

令和3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
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

令和3年度は、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との共同研究により、バンドウイルカ個体への人工繁殖技術の指標として母体の妊娠を反映するバイオマーカーの探索をおこない、幾つかの知見が得られた。

(1) オキナワマリリサーチセンターより、バンドウイルカ2頭(Le、Di)の人工授精(AI)前とAI1ヶ月後の血清サンプル提供いただき、miRNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、Leで4,367種類、Diで5,086種類のmiRNAが検出された。次に、検出されたmiRNAの中で、イルカと比較的近縁なウシと研究の進んでいるヒトとマウスのmiRNA情報から、Le、DiともにAI前とAI1ヶ月後で検出量に2倍以上の差があったmiRNAを探索し、46種類(AI前<AI1ヶ月後:33種類、AI前>AI1ヶ月後:13種類)のmiRNAをマーカー候補として選択した(図1)。

バンドウイルカの全血を用いて、妊娠初期に必要なホルモン受容体*ESR1*の発現量の比較を行った。健康観察時に得られる全血からTotal RNAを回収し、Real-time PCRにより評価した。その結果、*ESR1*の発現は、産後1年(Sample1)で有意に発現量が低く、産後2年(Sample2)および妊娠中

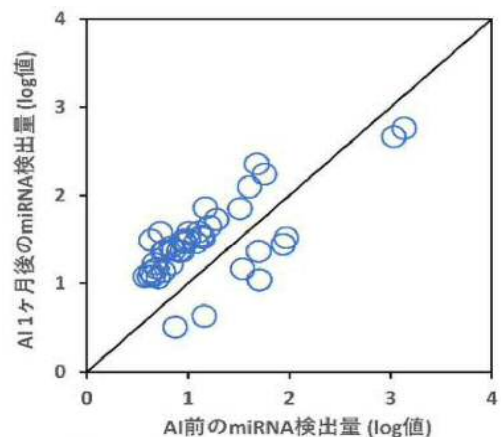


図1. マーカー候補として選択した46種類のmiRNAの発現量(log値)

期(Sample3)では発現量が高ことを確認した。一般的に哺乳類の授乳期では、プロラクチンというホルモンが分泌され、非妊娠下で当該ホルモンが高値であると個体自体が不妊兆候を示す。一方でエストロゲンやプロゲステロンなどのホルモンは分泌が抑制されることが認められている。これを受け、血液性状からバンドウイルカの分娩後の授乳期にエストロゲンの分泌量が減っていたと考えられた。本

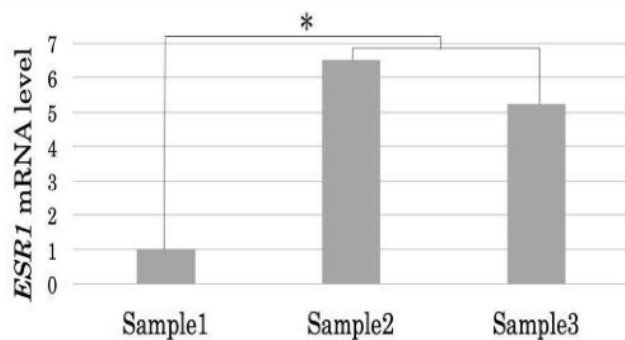


図2.バンドウイルカ全血中に発現するESRI発現量の比較

知見は、The 14th Asian Society of Conservation Medicine / 27th Japanese Society of Zoo and Wildlife Medicine 2021 Joint Conference Front line of One Health in Asia へ報告した。

(2) キングペンギンへの人工授精により育雛の誕生に成功しているアドベンチャーワールドと連携して雌雄個体の負担軽減のため幾つかの手法の改良を実施した。精液採取方法として個体のトレーニングにより自発的にトレーナーの膝に乗り首を絡ませ保定することにより、無麻酔下にて射出精液の採取に成功した。次に、人工授精方法としてカテーテルを総排泄腔へ挿入し精液注入する手法について、ディスプレイザブルシリンジ先端部を挿入し注入する操作へ変更し育雛の誕生に成功した。これらの人工授精操作の詳細な知見をまとめ、第 69 回動物園技術者研究会へ報告した(図 3)。



図3. 第69回動物園技術者研究会(太田ら、2021)

【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

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野生マウス由来線維芽細胞からの異種間核移植により得られた再構築胚は、H3K9me3 の発現において胚発生の進行に必要な状態にシフトしたものの完全な抑制型へ転じ得ないことを認めている(Azuma *et al.*, 2020)。これらの知見を基に卵細胞質の代謝に關与する ATP 合成経路について調査した。

(1) 異種間体細胞核移植(iSCNT)によって作製されたクローン胚は、mtDNA のヘテロプラズミーがみられる場合、ドナー細胞由来 mtDNA が残存することが発生率の低下につながっている(Takeda *et al.*, 2004)。Oligomycin A(OA)は、ATP 合成酵素のプロトンチャネルを遮断することで、ADP と Pi の結合が行われず酸化的リン酸化を阻害する。本研究では、OA 処理により ATP 産生を抑制したドナー細胞を用いて SCNT を行いクローン胚の発生を確認した(図 4)。OA

