新規カニクイザル胚性幹（ES）細胞株の樹立と神経系細胞への分化誘導

2014

筑波大学

羽　鳥　真　功

目次

1. 概要 P. 5

2. 緒言 P. 8

2-1. 多能性幹細胞とES細胞

2-2. 霊長類由来ES細胞

2-3. ES細胞における神経系細胞への分化誘導

3. 方法および材料 P. 14

3-1. 実験動物

3-2. カニクイザル卵子の採取

3-3. 顕微授精による授精卵の作出

3-4. ES細胞の培養

3-5. 特性解析

3-5-1. 染色体分析

3-5-2. ALP 染色

3-5-3. 免疫蛍光抗体染色

3-5-4. EB の形成

3-5-5. テラトーマ形成と組織学的解析

3-6. 神経系細胞への分化誘導

3-6-1. EB 形成と接着培養

3-6-2. レチノイン酸の添加

3-6-3. FGF2の添加

3-6-4. 免疫蛍光抗体染色

3-7. 統計処理

4. 結果 P. 25

4-1. 受精卵の調整からES様細胞の培養

4-2. 特性解析

4-3. 神経系細胞への分化誘導

5. 考察 P. 32

5-1. カニクイザルにおける生殖基盤技術

5-2. FGF2低依存性ES細胞の樹立

5-3. Fld-ES細胞の神経系細胞への分化誘導

6. 参考文献 P. 39

7. 謝辞 P. 57

8. 図表 P. 58

1．概要

目的　：　胚性幹（embryonic stem : ES）細胞は、未分化性と分化多能性を併せ持ち、再生治療や発生学研究の貴重なバイオリソースとして期待されている。特に、再生医療への応用にあたっては、ヒトと同じ霊長類であるサル類を用いた安全性試験や前臨床試験が不可欠であり、サル類由来のES細胞株の有用性は高い。しかしながら、ES細胞は動物種や細胞株による特性の違いもあり、それぞれのES細胞株の特定組織への分化誘導についての情報は十分とは言えない。ヒトを含む霊長類ES細胞において、fibroblast growth factor 2（FGF2）はES細胞の自己複製能を促進する効果を示すが、マウスES細胞ではFGF2単独で、ヒトES細胞では他の分化誘導因子と共同で、神経幹細胞への分化誘導にも効果を示す。本研究では、再生医療研究に有用な新規のカニクイザル由来ES細胞、特にFGF2低依存性のES細胞株を樹立して、神経系細胞への分化誘導に関する基本的な特性を明らかにすることを目的とした。

対象と方法　：　ES細胞樹立のために使用した受精卵は、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて飼育されている雌性カニクイザルへ卵胞発育誘起を施し採取した未受精卵と同じく雄性カニクイザルより採取した新鮮精子を用いて顕微授精（ICSI）を行い作出した。

作出した受精卵を成熟培養し、得られた胚盤胞期胚から内部細胞塊（ICM）を採取し、フィーダー細胞上で培養を行った。樹立した細胞株のES細胞としての特性評価は、染色体分析による正常性の維持、未分化マーカーの発現解析、テラトーマ形成および組織学解析等により行った。

結果　：　はじめにカニクイザルにおける過排卵処理について検討し、25 IU/kg hFSHを24時間ごとに9回皮下投与することで卵胞発育を促進し、36時間後にhCGで排卵誘起する方法により多数の卵子を獲得し、これらの卵子を顕微授精（ICSI）により効率よく受精卵を作出することができた。

次に、上記方法により得たカニクイザル受精卵を成熟培養し、得られた胚盤胞期胚からICMを採取し、フィーダー細胞上で培養を行った。その結果、FGF2およびhuman LIF、2-MEを含むES細胞培養液で維持培養を行った後、ES様細胞のコロニーをFGF2とhuman LIF、2-MEを除いた改変ES（m-ES）細胞培養液の培養環境下へ継代操作を行うことで、FGF2の添加を必要としないカニクイザルES様細胞を得た。このES様細胞の生理生化学的特性を検証するため、核型の正常性、細胞の未分化性および分化多能性の解析を行った。その結果、当該細胞は正常な染色体（42本）とXY性染色体を保有することを確認した。また、未分化性の指標としてアルカリフォスファターゼ（ALP）染色によるALPの発現および免疫蛍光抗体染色法による未分化マーカーの発現状況を検討した結果、当該ES様細胞においてALPの発現が観察され、Oct-3/4、SSEA-4、TRA-1-60およびTRA-1-81の陽性細胞が認められた。続いて、embryoid body（EB）形成能およびテラトーマ形成能を検討した。その結果、EB形成能を有することが明らかとなった。また、ES様細胞を接種した免疫不全マウスに形成された腫瘤を組織学的に解析したところ、三胚葉組織を含むテラトーマであることが確認され、当該細胞の分化多能性も確認された。これらの結果より、FGF2非添加の培養条件で獲得した新規カニクイザルES様細胞は従来の霊長類ES細胞と同様の未分化性および分化多能性を示し、FGF2低依存性カニクイザルES細胞株（Fld-ES細胞）を新規に樹立することができた。

