

称号及び氏名	博士（獣医学）	吉田 拓海
学位授与の日付	2025年3月31日	
論文名	ネコ科動物の保全に向けた体外胚生産法の改良とネコ胚性幹（ES）細胞に関する研究	
論文審査委員	主査	鳩谷 晋吾
	副査	川手 憲俊
	副査	金子 武人

論文要旨

緒言

現在、絶滅の危機にあるネコ科動物の個体数回復を目的として、唯一絶滅の恐れがないイエネコ（ネコ）をモデルに体外胚生産に関する研究が進められている。

一般に、体外胚生産にはマルチガスインキュベーターが用いられ、卵子や胚の操作が必要となる。ヒトでは専門施設で胚培養士が実施するため安定した胚生産が可能である。一方ネコ科動物では、多くが野生下で生息するため、大掛かりな設備や胚培養士の確保が難しく、体外胚生産の実用化に対する障害となっている。

ネコの体外胚生産では、生体内での胚発生と比較して胚盤胞形成率が低く、胚盤胞への発生に要する日数も長い。また、他の哺乳動物の体外胚生産と比較しても胚盤胞形成率が低く、品質の指標となる胚盤胞細胞数も少ない。そのため高効率かつ高品質な胚盤胞の作製に向け、体外胚生産法の改良が求められている。

ネコ科動物では精子や卵子の採取機会は少なく、生殖細胞の不足が課題である。ヒトやマウスでは多能性幹細胞から生殖細胞を作製する *in vitro* gametogenesis 研究が行われている。ネコ科動物における *in vitro* gametogenesis 研究の基盤として、多能性幹細胞であるネコ胚性幹（ES）細胞の作製が求められているが、細胞株の樹立には至っていない。

そこで本研究では、野生ネコ科動物の保全に向けた体外胚生産技術を確立することを目的として、1) ネコ体外胚生産技術の簡易化を試みるとともに、2) 卵管液類似の胚培養液を用いて高品質胚を高効率に作製する検討を行った。さらに、3) 体外胚生産により作製した胚盤胞からネコ ES 細胞株の樹立を試みた。

第一章 体外胚生産法の簡易化に関する検討

第一節 簡易的設備での体外胚生産法の確立

ウシやマウスでは恒温水槽による温度管理下や、脱酸素剤による気相管理下で、胚盤胞の作製が可能である。また、気相調整剤であるアネロパックは、ネコ体外胚生産の気相条件と類似した環境を再現可能である。そこで本節では、恒温水槽とアネロパックを用いた簡易的な設備での体外胚生産法について検討した。

ネコ卵巣から未成熟卵子を採取し、ランダムに conventional 群、gas 群、gas-temp 群に振り分け、体外成熟 (IVM) に供した。conventional 群では温度と気相の管理にマルチガスインキュベーターを用いた。gas 群では温度管理をインキュベーター、気相管理をアネロパック CO₂ で行った。gas-temp 群では温度と気相の管理に恒温水槽とアネロパック CO₂ を用いた。IVM 後、gas 群と gas-temp 群において、conventional 群と同程度の核成熟率が得られた。

次に、ネコ精巣から採取した精子と IVM 後のネコ卵子を用いて、各群 IVM と同様の温度・気相の管理法で、体外受精 (IVF)、体外培養 (IVC) を実施した。なお、IVC ではアネロパック CO₂ をアネロパック微好気に置換した。IVC 後に胚盤胞の形成率および細胞数を比較した。その結果、gas 群と gas-temp 群において、conventional 群と同程度の胚盤胞形成率および細胞数が得られた。

以上より、恒温水槽とアネロパックにより温度・気相の管理を行うことで、簡易的設備での体外胚生産が可能であると明らかになった。

第二節 簡易的操作での体外胚生産法に関する検討

マウスでは、チューブ内での IVC により、胚盤胞を作製可能である。マイクロピペットを用いてチューブ内の培地交換を行い、IVM、IVF、IVC を実施可能となれば、困難な胚操作が不要になる。そこで本節では、チューブとマイクロピペットを用いる簡易的な操作での体外胚生産について検討した。

ネコ未成熟卵子を、ランダムに drop 群、3D-drop 群、round tube 群、3D-round tube 群、flat tube 群に振り分け、マルチガスインキュベーターでの温度・気相管理のもと、IVM に供した。drop 群および 3D-drop 群では、それぞれ 100 μ l の IVM 培地あるいは 3D-IVM 培地の drop 中で IVM を実施した。round tube 群および 3D-round tube 群では丸底チューブ、flat tube 群では平底チューブを用いて、100 μ l の IVM 培地あるいは 3D-IVM 培地中で IVM を実施した。その結果、drop 群と比較して round tube 群で有意に核成熟率が低かった。一方、3D-drop 群、3D-round tube 群、flat tube 群は drop 群と同程度の核成熟率を示した。