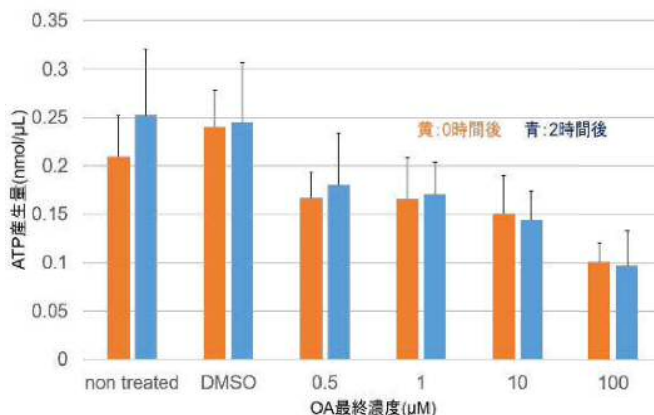


図4. 各OA濃度添加マウス線維芽細胞のATP産生量

処理により ATP 産生を抑制したマウス線維芽細胞を用いた体細胞核移植は、OA10 μM 添加由来において卵細胞質内で cdc2 の活性化に伴う早期染色体凝集が可能であるものの、その後の前核期形成には至らなかった。これらのことから、薬剤活性に作用する卵細胞質内リン酸化酵素が不活性化されている可能性が示された。

(2) マウス卵子を体外で操作する場合、体細胞クローン胚のみならず体外受精由来胚においても系統差も含めその後の発生率が低値になる場合、その要因の一つに活性酸素種(ROS)の過剰産生に伴うミトコンドリア機能の低下が考えられている。先行研究において、NAD⁺の前駆体であるβ-Nicotinamide mononucleotide(β-NMN)を添加することで、ROSの過剰産生を軽減できることを示した(安齋ら、2016)。しかし、DNA修復能を活性化させる卵子細胞質間の相互作用には不明な点が多い。本研究では、細胞活性に必須なNAD⁺消費酵素であるPARP1を阻害する3-Aminobenzamide(3-ABA)を用いて、β-NMNと3-ABAの共添加がマウス体外成熟操作に与える影響を検討した。各濃度の3-ABA添加mTaM培地による体外成熟成績は、10mMおよび30mM添加区において低値を示し、30mM添加区(66%; 33/50)では非添加区(85%; 41/48)と比較し有意に低下した(P<0.05)。次に2mMβ-NMNと30mM3-ABAを共添加したmTaM培地による体外成熟成績を比較した結果、β-NMN非添加区(65%; 40/62)と比較し有意に成熟率が向上することを示した(81%; 50/62., P<0.05)。これらのことから、体外成熟培地への3-ABAの添加によりDNA損傷の蓄積を起こさせるメカニズムを明らかにし、β-NMNを添加することで、NAD⁺の供給を亢進しROSなどのDNA損傷を引き起こす要因の発生を抑制することが示唆された(図5)。これらの知見をまとめ、第69回日本実験動物学会総会(仙台国際センター)へ報告予定である。

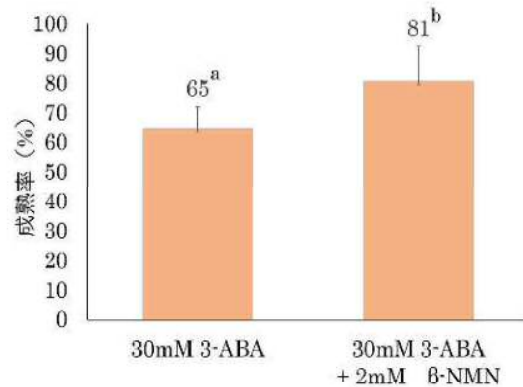


図5. 3-ABA・β-NMN共添加修正TaMによるIVM成績(±SD)

【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

(1) 共同研究機関として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ている。令和3年度は、提供された組織から初代培養細胞の樹立を検討し、3個体から線維芽細胞の樹立に成功した。これら初代培養細胞は、継代培養後に順次凍結保存を実施している。

(2) 幹細胞研究の技術的進歩により、細胞株からの*in vitro*配偶子の生成は個体数が少ない種の保護に対して有用な方法の一つになる可能性がある(Korody *et al.*, 2021)。今回、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(アカネズミ細胞)に初期化因子を導入することでiPS様細胞の樹立を試みた。これまでに、エピソードマルベクターを用いた遺伝子導入条件を検討しており、アカネズミ細胞においてiPS様細胞に特徴的な細胞コロニーの出現を認めた(図6)。現在、再現性を確認するため追加実験の実施を検討しており、同様な細胞コロニーを取得後、細胞の評価方法の確立に向けて検討する。