Fld-ES細胞は1 μM RAを添加した培養条件下で神経線維状の構造が観察され、免疫蛍光抗体染色により神経細胞特異的マーカーの発現が確認された。さらに、1 μM RAと10 ng/ml FGF2を添加した培養条件下で、免疫蛍光抗体染色によりアストロサイト特異的マーカーの発現が認められた。

考察　：　本研究において、カニクイザルES細胞の樹立に必要なカニクイザル受精卵の効率的な作成法を確立した。また、新規に樹立したカニクイザルES細胞、Fld-ES株は正常な核型を保有し、FGF2に依存することなく未分化性を維持し、分化多能性を持つことが明らかとなった。また、RAの添加により神経系細胞への分化誘導が可能であり、RAとFGF2の添加によりアストロサイトへの分化誘導が可能であることが明らかとなった。しかし、本研究における分化誘導法ではオリゴデンドロサイトへの分化誘導は認められず、全ての神経系細胞への分化誘導にはさらに多くの分化誘導因子の添加や長期間培養の検討が必要と考えられた。

結論　：　本研究において新規に樹立されたFGF2低依存性のカニクイザルES細胞株Fld-ES細胞株は、神経系細胞である神経細胞やアストロサイトへの分化誘導が可能であり、再生医療研究や発生学研究に利用可能な霊長類由来ES細胞株として有用であると考えられる。

2. 緒言

2-1. 多能性幹細胞とES細胞

多能性幹（pluripotent stem）細胞は、細胞分裂により母細胞と同じ性質を維持している娘細胞を作り出し、際限なく増殖することができる能力（未分化性）と、元の細胞とは異なる各種の多様な体細胞に分化する能力（分化多能性）を併せ持っている。すなわち、多能性幹細胞から全く同じ遺伝子背景を持つ2つの細胞を生み出し、その片方の細胞を未分化の性質を維持したまま増殖させ、もう一方を様々な種類の細胞に分化させるという現象を無限に繰り返すことが可能である。多能性幹細胞には、受精卵から得られる胚性幹（embryonic stem : ES）細胞、分化した体細胞に遺伝子などを導入させて多能性を誘導した人工多能性幹（induced pluripotent stem : iPS）細胞、成体内の多くの組織で死滅した細胞を補充するために極わずかながら分化を完了せずに存在する成体幹細胞といった3種類の幹細胞があり、再生治療や発生学研究の貴重な資源として期待されている。

この多能性幹細胞の中でも、ES細胞は受精卵の細胞分裂の初期に生じた数百個の細胞からなる胚盤胞期胚の内側の細胞である内部細胞塊（inner cell mass : ICM）を培養することで未分化性を維持したまま増殖が可能であり、胎盤などの胚体外組織を除くすべての種類の細胞に分化することができる多能性を有しており、特にマウスやラットでは生殖系列の細胞への分化も確認されている。1981年にマウス[1,2]、1998年にヒトES細胞が初めて樹立され[3]、任意の臓器や組織への分化を誘導する再生医療のための研究が進められてきた。一方で、ヒトES細胞を樹立するには「生命の萌芽」であるヒト受精卵を使用しなければならず、倫理的な問題点を抱えている。また、ES細胞を再生医療に応用するためには、まずES細胞を分化させなくてはならず、その上で、分

化した細胞を選択後、移植することになる。しかしながら、移植を受ける患者の主要組織適合抗原（major histocompatibility complex : MHC）がES細胞の材料となった受精卵とで異なることが推測され、移植しても拒絶されてしまうという問題がある。これらの問題を解決するために、2006年にYamanakaら[4]はマウス胎児由来線維芽細胞に4つの遺伝子（Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4）を導入することでES細胞と同様の分化多能性を有するマウスiPS細胞を樹立し、2007年に同じくYamanakaら[5]はヒトiPS細胞を樹立した。これにより、ヒトES細胞の樹立の際に生じる倫理的問題や、再生治療に使用する際に起こる拒絶反応の問題を解決できることから、ES細胞に代わる細胞として大きな注目と期待を集め、研究が進められている。

