 遺伝子工学科 講師 宮本 圭 先端技術総合研究所生物学技術研究センター 講師 黒坂 哲 先端技術総合研究所生物学技術研究センター 講師 松橋 珠子 医学部附属病院高度先端総合医療センター 助教 竹原俊幸 農学部 バイオサイエンス学科 講師 岡村 大治	

1. 研究目的・内容

現在、地球上で多くの動物が絶滅の危機に瀕しており、生物多様性の維持に向けた取組は急務である。しかし、ワシントン条約による商取引の禁止や繁殖・増産技術が未確立であることから、域外保全事業は困難な状況に直面している。本研究は、近畿大学と包括連携協定を締結したアドベンチャーワールド（株）アワーズ）をはじめ国内の動物園・水族館と連携し、展示動物を対象に最先端の動物生命工学を駆使して、展示動物の域外保全のプラットフォームとなる生殖工学・発生工学の基盤技術を研究開発するとともに、橋渡し研究を通じて国内の横断的な域外保全事業を担う人材育成に資する。本研究では、①展示動物からの細胞・配偶子の採取と生殖・発生工学技術に基づく人工繁殖技術の開発、②展示動物からの細胞核の回収と機能修復技術の開発、③分化細胞の遺伝子発現プログラムの書き換えによる全能性再獲得誘導技術の開発、④展示動物からのiPS細胞・ES細胞の開発と当該幹細胞からの配偶子の作製をめざす。

2. 研究経過及び成果

【課題Ⅰ】展示動物からの細胞・配偶子の採取と生殖工学技術に基づく人工繁殖技術の開発

平成30年度から引き続き、アドベンチャーワールドと連携し、バンドウイルカおよびキングペンギンについて射出精液の凍結保存操作の検討を行った。

（1）バンドウイルカ射出精液の凍結保存技術の開発

昨年度バンドウイルカ用に開発した卵黄－グリセロールを基本とする凍結保存液を用いて、3頭の射出精液の保存操作を完了した。これらの技術はアドベンチャーワールドAWS動物病院へ技術移管している。次に、採精可能な個体を用いた定期的な採精を実施し季節的変動の確認及び精液凍結を行った。2018年9月～2019年4月の期間に約10日間隔に採精をおこない成績を精査したところ、1個体につき2回/日の採精が可能であった。約7カ月間に渡り採精したところ、3頭共に精液量の変化を認めた。この精液量の変化には、雄複数頭の同居により生じる個体間の順位や雌個体の同居の有無が影響していると推察される。

（2）キングペンギン射出精液の凍結保存技術の開発

キングペンギン射出精液を昨年度改良した mBPSE 希釈液を用いて希釈後、DMSO を基本とした凍結保存液で凍結保存した。キングペンギンは射精量が少ないうえ、尿酸や糞便の混入が凍結保存の成績に大きく影響するが、尿酸や糞便の混入が少なかった個体では融解後の精子に高い運動性が保持されていることを認めた。本技術はアドベンチャーワールド AWS 動物病院へ技術移管し、保存した精液も人工授精に備え返却している。融解後の精子の形態学的検査の結果、凍結融解後の精子は約40%が細胞膜の完全性を保持し運動能を有していた。さらに、SEMによる高解

像度画像により推定される凍結損傷部位から、鳥類に特徴な頭部屈曲および尾部屈曲以外に、中片部損傷(消失)が認められるという新たな知見を得た。興味深いことに、中片部の形態はこれまで哺乳類で示されている渦巻き状の形態とは異なりドット状であることが示された。次に、凍結精液を用いた人工繁殖技術の構築を目的に、射出新鮮精液を用いて人工授精を実施した。精液の注入操作についてカテーテル法およびシリンジ法を導入し、いずれも複数回 2羽の雌個体に人工授精を実施したところ、両個体とも産卵を迎えた。自動孵卵器による人工孵化に成功し、親子鑑定の結果、精子注入雄個体由来であることが確認され、国内 2 例目となる人工繁殖に成功した。

【課題Ⅱ】展示動物からの細胞核の回収と機能修復技術の開発

生理的寿命を迎えた個体から組織を回収し、初代培養細胞を樹立した。本年度は 4 個体の組織提供があり、その内 2 個体で初代培養細胞を樹立した。野生下では既に絶滅し動物園で飼育繁殖により維持されている(野生絶滅種)シロオリックス由来初代培養細胞を樹立した。この細胞を用いて細胞核の回収とリプログラミングの誘導が可能か体細胞核移植法により検討を開始した。