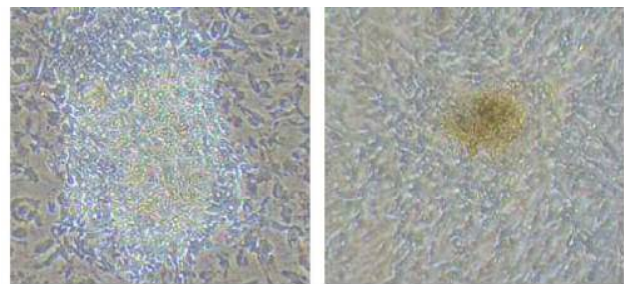


図6. マウス(左)、アカネズミ(右)iPS様細胞コロニー遺伝子導入後、10-15日目の観察像

(3) iPS細胞技術は、体細胞から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。次世代型iPS細胞技術であるRNA transfection技術を用いてアフリカサバンナゾウの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が樹立には至らなかった。現在、維持する培養方法の検討を行っている。

【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) シロオリックス(*Oryx dammah*)は、既に野生下絶滅種に指定されており園館において飼育されている希少な個体である。アドベンチャーワールドよりシロオリックス組織の提供を経て遺伝資源の確保の手段として初代培養を実施し線維芽細胞（体細胞）の樹立に成功した。次に、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技術を開発し、樹立されたシロオリックス由来体細胞を用いて検討したところ、このドナー細胞から初期化誘導が確認され胚性遺伝子の活性化に成功した。これらの研究成果は、*iScience* (Tomikawa *et al.*,2021)に報告した。さらに、この新たな研究手法を開発した宮本圭先生は、国内外に本成果のトピックスについて、国立研究開発法人 科学技術振興機構(JST)等を通じて配信するに至っている。

(2) 絶滅危惧種の体細胞から樹立した iPS 細胞を用いて、発生工学的手法によりその生殖細胞を産生する計画であるが、動物種によって作製される iPS 細胞の未分化性に様々な違いがあることがわかっている。一般的に多能性幹細胞には、発生学的により未分化性の高い「ナイーブ型」と、未分化ではあるが発生状態が進んだ「プライム型」がある。上記の発生工学的手法を取る上で、iPS 細胞の多能性状態をコントロールすることが、その成否を左右すると考えられる。そこで我々は樹立したナイーブ型多能性幹細胞を段階的誘導を用いて高効率にプライム型に移行させる新規の方法を開発した。これらの研究成果は、*Biochemical and Biophysical Research Communications* (Okamura *et al.*, 2021)に報告した。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

令和 3 年度もコロナ禍の影響により共同研究機関等や協力園間への往来や生殖細胞や組織等の授受が極めて困難な状況下でもあったが、共同研究者の協力により幾つかの知見が得られテおり、新年度も情報共有を進めることにしている。また、飼育園館との共同研究についてアドベンチャーワールドの他、海遊館（大阪）と共同研究契約を締結した。今後、オキナワマリナーサーチセンター（沖縄）と飼育下鯨類の繁殖について共同研究申請の締結を進めている。さらに、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、複数機関との共同研究をスタートさせるため諸条件の検討を予定している。

飼育下鯨類の妊孕性に関するバイオマーカーの探索として、イルカ 2 頭の人工授精(AI)前、AI 1 ヶ月後、AI 2 ヶ月後の血清サンプルを使用してプロテオーム解析を実施する。また、妊娠期を含む 2 回以上の採血を行ったウシ 7 頭の血清サンプル(妊娠と非妊娠、または 2 つとも妊娠 14 検体)を使用してメタボローム解析を予定している。

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)
iScience. 24. (103290).	原著論文(査読有)	2021年11月
Biochemical and Biophysical Research Communications. 574:70-77	原著論文(査読有)	2021年8月
近畿大学先端技術総合研究所紀要.27.7-14.	原著論文(査読有)	2022年3月
近畿大学先端技術総合研究所紀要.27.34-39.	研究ノート(査読有)	2022年3月
ニュートンプレス ニュートン別冊 ニュートンムック「近畿大学大解剖 Vol.2」	雑誌	2021年8月
近畿大学先端技術総合研究所オンラインラボ	講演	2021年10月24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（予定）
第 69 回動物園技術者研究会	学会（口頭発表）	2021 年 12 月 4 日
第 55 回日本実験動物技術者協会総会	学会（ポスター発表）	2021 年 10 月 15 日
The 14th Asian Society of Conservation Medicine / 27th Japanese Society of Zoo and Wildlife Medicine 2021 Joint Conference Front line of One Health in Asia	学会（ポスター発表）	2021 年 9 月 23 日
第 164 回日本獣医学会学術集会	学会（口頭発表）	2021 年 9 月 22 日
読売新聞（キングペンギン人工授精 2 羽目 近大などと共同研究）	新聞	2021 年 4 月 29 日
JST Science Japan. The Science News (Kindai University and collaborators develop proof of concept technology for inducing genome reprogramming in wild and extinct animals)	インターネットメディア	2022 年 1 月 13 日
JST 客観日本（中国版近畿大学等成功开发出诱导野生动物和灭绝动物基因组初始化重编程技术）	インターネットメディア	2021 年 11 月 25 日
アドベンチャーワールドプレスリリース（2 年連続キングペンギンの人工授精に成功しました）	インターネットメディア	2021 年 4 月 15 日