しかしながら、iPS細胞の研究はES細胞の研究と密接に関連しており、未分化性維持や分化誘導等のメカニズムには多くの共通点が存在する。現に、iPS細胞の作出の経緯には、ES細胞で特異的に発現し万能性の維持に重要と考えられる因子を中心に24の候補遺伝子を見出し、さらに前述した4つの遺伝子に絞り込み、それらを体細胞に導入することで作製されたという事実がある。これらのことからも、ES細胞およびiPS細胞を再生医療研究の資源として、比較研究はもちろん、同時進行での基礎研究が必要不可欠であると考えられる。

また問題点の一つとして、多能性幹細胞は由来となる動物種、個体、組織、培養方法の違いなどにより樹立したそれぞれの細胞株において異なる特性を有することが知られている[6-11]。例えば、ES細胞株によりテラトーマ形成能、DNAのメチル化部位、ゲノムインプリンティングの状態などの特性が異なることが報告されている[12-15]。これらのことから、樹立したそれぞれの多能性幹細胞株の特性を正しく解析し理解することは、再生医療研究の推進に大きく寄与するものと考えられる。

2-2. 霊長類由来ES細胞

霊長類ES細胞は、1998年のヒトES細胞の樹立に先立ち、1995年にはThomsonら[16]によってアカゲザル（*Macaca mulatta*）から、1996年にはコモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）から[17]それぞれのES細胞が樹立された。また、2001年にはSuemoriら[18]によりカニクイザル（*Macaca fascicularis*）から、2010年にはShimozawaら[19]によりアフリカミドリザル（*Cercopithecus aethiops*）からそれぞれのES細胞株が樹立された。ヒトES細胞に加えて、これらのサル類のES細胞を樹立することは再生医療への基礎研究を発展させる上でその意義は大きく、それぞれのES細胞株の特性解明は極めて重要である[20-22]。サル類はヒトと同じ霊長類であり、その解剖、生理などヒトに類似するところが多く、安全性試験や前臨床試験を含めたヒトへの応用を視野に入れた医科学実験に適した動物といえる[23]。

様々な実験動物の中でもマウスやラットなどのげっ歯類は、ハンドリングの容易さ、遺伝的均質性や遺伝子改変技術、世代時間の短さや多頭飼育が可能なことなど、医学研究への利用の上で有利な点が多く、ヒトの各種疾患モデル動物の開発も進められている。一方、サル類は寿命が長く長寿科学研究が可能であり、また脳神経、心理、行動など高次脳機能を有しているサル類でなければできない研究領域は少なくない[23]。再生医療研究では、脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy : SMA）筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis : ALS）、家族性自律神経失調症（familial dysautonomia : FD）など神経変性疾患の治療に期待が寄せられているが、これらの前臨床試験としてサル類の利用は必須であり、その基礎となるサル類の幹細胞研究は不可欠である。

また、近年の研究より、ヒトを含めた霊長類ES細胞はマウスES細胞と異なる性質をもつことが明らかにされつつある。マウスもヒトもES細胞の樹立の過程において全く同様のプロセスを経ているにもかかわらず、マウスES細胞ではフィーダー細胞上

で立体的に増殖しドーム状に隆起するコロニーを形成するのに対し、ヒトを含めた霊長類ES細胞は二次元的に細胞が増殖し、平坦なコロニー形態を示す。さらに、マウスとヒトを含む霊長類とではそれぞれのES細胞の自己複製メカニズムに違いがあることが報告されている[24-30]。マウスES細胞では、LIF（leukemia inhibitory factor）により制御されるJak/STAT3シグナル伝達経路を介して自己複製が促進され、未分化性が維持される[31-34]。一方、ヒトを含む霊長類のES細胞ではFGF2（fibroblast growth factor 2）により活性化されるTGF-β/Activin/Nodalシグナル伝達経路を介して自己複製が促進され、未分化状態が維持される[26,27,35-37]。また、霊長類ES細胞において未分化性を維持したまま培養するにはMEF、STO細胞株などのフィーダー細胞の存在が不可欠であり、これらの細胞からは微量のFGF2が分泌されているという報告がある[26,27,38-40]。コロニー形態を含む霊長類ES細胞のもつ特性は、マウスにおいて発生段階が少し進んだ着床後5.75日齢の胚より樹立された多能性幹細胞、エピブラスト幹細胞（epiblast stem cell：EpiSC）と非常に酷似しており、マウスEpiSCも霊長類ES細胞と同様にその自己複製がFGF2の添加を起点とするTGF-β/Activin/Nodalシグナル伝達経路を介して促進されるという報告がある[41-46]。これらの未分化性維持に寄与しているシグナル伝達経路の違いにより、マウスES細胞型の分化多能性の状態をナイーブ型多能性（naïve pluripotency）、マウスEpiSC型の分化多能性の状態をプライム型多能性（primed pluripotency）と分類されるようになり[47-49]、これによればヒトES細胞はプライム型多能性幹細胞に分類される。現在、この分類は多能性幹細胞の性質による分類として普及しつつある。このようにマウスES細胞と霊長類ES細胞とでは明らかに特性が異なる部分があることが示されており、ヒトと同じシグナル伝達経路を有していると推測されるサル類ES細胞の研究を進展させる意義は大きい。