次に、ネコ精子と IVM 後のネコ卵子を用いて、各群 IVM と同様の方法で、IVF および IVC を実施した。drop 群および 3D-drop 群はガラスピペットによる胚操作を行い、round tube 群、3D-round tube 群、flat tube 群はマイクロピペットで培地交換した。IVC 後に胚盤胞形成率を比較すると、drop 群と round tube 群でのみ胚盤胞の形成が認められ、drop 群と比べて、すべての群で胚盤胞形成率は有意に低下した。さらに、精子の運動速度を解析すると、IVF 培地中と比べ、3D-IVF 培地中で精子の運動速度が有意に低かった。

以上より、3D-drop 群、3D-round tube 群、flat tube 群での IVM が可能であった。しかし、チューブとマイクロピペットを用いた簡易法では、安定した胚盤胞の形成は困難であった。

第二章 ヒト卵管液組成を模倣した胚培養液によるネコ体外胚生産の検討

ヒトでは卵管液組成を模倣した HiGROW OVIT 培地を IVC に用いることで、胚盤胞形成率が高くなる。また、ヒトとネコの卵管液は、互いに組成が類似している。そこで、ネコでも HiGROW OVIT 培地を IVC に用いることで、高効率かつ高品質な胚盤胞の作製が可能か検討した。

ネコ未成熟卵子をマルチガスインキュベーターでの drop 法による IVM および IVF に供した。さらに IVF 後の受精卵をランダムに control 群、Hi+BSA 群、Hi+FBS 群、Hi+BSA/FBS 群に振り分け、IVC を行なった。control 群は IVC I 培地 (Only-One 培地+BSA) で 2 日間、さらに IVC II 培地 (Only-One 培地+FBS) で 6 日間培養した。Hi+BSA 群および Hi+FBS 群は、それぞれ Hi+BSA 培地 (HiGROW OVIT 培地+BSA)、Hi+FBS 培地 (HiGROW OVIT 培地+FBS) で 8 日間培養した。Hi+BSA/FBS 群は、Hi+BSA 培地で 2 日間、さらに Hi+FBS 培地を用いて 6 日間培養した。8 日間の IVC 後、胚盤胞の形成率および細胞数を比較した。その結果、control 群と比較して HiGROW OVIT 培地を用いた全群で有意に胚盤胞形成率が高く、胚盤胞細胞数が多かった。

以上より、基礎培地に HiGROW OVIT 培地を用いることで、高効率かつ高品質な胚盤胞の作製が可能となった。

第三章 体外胚生産由来胚盤胞を用いたネコ ES 細胞株の樹立

ES 細胞は、胚盤胞の内部細胞塊から分離・培養することで樹立可能な多能性幹細胞である。これまでもネコ ES 細胞の作製が試みられているが、細胞株の樹立には至っていない。そこで本研究では、体外胚生産由来胚盤胞から内部細胞塊を分離後、ヒト多能性幹細胞用培地である StemFit AK02N 培地でマウス胎子線維芽細胞 (MEF) と共培養し、ネコ ES 細胞株の樹立を試みた。

はじめに、体外胚生産により 3 つのネコ胚盤胞を作製した。それぞれの胚盤胞から内部細胞塊を分離後、MEF 上に播種し、StemFit AK02N 培地で培養した。その結果、ヒト ES 細胞と類似した形態的特徴を示す 3 つの細胞株が得られた。これらの細胞株は、アルカリフォスファターゼ染色に陽性を示した。また qPCR、免疫染色およびフローサイトメトリーで未分化マーカーの発現が認められた。さらに、これらの細胞株を分化培地中で浮遊培養し、胚様体を作製した。この胚様体の qPCR および免疫染色により、三胚葉それぞれのマーカー発現が認められた。一方、3 つの細胞株を免疫不全マウスの精巣皮膜下に移植すると、腫瘍を形成し、病理学的評価より、三胚葉組織を含むテラトーマであることが明らかとなった。また、核型解析では 3 株ともに正常核型を有していた。これらのことから、3 つの細胞株は、未分化性、*in vitro* および *in vivo* における多能性、核型正常性を有することが示された。

以上より、体外胚生産由来胚盤胞の内部細胞塊を分離し、StemFit AK02N 培地を用いて MEF と共培養することで、ネコ ES 細胞株を樹立することができた。今後、ネコ ES

細胞から生殖細胞への分化誘導法を検討することで、ネコ科動物における *in vitro* gametogenesis 研究への応用が期待できる。

統括

1. 恒温水槽とアネロパックを用いて温度・気相の管理を行うことで、簡易的な設備でのネコ体外胚生産が可能である。
2. round tube と 3D-IVM 培地、flat tube と IVM 培地の組み合わせでネコ IVM が可能であったが、安定した胚盤胞の形成は認められなかった。
3. 基礎培地として HiGROW OVIT 培地を用いることで、高効率かつ高品質な胚盤胞の作製が可能となった。
4. 体外胚生産由来ネコ胚盤胞から、未分化性・多能性・核型正常性を有するネコ ES 細胞株を樹立することができた。

