

称号及び氏名	博士（獣医学）嶋谷 晋吾
学位授与の日付	平成18年3月31日
論文名	「イヌ ES 様細胞の分離・培養と関連技術の開発に関する研究」
論文審査委員	主査 稲葉 俊夫 副査 馬場 栄一郎 副査 玉田 尋通

論文要旨

緒言

胚性幹細胞（ES 細胞）は、胚盤胞期胚の内部細胞塊から得られる細胞であり、多能性および自己複製能力にすぐれているために、再生医療への応用が期待されている。

イヌ ES 細胞株を樹立できれば、これを目的の細胞に分化させて移植する再生獣医療が可能となり、さらに、病因解明のための遺伝子改変イヌの作製や希少個体のクローン作製へも応用できる。また、再生獣医療によって得られた知見は、ヒトに対する再生医療の実用化を円滑に進め得るものと考えられる。

イヌ ES 細胞株を樹立するには多くの受精卵が必要とされる。一般に、受精卵を得るには自然交配、あるいは人工授精により動物の子宮内から受精卵を得る *in vivo* 法と、卵巣から未成熟な卵子を採取し、体外受精 (IVF) によって受精卵を得る *in vitro* 法が知られている。一方、イヌの発情周期は無発情期の期間が著しく長く、発情の回数は年に 1~2 回ときわめて少ない。また、イヌ科動物の繁殖の仕組みは不明な点も多く、そのために、イヌにおける繁殖の人為的調節法の確立や IVF 技術の開発は他の動物種に比べて著しく遅れている。これらのことから、イヌの受精卵を実験に常時供給することはきわめて困難であり、イヌ ES 細胞株は未だに樹立されていない。

そこで本研究ではイヌにおける ES 細胞株樹立を支える関連技術として、受精卵を供給するために、まず、発情回帰の仕組みの詳細を明らかにし、その知見を応用して発情誘起技術の改良、および体外受精技術の開発を行った。さらに、イヌの受精卵を用いて ES 細胞株を分離・培養する方法を検討した。

第1章 発情周期中のイヌ視床下部、下垂体および卵巣におけるエストロゲンレセプ

ターの発現動態

哺乳動物の繁殖機能は、視床下部—下垂体—性腺軸を中心とした内分泌機構によって調節されており、これらの調節には卵巣から放出されるエストロジェンを含めたステロイドホルモンの関与が言われている。そこで、イヌの発情回帰におけるエストロジェンの関与を明らかにするために、エストロジェンレセプター (ER) α および β の視床下部、下垂体および卵巣内における各発情周期中の発現動態を RT-PCR 法によって調べた。

その結果、視床下部、下垂体の ER α 、ER β および卵巣 ER β の mRNA 発現量は、発情回帰前の無発情期後期から発情前期において増加していた。また、これらのレセプター発現量は、末梢血中 E₂ 濃度と有意な正の相関を示した。

以上の結果から、エストロジェンは視床下部、下垂体および卵巣に作用して、イヌの発情回帰に関与することが示唆された。

第 2 章 GnRH およびエストロジェンの併用投与による雌イヌの繁殖促進

近年、動物愛護の観点から、ヒトの医療と同様に獣医療においても、より苦痛が少なく効果的な治療方法が求められるようになってきている。本章では、第 1 章で得られた知見を応用して、比較的イヌに与える負担が少ないと思われる性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 類似体の徐放剤を用いた経鼻投与とエストロジェンの経口投与と併用することによって、より効果的な発情誘起法の開発を行った。

その結果、無発情期の雌イヌに、GnRH 徐放剤を 1 日 1 回経鼻投与した群では 43% (7 頭中 3 頭) のイヌが発情し、妊娠、出産した。さらに、GnRH の経鼻投与の前にエストラジオール-17 β (E₂) の経口投与を併用すると、71% (7 頭中 5 頭) のイヌが発情し、妊娠、出産した。

以上の結果から、無発情期の雌イヌに GnRH の徐放剤を経鼻投与することで、妊娠可能な発情を誘起することができ、エストロジェンを併用投与することで、さらに効果的に発情を誘起できることが明らかとなった。

第 3 章 イヌ未成熟卵子における体外成熟 (IVM) および体外受精 (IVF)

イヌにおける IVM、IVF の技術は非常に遅れており、その原因の一つとして、イヌ未成熟卵子では IVM の効率が悪いことが挙げられる。そこで本章では、イヌ未成熟卵子における効果的な IVM 方法の開発を目指し、さらに IVF への応用を行うことで *in vitro* による受精卵の作製を試みた。