一方、霊長類の発生生殖学的な特性解明や基盤技術の開発が進められているが、

ES 細胞樹立の前段階として効率的に正常な受精卵を獲得することでは、マウスに比較して霊長類では大きく立ち遅れている。特に、霊長類に含まれる多様なサル種間でも生殖生理の差異があり[50-54]、卵胞成熟や排卵誘起を制御する外因性ホルモンによる過剰排卵誘起法は動物種ごとに異なる方法がとられている[55-59]。霊長類を用いる再生医療研究の推進には、霊長類の生殖生理学や発生生殖学的な技術開発も併せて進める必要がある。

2-3. ES細胞における神経系細胞への分化誘導

ES 細胞における神経系細胞の分化誘導方法に関して、マウス ES 細胞では Okano and Temple（2009）により embryoid bodies（EBs）形成を介して低濃度のレチノイン酸（retinoic asid : RA）および FGF2 の段階的添加により神経系細胞へと分化誘導する方法が確立された[60]。霊長類 ES 細胞の神経系細胞への分化誘導因子として、RA、FGF2、epidermal growth factor（EGF）、platelet-derived growth factor（PDNF） sonic hedgehog（SHH）、SB431542、dorsomorphin、Noggin などが併用して用いられている[61-77]。これらの因子の中でも特に RA は RAR/RXR(retinoic acid receptor / retinoid X receptor)を介して Wnt シグナル伝達および Nodal シグナル伝達系を阻害することで中胚葉および内胚葉への分化を抑制し、分化誘導の極めて初期の段階において分化の方向性を外胚葉へと絞り込む役割を果たしており[66]、ヒト ES 細胞においても同様の効果が報告されている[61,71]。これらのことからも、マウスおよびヒト ES 細胞の神経系細胞への分化誘導において極めて初期の段階で RA の添加が行われており、神経系細胞への初期分化を効率的に行うためにその存在の重要性が示されている。さらに、FGF2 はマウス ES 細胞では単独で、ヒト ES 細胞では他の分化誘導因子と併用することで、神経幹細胞への分化誘導に効果を示している[64]。しかしながら、FGF2 を起点

とするその作用はAKTシグナル伝達経路やERK/MAPKシグナル伝達経路など多岐に渡っており、神経系細胞への分化に寄与するシグナル伝達経路やそれに付随する効果が明らかになっていない。一方で、FGF2はヒトES細胞ではTGF-β /Activin/Nodalシグナル伝達経路を介して、ES細胞の自己複製能を促進するという報告がある[26,27,44,45]。これらのことから、未分化性維持と分化誘導という相反する事象の中で、FGF2がES細胞においてどのような影響を与えているのかを検証することが、FGF2の役割を明確にする手がかりになると考えられる。そのためには、まずFGF2を添加しない培養環境下での未分化性の維持が可能な霊長類ES細胞が必要であり、FGF2非依存性もしくは低依存性のES細胞を用いることで、FGF2による分化誘導の効果を明らかにすることができる。そして、マウスES細胞と同様に、霊長類ES細胞においてもRA単独およびFGF2との併用という分化誘導因子を絞り込んだ条件において示す効果の検証が重要である。

本研究において、筆者はFGF2の添加を必要としない培養環境下で未分化性の維持が可能なカニクイザルES細胞の樹立を主目的として、カニクイザルの卵胞発育誘起方法の検討、顕微授精による受精卵の作出、FGF2非添加環境下でのES細胞の樹立を行い、新規に樹立したES細胞の生理生化学的な特性解析およびRA、FGF2添加による神経系細胞分化への影響の検証を実施した。

