

令和 2 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工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工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工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工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

令和 2 年度は、コロナ禍の影響により協力園間への往来や検体の授受等が極めて困難な状況下であったが、協力園館との情報交換により幾つかの知見が得られた。

(1) アドベンチャーワールドとの共同研究では、キングペンギンの精液採取において、新鮮精液の採取が 2021 年 1 月のみと限定されたなかで、精液保存の検討は実施せず採取精液の人工授精のみに切り替え、これまでの行動形態の知見から排卵予測を行い、人工授精を実施しところ、1 ペアから育雛の作出に成功した。2 年連続でキングペンギンの人工繁殖に成功し、再現性の高い技術として確立しつつある。なお、本成果は、近畿大学ならびにアドベンチャーワールドからプレスリリースとして公開した(<https://www.kindai.ac.jp/news-pr/news-release/2021/04/032060.html>, <https://www.aws-s.com/topics/detail?id=top2386>)。

(2) バンドウイルカ雌個体から提供された血液試料より妊娠鑑定手法の確立に向け、性ホルモン値の動態ならびに妊娠末期でのエストロゲン代謝産物の遺伝子発現の定量化を試みた。その結果、妊娠期間中 1 ヶ月毎に継時的採血を行なったバンドウイルカ血漿中 E1G 濃度の推移は妊娠 5 ヶ月で上昇し 8 ヶ月から 10 ヶ月でピークを迎え、11 ヶ月で急激に減少し出産することを認めた(図 1)。この妊娠後期での E1G の増加は Stainman ら (2011) の報告と一致した。一方、エストロゲン代謝産物の遺伝子発現の定量化として、発情回帰を確認していない分娩個体への ESR1 の定量化を確認したところ、産後離乳間近の個体 A と授乳中の個体 B を比較し有意な差があることを認め、分娩後の発情開始行動の特定に分子遺伝学的手法が有用であることを認めた(図 2)。

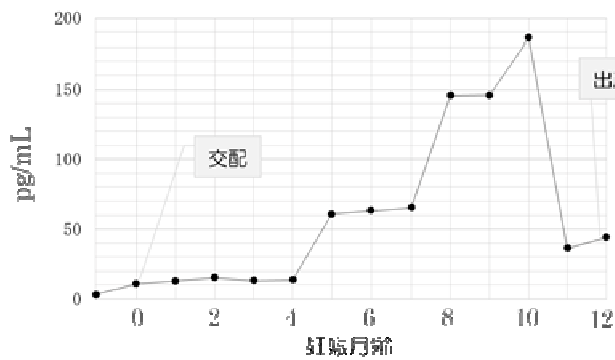


図1: 妊娠中のバンドウイルカ血漿中BDV濃度の推移(n=1)
BDV濃度は妊娠5ヶ月で上昇しはじめ、10ヶ月でピークを迎え、11ヶ月で急激に減少した。

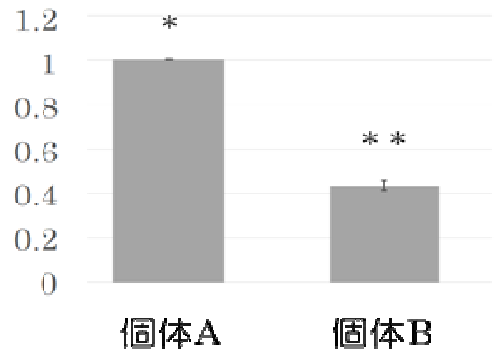


図2: バンドウイルカ全血中のBDVの発現量の比較(*, ** * $p < 0.05$)

[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

(1) アドベンチャーワールドより、死亡個体組織の提供を受け、3個体（コビトカバ・アメリカバイソン・ホッキョクグマ）の筋肉や精巣の冷凍保存を実施した。また、提供された組織から初代培養細胞の樹立を検討し、ホッキョクグマならびにカルフォルニアアシカの線維芽細胞の樹立に成功し、順次細胞の凍結保存を実施している。