第 1 節 エストロジェンおよび上皮成長因子 (EGF) の未成熟卵子に及ぼす影響

エストロジェンおよび EGF は卵子の成熟に関与していることが多くの動物種で報告されているが、イヌにおける作用については不明な点が多い。そこで、これらの因子がイヌ未成熟卵子の IVM に及ぼす影響を調べた。

未成熟卵子と卵丘細胞におけるER α 、ER β およびEGFレセプター（EGF-R）のmRNA発現をRT-PCR法によって調べた。その結果、ER β およびEGF-RのmRNA発現が卵子および卵丘細胞の両方に認められた。次に、卵丘細胞の付着した卵子と除去した卵子に分け、E₂ またはEGF を添加した培地で培養後、卵子の成熟率を比較した。その結果、卵丘細胞付着卵子では1 μ g/mlのE₂添加によって、卵核胞崩壊期の割合が有意に増加し、10 ng/mlのEGF添加によって、卵核胞崩壊期および第一減数分裂中期の割合が有意に増加した。

以上の結果から、エストロゲンおよびEGFは卵子と卵丘細胞の相互に働き、卵子の成熟を促進することが示唆された。

第2節 エストロゲンおよびEGFを用いた体外成熟への応用

前節で得られた知見を利用して、卵子のより効果的な体外成熟方法の開発を行った。すなわち、未成熟卵子をM199培地にE₂とEGFの両方を添加した培地、あるいは、M199培地に10%ウシ胎子血清（FBS）、E₂およびEGFを添加した培地で培養し、成熟率をそれぞれ比較した。その結果、E₂とEGF両方の添加だけでは第二減数分裂中期（MII）の割合は増加しないが、FBSをさらに添加することにより、MIIの割合が有意に増加した。

以上の結果から、E₂およびEGFだけではイヌ未成熟卵子のMIIへの発育を促進しないことが明らかとなった。

第3節 共培養法による体外成熟・体外受精の試み

本節では、胎子線維芽細胞を用いたIVMについて検討し、次に、それらを利用したIVFを試みた。その結果、48 あるいは 72 時間培養のそれぞれにおいて、MIIの割合が対照群と比較してマウス胎子線維芽細胞（MEF）、あるいはイヌ胎子線維芽細胞（CEF）を用いた共培養により有意に増加した。また、IVF後の前核形成率は対照群およびMEF群と比較してCEF群では有意に増加した。IVF後の卵子をさらに培養し、胚の発育度合を比較したところ、卵割を起こした割合は対照群と比較してMEF群およびCEF群で有意に増加した。さらに、対照群と比較してMEF群およびCEF群では胚の発育が促進され、CEF群では16細胞期、MEF群では桑実胚までの受精卵を得ることができた。

以上の結果から、胎子線維芽細胞を用いた共培養法は、イヌのIVMを促進し、受精および胚の発育にも効果的であることがわかった。

第4章 イヌES様細胞の分離・培養および特性解析

本章では、イヌ受精卵からのES様細胞の分離・継代方法の検討、特性解析および*in vitro*の分化能を調べた。

雌イヌから各段階の受精卵を回収後、内部細胞塊をMEFと共培養し、ES様細胞の初代コロニーが形成される割合を調べた。その結果、15頭のイヌから80個の受精卵が回収でき、ES様細胞の初代コロニー形成率はそれぞれ桑実胚0%、胚盤胞期胚25.6%、脱出胚盤胞期

胚 67.9%であり、脱出胚盤胞期胚ではその割合は有意に増加していた。得られた細胞は、マウスやヒトの ES 細胞と類似した形態を示した。継代方法を比較すると、コラゲナーゼ処理では 3 代目にはすべてのコロニーが分化・死滅したが、物理的継代では 2 つの cell-line が 8 代目まで未分化な状態を維持できた。これらの細胞の未分化マーカーを調べたところ ALP 活性、Oct-4 および SSEA-1 は陽性であり、一方、SSEA-4 は陰性であった。また、浮遊培養によって胚様体が形成され、さらに培養を続けると嚢胞状胚様体に発達した。胚様体の接着培養により、神経細胞様、上皮細胞様、色素産生細胞様、線維芽細胞様、および拍動する心筋様の細胞群が観察された。

以上の結果から、イヌ脱出胚盤胞期胚から ES 様細胞を効果的に分離・培養することに成功した。さらに、その特性はマウスやヒトの ES 細胞と類似しており、*in vitro* で様々な細胞へ分化できることがわかった。