3. 材料および方法

3-1. 実験動物

ES 細胞樹立に使用した受精卵は成熟した雌性カニクイザルより採取した成熟卵子より作出し、当該カニクイザルは独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて飼育された。飼育は同センターの標準的飼育管理法[23,78]に従い、具体的には毎日 100 g のリンゴおよび 70 g のペレット飼料（Type AS, Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo, Japan）を与え、照明（12 時間明暗期）、室温（25 ± 2 °C）、湿度（60 ± 5%）、換気（毎時 12 回）の環境下で、専任の飼育担当者により管理された。これらの個体には獣医学的な健康管理が実施され、特記すべき疾患が認められない健康な成熟雌個体 16 頭および成熟雄個体 2 頭を使用した（Fig. 1）。

また、フィーダー細胞の調整のために ICR マウス（Crl:CD1(ICR), Charles River Japan, Kanagawa, Japan）、樹立した ES 様細胞の多能性の評価を行うために重度免疫不全マウス（NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J, Charles River Japan）を購入し、上記センターのマウス飼育室において飼育した。これらの実験動物の管理および動物実験の実施については、関連法令や指針、および独立行政法人医薬基盤研究所の規程に則り、動物実験委員会による審査、承認を経て実施した。

3-2. カニクイザル卵子の採取

卵子は過剰排卵処理した成熟した雌性カニクイザルより採取した。過剰排卵処理は、既報に準じ[79]、以下に詳述する 3 種の方法（Fig. 2）により実施した。

まず、すべての方法において、月経を確認した翌日（性周期 1 日目）に性腺刺激ホルモン放出ホルモン（gonadotropin-releasing hormone : GnRH）アゴニスト（GnRHa）

であるリュープロレリン酢酸塩（Leuplin, Takeda Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan）を 3.75 mg 皮下投与した。GnRH アゴニストにより下垂体からの黄体形成ホルモン（luteinizing hormone : LH）の分泌を抑制し、偽閉経の状態を誘導した。その後、採卵のタイミングから逆算し、それぞれの過剰排卵処理の開始日を決定した。3 種の方法は、主として使用したホルモン製剤およびその接種間隔の違いによるものであり、それぞれの方法による成熟卵子の採取率、顕微受精率を比較した。

1 つ目の方法（Method A）では、グリセロールと生理食塩水の混合溶液（1：1）を溶媒とした 25 IU/kg ヒト尿由来卵胞刺激ホルモン（human follicular stimulating hormone : hFSH ; Fertinorm, Serono Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan）を 24 時間ごとに 9 日間（合計 225 IU/kg）皮下投与した。最終投与から 36 時間後に 1200 IU ヒト尿由来絨毛性ゴナドトロピン（urinary human chorionic gonadotropin : hCG ; Gonatropin, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan）を静脈内へ投与し、hCG 投与から 36～38 時間後に卵子を採取した。2 つ目の方法（Method B）では、生理食塩水を溶媒とした 200 IU ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（equine chorionic gonadotropin : eCG ; Serotropin, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd.）を 10 日間で 6 回、つまり 48 時間間隔で 5 回とその後 24 時間後に 1 回（合計 1200 IU）、静脈内へ投与した。最終投与から 36 時間後に 1200 IU hCG を静脈内へ投与し、hCG 投与から 36～38 時間後に同様に卵子を採取した。3 つ目の方法（Method C）では、グリセロールと生理食塩水の混合溶液（1：1）を溶媒とした 75 IU/kg の hFSH を 6 日間で 3 回（合計 225 IU/kg）皮下投与し、最終投与から 36 時間後に 1200 IU hCG を静脈内へ投与し、hCG 投与から 36～38 時間後に卵子を採取した。

カニクイザル個体からの採卵は、10 mg/kg ケタミン塩酸塩（Ketalar, Bayer Yakuhin Ltd., Osaka, Japan）と 1 mg/kg キシラジン塩酸塩（Seractarl, Bayer Yakuhin Ltd.）の筋