審査結果の要旨

現在、多くのネコ科動物が絶滅の危機にある。これらの個体数回復を目的として、イエネコ（ネコ）をモデルに体外胚生産に関する研究が進められている。体外胚生産はマルチガスインキュベーターを使用し、卵子や胚の操作が必要となる。しかし、多くのネコ科動物は野生下で生息しており、大掛かりな設備や胚培養士の確保が難しく、体外胚生産の実用化に対する障害となっている。また、ネコの体外胚生産は、胚盤胞形成率が低く、得られる胚盤胞も低品質であり、他の動物種と比べると胚移植後の成功率が低い。さらに、野生下に生息するネコ科動物では精子や卵子の採取機会は少なく、生殖細胞の不足が課題である。ヒトやマウスでは多能性幹細胞から生殖細胞を作製する *in vitro* gametogenesis 研究が行われており、ネコ科動物における *in vitro* gametogenesis 研究の基盤として、多能性幹細胞であるネコ胚性幹（ES）細胞の作製が求められているが、細胞株の樹立には至っていない。本研究では、簡易的な設備および操作で実施可能な体外胚生産法および高効率かつ高品質な胚盤胞を作製可能な体外胚生産法について検討するとともに、体外胚生産により作製した胚盤胞からネコ ES 細胞株の樹立を試みている。

第1章では、ネコの体外胚生産法の簡易化について検討している。申請者は、ネコ卵巣から未成熟卵子を採取し、マルチガスインキュベーターの代わりに、温度管理をインキュベーターあるいは恒温水槽、気相管理をアネロパックで行い、体外成熟（IVM）、体外受精（IVF）、体外培養（IVC）を実施した。その結果、IVM 後、マルチガスインキュベーターと同程度の核成熟率が得られている。さらに、IVC 後も通常の方法と同程度の胚盤胞形成率および細胞数が得られることを示している。すなわち、恒温水槽とアネロパックで温度・気相の管理を行う簡易設備での体外胚生産が可能であることを明らかにしている。申請者は、チューブとマイクロピペットを用いる簡易的な操作での体外胚生産についても検討している。その結果、3D 培地と丸底チューブを用い

た 3D-round tube 群および 2D 培地と平底チューブを用いた flat tube 群で IVM が実施可能であることを示している。一方、IVC 後に 3D-round tube 群と flat tube 群のいずれでも胚盤胞の形成は認められなかった原因として 3D-round tube 群では培地の 3D 化により精子の運動性が低下し、受精が成立しなかったと推測しており、flat tube 群における精子濃度の検討により、簡易的な操作で体外胚生産を実施可能であると結論づけている。これらの研究成果から、今後、設備や技術に依存しない簡易的体外胚生産法の確立が期待できる。

第 2 章では、ヒトの卵管液組成を模倣した HiGROW OVIT 培地 (Hi) をネコの IVC に応用することで、高効率かつ高品質な胚盤胞の作製が可能か検討している。申請者は、ネコ未成熟卵子を IVM および IVF 後、受精卵を Hi+BSA 群、Hi+FBS 群、Hi+BSA/FBS 群に振り分け、IVC を行った。その結果、control 群と比較して HiGROW OVIT 培地を用いた全群で有意に胚盤胞形成率が高く、胚盤胞細胞数が増えることを示した。すなわち、ネコ IVC において HiGROW OVIT 培地を基礎培地とすることで、高効率かつ高品質な胚盤胞の作製が可能となることを明らかにしており、本研究での成果は、今後のネコ科動物における体外胚生産研究の発展および普及に寄与すると期待できる。

第 3 章では、ネコの体外胚生産由来胚盤胞から内部細胞塊を分離して、ES 細胞の作製を試みている。その結果、ヒト ES 細胞と類似した形態的特徴を示す 3 つの ES 細胞株が得られている。これらの細胞株は、未分化マーカーの発現や内胚葉、中胚葉、外胚葉に分化する多分化能を有し、正常核型を保持していることが示されており、ネコ ES 細胞株の作製に成功したことを明らかにしている。本研究成果を基に今後は、ネコ ES 細胞から生殖細胞への分化誘導法を検討することで、ネコ科動物における *in vitro* gametogenesis 研究への応用が期待できる。

以上のように本研究では、簡易的な設備および技術でのネコ体外胚生産法を発展させると共に、受精卵の培養方法を改善することで高効率かつ高品質な胚盤胞の作製が可能となっている。さらに、世界で初めて未分化性、多能性、核型正常性を有するネコ ES 細胞株の樹立に成功している。これらの研究成果は、ネコ科動物種の保存に有用であるだけでなく、繁殖学および生殖医学の新たな展開に資するものである。さらに、ネコ ES 細胞株の作製は小動物医療の発展にも有用であることから、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。