総括

イヌにおける発情誘起、体外受精および ES 細胞株の樹立について検討し、以下のことを明らかにした。

1. 雌イヌでは、発情開始に先立って血中 E₂濃度が上昇し、それと共に視床下部、下垂体および卵巣における ER mRNA 発現量が増加することが明らかとなった。
2. GnRH とエストロジェンの併用投与により、無発情期の雌イヌを効果的に発情誘起できることが示された。
3. エストロジェンおよび EGF は、イヌ未成熟卵子と卵丘細胞の相互に働き、卵子の成熟を促進するが、MII への発育を促進しないことがわかった。
4. 胎子線維芽細胞を用いた共培養法は効果的に卵子を成熟させ、体外受精および胚の発育にも効果的であることが示された。
5. イヌ脱出胚盤胞期胚から ES 様細胞を効果的に分離・培養することに成功した。さらに、その特性はマウスやヒトの ES 細胞と類似しており、*in vitro* で様々な細胞へ分化できることがわかった。

以上、本研究により、イヌにおける発情誘起や体外受精法の技術を改良し、*in vivo* および *in vitro* の両方で、受精卵を効果的に作製することができた。さらに、イヌ受精卵より分離した内部細胞塊から ES 様細胞を得ることに成功した。今後、これらの技術が再生獣医療へ応用できるものと期待される。

審査結果の要旨

胚性幹細胞 (ES 細胞) は、胚盤胞期胚の内部細胞塊から得られる細胞であり、多能性および自己複製能力にすぐれているために、再生医療への応用が期待されている。

イヌ ES 細胞株を樹立できれば、これを目的の細胞に分化させて移植する再生獣医療が可能となり、さらに、病因解明のための遺伝子改変イヌの作製や希少個体のクローン作製へも応用できる。また、再生獣医療によって得られた知見は、ヒトに対する再生医療の実用化を円滑に進め得るものと考えられる。

イヌ ES 細胞株を樹立するには多くの受精卵が必要とされる。一般に、受精卵を得るには自然交配、あるいは人工授精により動物の子宮内から受精卵を得る *in vivo* 法と、卵巣から未成熟な卵子を採取し、体外受精によって受精卵を得る *in vitro* 法が知られている。一方、イヌの発情周期は無発情期の期間が著しく長く、発情の回数は年に 1~2 回ときわめて少ない。また、イヌ科動物の繁殖の仕組みは不明な点も多く、そのために、イヌにおける繁殖の人為的調節法の確立や体外受精技術の開発は他の家畜や実験動物に比べて著しく遅れている。これらのことから、イヌの受精卵を実験に常時供給することはきわめて困難であり、イヌ ES 細胞株は未だに樹立されていない。

そこで本研究では、イヌにおける ES 細胞株樹立を支える関連技術として、受精卵を供給するために、まず、発情回帰の仕組みの詳細を明らかにし、その知見を応用して発情誘起技術の改良、および体外受精技術の開発を行った。さらに、イヌの受精卵を用いて ES 細胞株を分離・培養する方法を検討した。得られた成果を要約すると以下ようになる。

1. 雌イヌでは、発情開始に先立って血中エストラジオール-17 β 濃度が上昇し、それと共に視床下部、下垂体および卵巣におけるエストロゲンレセプター遺伝子の発現量が増加することが明らかとなった。
2. 性腺刺激ホルモン放出ホルモンとエストロジェンの併用投与により、無発情期の雌イヌを効果的に発情誘起できることが示された。
3. エストロゲンおよび上皮成長因子は、イヌ未成熟卵子と卵丘細胞の相互に働き、卵子の成熟を促進するが、第二減数分裂中期への発育を促進しないことがわかった。
4. 胎子線維芽細胞を用いた共培養法は効果的に卵子を成熟させ、体外受精および胚の発育にも効果的であることが示された。
5. イヌ脱出胚盤胞期胚から ES 様細胞を効果的に分離・培養することに成功した。さらに、その特性はマウスやヒトの ES 細胞と類似しており、*in vitro* で様々な細胞へ分化できることがわかった。

以上のように本研究では、イヌにおける発情誘起や体外受精法に関する一連の技術開発により、受精卵を効果的に作製することができ、さらに、イヌ受精卵より分離した内部細胞塊から ES 様細胞を得ることに成功した。これらの研究成果は、獣医繁殖学や再生医学の発展に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。