肉内投与による混合麻酔下において獣医師らにより外科施術として行われた。正中線に従い下腹部を 10 cm 程度切開し卵巣を腹腔外に露出させ（Fig. 3A）、25 ゲージ注射針を接続した 2 ml シリンジを用いて成熟卵胞から卵子を含む卵胞液を吸引（Fig. 3B-C）、採取した。採取した卵胞液は、直ちに 2.5 IU/ml ヘパリン(Novo Nordisk Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan）を含む 20 ml Hepes-TYH 培養液（119.37 mM NaCl、4.78 mM KCl、1.71 mM $CaCl_2$・$2H_2O$、 1.19 mM $MgSO_4$・$7H_2O$、1.19 mM KH_2PO_4、25.07 mM $NaHCO_3$、5.56 mM グルコース、1.0 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mg/ml ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin : BSA）、100 IU/ml ペニシリン G ナトリウム塩、100 μg/ml ストレプトマイシン硫酸塩、20 mM HEPES）[80] を満たした 50 ml 遠心チューブに移し、希釈した。卵胞液中に含まれる卵子は 0.1% ヒアルロニダーゼ（Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA）を含む Hepes-TYH 培養液により卵丘細胞を除去し、その後、10% ウシ胎仔血清（fetal bovine serum : FBS ; Hyclone, Logan, UT, USA）、1 mM Gluta-MAX（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）、100 IU/ml ペニシリン G ナトリウム塩、100 μg/ml ストレプトマイシン硫酸塩を含む CMRL-1066 培養液（Invitrogen）にて洗浄し、37℃、5% CO_2 の培養環境下で培養した。採取した卵子は成熟段階により卵核胞（germinal vesicle : GV）期（Fig. 4A）、卵核胞崩壊（germinal vesicle breakdown : GVBD）期（Fig. 4B）、metaphase II（M II）期（Fig. 4C）の 3 期に分類し [81]、顕微授精には最も成熟している M II 期卵子を用いた。

3-3. 顕微授精による受精卵の作出

カニクイザル受精卵は成熟卵子および成熟精子を用いた顕微授精により、既法 [18,19,79] に従い実施した。顕微授精は、外科手術により採取した M II 期卵子に対して、顕微鏡システム（ECLIPSE TS100, Nikon, Tokyo, Japan）にピエゾドライブ装置（PMM-150, Primetech,

Ibaraki, Japan）を装着したマイクロマニピュレーターを用いて、細胞質内精子注入法（intracytoplasmic sperm injection : ICSI）により行った（Fig. 4D）。

顕微授精に使用した精子は、Sankai ら（1994）[23] および Okada ら(2001)[82]、吉田・藤本（2006）[83] の方法に従い採取した。前述した混合麻酔したカニクイザル成熟雄個体に対して 5 ml TYH 培養液を注いだ 15 ml 遠心チューブ内に陰茎を入れた後、直腸より電気プローブを挿入し数回の電気刺激（10 V、40 Hz/sec.）を行い、遠心チューブ内に新鮮精子を採取した。精子を含む TYH 培養液を 9% NaCl 溶液で希釈した 90%パーコール（Amasham, Uppsala, Sweden）上に重層し、室温（25℃）、800 g の条件で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去し、精子を含む沈殿物を採取した。この沈殿物を CZB 培養液（81.62 mM NaCl、4.83 mM KCl、1.7 mM $CaCl_2$・$2H_2O$、1.18 mM $MgSO_4$・$7H_2O$、1.18 mM KH_2PO_4、15.0 mM $NaHCO_3$、31.3 mM ラクトース、0.11 mM EDTA、0.27 mM ピルビン酸ナトリウム、1.0 mM グルタミン、4 mg/ml BSA、100 IU/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン）に懸濁した [84]。さらに、CZB 培養液に懸濁した精子を 10% ポリビニルピロリドン（polyvinylpyrrolidone : PVP, Sigma Aldrich）を含む Hepes-CZB 培養液に移し、非動化させ、マイクロマニピュレーターを用いて 1 つの正常成熟精子を直径 7～8 μm のガラスピペットで吸引、採取した。ガラスピペットに接続されたピエゾドライブ装置で誘導したピエゾ振動により M II 期卵子の細胞膜を貫通させ、細胞質内に精子を注入した。精子注入を終えた卵子は CMRL-1066 培養液に移し、37℃、5% CO_2、5% O_2、90% air の条件下でインキュベートし、15～16 時間後に雌雄前核の形成と第二極体の放出により受精を確認した（Fig. 4E）。

3-4. ES 様細胞の培養

顕微授精により得た胚は、胚盤胞期胚まで 7～10 日間 CMRL-1066 培養液中で培養し

た。その後、胚盤胞期胚を 0.5% アクチナーゼ処理および 27 ゲージ注射針を用いて機械的に透明帯（zona pellucida : ZP）および栄養外細胞（trophectoderm : TE）を除去し、内部細胞塊（inner cell mass : ICM）を露出させ、予め 0.1% ゼラチン溶液でコートした組織培養 12 well プレート中で培養したフィーダー細胞上に静置し、37℃、5%CO_2 のインキュベーター内で培養した。培養液として、ES 細胞用培養液を用い、その組成は Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's Nutrient Mixture F-12（Sigma Aldrich）、20% knockout serum replacement（KSR, Invitrogen）、1mM GlutaMax、1% 非必須アミノ酸（non-essential amino acids : NEAA, Invitrogen）、4 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor （human bFGF : FGF2, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan）、10 ng/ml human recombinant leukemia inhibitory factor （human LIF, Millipore、Billerica, MA, USA）、0.1 mM β-mercaptethanol （2-ME, Sigma Aldrich）とした。また、マイトマイシン C 処理した MEF を 4×10^4 cells/cm^2 の細胞密度で培養ディッシュに播種し、これをフィーダー細胞とした。