(2) マウス卵子における異種細胞核の機能修復能力について検討するため、基本となる異種精子に対する受容能について検討した。本年度は、異種精子の顕微授精後の前核形成過程に焦点を絞り解析を行った。その結果、モリアカネズミ精子は雄性前核の形成が遅延しマウス雌性前核の形成過程と同調しないこと、先体酵素の除去や精子細胞膜の不安定化によりモリアカネズミ雄性前核形成の遅延が大きく改善されることが明らかとなった。このような挙動を示す異種精子に対し、受精後のDNA修復がどのように働くのか検討を進めている。

[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

(1) 富山市ファミリーパークとの共同研究により、アカネズミ由来線維芽細胞を用いた核移植において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(TSA) とビタミンC(VC)を含む活性化処理後の再構築卵子がヒストンメチル化への影響を検討した。核移植後の前核期卵子および2細胞期胚を免疫細胞染色により解析したところ、H3K9me3の蛍光輝度は、TSA,VC未処理区と比較して低メチル化状態ではあるものの完全な抑制型へ転じ得ないことを明らかにした(図3.4)。

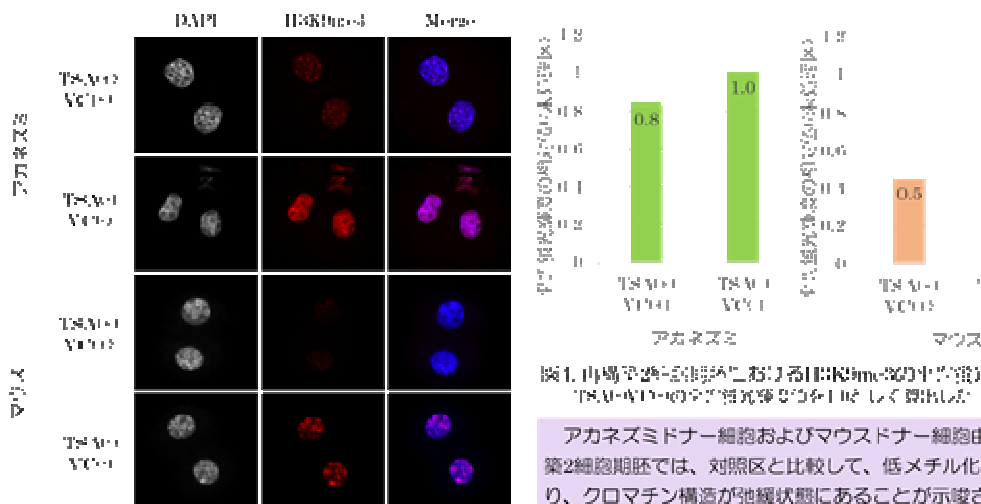


図3: 由来種が異なる胚におけるH3K9me3の発現状態

図1: 再構築された胚におけるH3K9me3の蛍光強度
TSA+VC+の処理後の方が10%ほど減少した
アカネズミドナー細胞およびマウスドナー細胞由来再構築2細胞期胚では、対照区と比較して、低メチル化状態にあり、クロマチン構造が弛緩状態にあることが示唆された。

(2) 将来、精子や卵子へと分化する始原生殖細胞は、受精というイベントを介して初めて全能性・多能性を発揮する。しかし、受精までに多能性を発揮した場合はテラトーマと呼ばれる胚性腫瘍のリスクを負うことになるため、始原生殖細胞は多能性を発揮できないように様々な分子機構によって制御され、その破綻はテラトーマ発症につながる事が予想される。始原生殖細胞の培養条件下において、各種成長因子やサイトカインの添加によって上記のような制御機構は破綻しEG細胞と呼ばれる多能性幹細胞へリプログラムされる場合があり、始原生殖細胞は多能性を発揮出来るようになる (Matsui et al., Cell, 1992)。そこで、我々はEG細胞へのリプログラミング