【課題Ⅲ】分化細胞の遺伝子発現プログラムの書き換えによる全能性再獲得誘導技術の開発

始原生殖細胞は受精後に個体形成を担う細胞であることから潜在的に全能性を有しており、その封印が破たんするとテラトーマとよばれる三胚葉性の胚性腫瘍を発症する。本研究はこの封印と破たんがリプログラムの仕組みを反映していると着想し、阻害ターゲット分子が明らかとされているシグナル阻害剤やエピジェネティック修飾剤をマウス始原生殖細胞の培養システムに添加し、iPS/ES 細胞のようなコロニー形成細胞の出現を指標にスクリーニングを進めている。平成 30 年度において、p38 MAP kinase 阻害剤を培養下に添加することで、マウス始原生殖細胞から従来の EG 細胞とは異なる多能性幹細胞を作製することに成功した。令和元年度は当該多能性幹細胞の性質について解析を進め、従来のナイーブ・プライム型とは大きく異なる性質を有していることを見出した(投稿準備中)。本研究は、「多能性スペクトル」を研究する有用なモデルになることが期待される。

【課題Ⅳ】展示動物からの iPS 細胞・ES 細胞の開発と当該幹細胞からの配偶子の作製

iPS 細胞技術の活用による希少動物の再生の可能性をめざし、本年度はアミメキリンやアフリカサヴァンナゾウなどの展示動物の細胞を対象に iPS 細胞の樹立を試みた。外来遺伝子の挿入を回避できる episomal vector を用いて、ヒト Oct4・Sox2・Klf4・L-Myc・Lin28・マウス p53DD 遺伝子の導入によるリプログラムを検討した。しかしながら、iPS 細胞の出現が認められず、その原因として導入効率の低さと持続的な遺伝子発現が生じないことが示された。そこで、次世代型 RNA transfection 法を用いて iPS 細胞の誘導を試みた。ヒト OCT4, SOX2, KLF4, GLIS1 遺伝子および B18R RNA を導入したところ、キリンおよびゾウ細胞いずれにおいても細胞の増殖が活性化した。2 週間後において細胞死誘導が認められたが、一部 iPS 細胞様のコロニーが出現した。しかしながら、形態を維持することができずその後消失した。不完全なリプログラムが原因であると考えられ、次期実験計画としてリプログラムの効率を上昇させる低分子化合物などを利用した方法を検討している。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

【課題Ⅰ】展示動物からの細胞・配偶子の採取と生殖工学技術に基づく人工繁殖技術の開発

現在コロナ禍の影響により協力園間との往来も含め試料や検体の授受も困難となっている。また、動物園水族館協会が関与する研究集会はすべて Zoom 開催に変更され、日本野生動物医学会や野生動物保全繁殖研究会の講演会等も中止となり情報共有が困難な状況にある。本状況を鑑み、マウスを用いて基礎実験に取り組む。具体的には、イルカ妊孕性に関する研究に向けた性ホルモン値の検出と着床因子の検出法に取り組む。また、園間と研究再開後は、アドベンチャーワールドとキングペンギン凍結精液を用いた人工授精を試みる。

【課題Ⅱ】展示動物からの細胞核の回収と機能修復技術の開発

引き続き、連携する動水族園からの死亡個体の提供に応じて、随時、細胞核の回収を試みる。

【課題Ⅲ】分化細胞の遺伝子発現プログラムの書き換えによる全能性再獲得誘導技術の開発

マウス始原生殖細胞の「再プログラム化」により樹立された多能性幹細胞と従来のナイーブ・プライム型多能性幹細胞とを比較し、「多能性スペクトル」の姿を明らかにしていく。

【課題Ⅳ】展示動物からの iPS 細胞・ES 細胞の開発と当該幹細胞からの配偶子の作製

昨年度までに、ゾウなどの体細胞に対して RNA transfection を用いた効率的な遺伝子導入法を確立している。しかしながら、iPS 細胞様細胞の出現は認められるものの、不完全なリプログラムによってその後の維持ができず細胞は消失した。本年度は、HDACi などのリプログラム促進剤を用いて iPS 細胞の誘導および性質評価を行い、最終的には生殖細胞への誘導を試みる。

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)
J. Reprod. Dev. 65, 245-250	原著論文(査読有)	2019年6月
Scientific Reports 9, e4050	原著論文(査読有)	2019年3月
第25回日本野生動物医学会大会	ポスター発表	2019年8月31日
第3回野生動物保全繁殖研究会大会	ポスター発表(1)	2019年7月4日
第3回野生動物保全繁殖研究会大会	ポスター発表(2)	2019年7月4日
第3回野生動物保全繁殖研究会大会	ポスター発表(3)	2019年7月4日
第66回日本実験動物学会総会	ポスター発表	2019年5月14日
Methods Mol. Biol.	原著論文(査読有)	2019年
第42回日本分子生物学会年会	ポスター発表	2019年12月5日
第19回日本再生医療学会総会 (COVID-19によりZoom開催)	ポスター発表	2020年5月18~29日
第15回日本生殖発生医学会学術集会 (COVID-19により中止)	ポスター発表	2020年3月14~15日