ICM 由来の細胞がフィーダー細胞上で小さな細胞集団であるコロニーを形成した後、0.1% コラゲナーゼ溶液とピペッティングにより組織培養ディッシュから複数のコロニーを解離し、100～1000 個の小さな細胞塊になるまで緩やかに懸濁し、新しいフィーダー細胞上に播種した。以後の継代操作も同様の方法で行った。細かく砕いたコロニーから形成された ES 様細胞は、ICM の形成から安定して培養が可能になるまで、少なくとも 10 回の継代操作を必要とし、その間、前述した FGF2 や human LIF、2-ME を含む ES 細胞培養液で維持培養を行った。その後、ES 様細胞のコロニーを FGF2 と human LIF、2-ME を除いた改変 ES（modified ES : m-ES）細胞培養液の培養環境下に移した。m-ES 細胞培養液は毎日新鮮なものに交換し、おおよそ 7 日毎に未分化状態の ES 様細胞をコラゲナーゼ溶液により解離させ、新しいフィーダー細胞上に播種し、維持培養を行った。

新規樹立 ES 細胞の対照として、Suemori ら（2001）により樹立された CMK6 株を使用し

[18]、4 ng/ml FGF2 を添加した ES 細胞培養液にて維持培養を行った。CMK6 細胞株は標準的で最も利用されているカニクイザル ES 細胞のうちの一株であり、今回樹立を試みたカニクイザル ES 細胞と同様に培養条件に FGF2 の添加を必要としない細胞株である。しかしながら、この CMK6 細胞株の維持培養を行うためには、0.5～1×10^5 cell/cm^2 の播種密度のフィーダー細胞が必要であり、今回検討を行う 0.4×10^5 cell/cm^2 の播種密度のフィーダー細胞では未分化維持が困難である。そのため、CMK6 は 0.4×10^5 cell/cm^2 の播種密度のフィーダー細胞を用い、さらに 4 ng/ml FGF2 を添加した培養環境下で培養を行い、FGF2 を添加しない培養環境下で培養可能な ES 細胞との比較を行った。

3-5. 特性解析

新規樹立した ES 様細胞株は、FGF2 非添加 m-ES 細胞培養液の培養環境下で 15～20 世代の継代を行った後、ES 細胞としての生理生化学的特性を検証するため、染色体分析、アルカリフォスファターゼ（alkaline phosphatase : ALP）活性、未分化マーカーの発現解析、embryoid body（EB）およびテラトーマの形成、組織学的解析による、正常性の維持、未分化性および多能性の各種解析を行った。

3-5-1. 染色体分析

ES 細胞株の染色体分析は有限会社 クロモソームサイエンスラボ（Hokkaido, Japan）に受託した。染色体標本はギムザ染色液による G バンド法により処理し、画像情報より染色体の同定および数の算定を行った。

3-5-2. ALP 染色

ALP 活性の判定は、Alkaline Phosphatase Chromogen Kit （Biomeda, Plovdiv, Bulgaria） を

用い添付の説明書に従い行った。すなわち、未分化性をもつ細胞において発現している細胞膜 ALP が基質を介して赤色色素と結合することで発色し、ALP 活性のモニタリングを行うものである。ES 様細胞を培養している培養ディッシュに調製した色素液および基質液を添加し、室温（25℃）で 15 分間インキュベート後、蒸留水で培養ディッシュを洗浄し、光学顕微鏡により細胞の発色状態を観察した。