グ過程を生体内におけるテラトーマ発生を模倣する生体外のシステムとして捉えた。この始原生殖細胞の初代培養システムに様々な低分子化合物である各種阻害剤を添加し、仮に始原生殖細胞がリプログラミングを起こした場合、阻害されたシグナル分子が生体内での始原生殖細胞において多能性を発揮させないように制御している分子機構であり、またテラトーマの原因シグナルである可能性が示唆される。令和 2 年度は、エピジェネティック修飾分子やシグナル伝達阻害として機能する種々の低分子化合物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 細胞とは大きく異なる性質を持つ多能性幹細胞を作製することに成功した。当該研究においては p38 MAP kinase 阻害剤の添加によるマウス始原生殖細胞の「リプログラミング」を報告し、そのようにして樹立された多能性幹細胞が従来のナイーブ・プライム型の多能性とは大きくことなる性質を持っていることを明らかにした（投稿準備中）。

[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 細胞技術は体細胞を、生殖細胞を含む様々な細胞へと分化することが可能な多能性幹細胞へとリプログラムする技術であり、医療分野のみならず多くの生命現象の解明に応用されている。本研究では、本技術を応用し希少動物の再生が可能ではないかと考え、様々な動物由来の細胞から iPS 細胞作製を試みた。令和 2 年度は、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。まず、体細胞のリプログラムに必要な遺伝子セットについて、ヒト由来の遺伝子と対象とする動物種の遺伝子との間に違いがあるか評価した。アフリカサヴァンナゾウとの間に 80%以上の相同性があることを確認した。次に、次世代型 iPS 細胞技術である RNA transfection 用いてアフリカサヴァンナゾウの iPS 細胞誘導を試みた。ヒト OCT4, SOX2, KLF4, GLIS1 遺伝子および B18R RNA を導入したところ、細胞増殖の活性化と一部 iPS 細胞様のコロニーの出現が認められた。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、iPS 細胞の樹立には至らなかった。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

地球規模の自然破壊の進行はかつてないほど深刻化している。我々が暮らすこの豊かな地球環境を後代まで維持することは、持続可能な開発目標(SDGs)として「14. 海の豊かさを守ろう」及び「15. 陸の豊かさを守ろう」にも明示された最重要課題である。本研究の母体となる研究コアでは、大学研究機関として発生工学・生殖工学技術を駆使した希少動物の保全技術の開発やマンモス組織を用いた絶滅動物の復活への橋渡し研究、そして動物再生医療に欠かせない人工多能性幹細胞の開発など、次々に新しい知見を公表することで横断的研究を拓いている。その一環として、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）と連携し、国内飼育園館でもとても希少なキングペンギンの人工授精による産児獲得にも成功した。これらの成果は、本研究助成による 3 年間にわたる支援に負うところが非常に大きかった。今回、継続して新たに学内研究助成金に採択されたことから、本研究をさらに発展させた計画を立案している。野生動物の域外保全事業のプラットフォームの発展を望む世界的ニーズに応えるため、引き続き新規人工繁殖技術の開発を加速させるとともに、新たに鯨類妊娠鑑定に関するバイオマーカーの開発に着手する。さらに、新規体細胞初期化技術によるユニバーサルな野生動物 iPS 細胞の樹立とその活用技術の開発に取り組む。これらの活動を動物園・水族館との協働モデルにおいて展開し、本研究で生まれたイノベーションの橋渡しによる社会実装を目指す。

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)
<i>J. Reprod. Dev.</i> 66: 255-263	原著論文(査読有)	2020年6月
<i>Cell Stem Cell.</i> 28(3): 550-567	原著論文(査読有)	2021年3月
<i>Nature.</i> 592(7853): 272-276	原著論文(査読有)	2021年4月
近畿大学先端技術総合研究所紀要. 26: 11 - 18	学内紀要	2021年3月
近畿大学先端技術総合研究所紀要. 26: 19 - 27	学内紀要	2021年3月

日本実験動物技術者協会会報. 192: 7 - 8	業界誌	2020 年 4 月
LABIO21. 81: 27 - 30	業界誌	2020 年 9 月
第 67 回日本実験動物学会総会	学会 (誌面公開)	2020 年 5 月
MBSJ2020 Online	学会 (ポスター発表)	2020 年 12 月 2 日