3-5-3. 免疫蛍光抗体染色

ES 細胞に特異的な未分化マーカー、Oct-3/4、stage-specific embryonic antigen（SSEA）-1、-3、-4、tumor-related antigen（TRA）-1-60、-1-81 の 6 種類の発現状況を免疫蛍光抗体染色法により解析した。培養した ES 細胞を 4% パラホルムアルデヒドを含む phosphate buffered saline（PBS）溶液で 30 分間、固定し、続いて 0.1% TritonX-100 を含む PBS 溶液により 10 分間の permeabilization を行い、3% BSA を含む PBS 溶液で 30 分間、ブロッキング操作を行った。その後、ES 細胞を 3% BSA を含む PBS 溶液で希釈したそれぞれの一次抗体に浸し、4℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞の洗浄を行った後、希釈した二次抗体と室温で 1 時間、反応させた。一次抗体には、Oct-3/4（POU5F1）（1: 50, 611202, BD Bioscience, San Jose, CA, USA）、SSEA-1（1: 80, MAB4301）、SSEA-3（1: 80, MAB4303）、SSEA-4（1: 80, MAB4304）、TRA-1-60（1: 80, MAB4360）、TRA-1-81（1: 80, MAB4381）（全て、Millipore）を用いた。翌日、細胞の洗浄を行った後、希釈した二次抗体を含む 3% BSA を含む PBS 溶液に 1 時間浸した。二次抗体には Alexa Fluor 488 で標識した抗マウス IgG 抗体（1:1000, A-11001）、抗マウス IgM 抗体（1:1000, A-21042）、抗ラット IgM 抗体（1:1000, A-21212）、抗ウサギ抗体（1:1000, A-11070）、Alexa Fluor 555 で標識した抗ウサギ抗体（1:1000, A-21428）（全て、Life Technologies, Gaithersburg, USA）を用い、3% BSA を含む PBS 溶液に添加した。反応後、細胞の洗浄を行い、4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）を含む 50%グリセロール溶液で封入した後、共焦点レー

ザー顕微鏡（Digital Eclipse C1, Nikon, Tokyo, Japan）にて蛍光観察を行った。

3-5-4. EBの形成

EB は、0.1% コラゲナーゼ溶液により解離させた ES 様細胞をピペッティングにより 100～1000 個の細胞塊に崩し、それらを m-ES 細胞培養液の入ったペトリディッシュに移し、37℃、5% CO_2 の条件で 3 日間以上インキュベートし、浮遊培養を行い形成させ、光学顕微鏡より形態学的な観察を行った。

3-5-5. テラトーマ形成と組織学的解析

ES 細胞のテラトーマ形成能の評価を行うため、6 cm 培養ディッシュ 6 枚分の未分化維持培養を行った ES 様細胞を 100～1000 細胞数のコロニー塊に崩し、免疫不全マウス（NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J）の片側の後脚の大腿筋中に 1 頭あたり約 1×10^6cell/ml の細胞懸濁液を 1 ml 移植した。細胞の移植から約 2 ヶ月後に触診により接種部位に腫瘤を確認し、頸椎脱臼による安楽死後、腫瘤を含む組織を採取した。採取した組織を 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 溶液にて 4℃で一晩固定し、パラフィン包埋後、定法により組織標本を作製しヘマトキシリン・エオジン染色後、組織学的解析を行った。また、三胚葉由来組織の観察のため、免疫ペルオキシダーゼ染色法も行った。一次抗体としてマウス IgG 抗 synaptophysin 抗体（1:200, M7315）、マウス IgG 抗 α-smooth muscle actin 抗体（1:100, M0851）、ウサギ抗 α-fetoprotein 抗体（1:1000, IR500）（全て、Dako, Glostrup, Denmark）、を用い、染色方法は VECTASTAIN Universal Quick Kit（PK-8800, Funakoshi Corporation, Tokyo, Japan）を用いて行った。詳細は使用説明書に準じた。

3-6. 神経系細胞への分化誘導

神経系細胞への分化誘導を行うにあたり、新規 ES 細胞株と CMK6 細胞株、および RA と FGF2 の組み合わせから 3 つのグループに分類し、それぞれの神経系細胞への分化誘導のスケジュールは Fig. 11 に示した。すなわち、FGF2 非添加条件で新規 ES 細胞株を培養し、m-ES 細胞培養液に RA のみを添加したもの（Group A）、および RA と 10 ng/ml FGF2 を添加したもの（Group B）、また、FGF2 添加条件で CMK6 細胞株を培養し、m-ES 細胞培養液に RA のみを添加したもの（Group C）の 3 つのグループである。それぞれの方法により、3 日毎に新鮮な培養液に交換し、30 日間培養を行った後、細胞接着性、神経系細胞に特異的なタンパクの発現状況について比較検討した。

3-6-1. EB 形成と接着培養

3-5. 特性解析と同様の方法により、ES 細胞を m-ES 細胞培養液中で浮遊培養し、EB を作成した。EB の形成開始から 3 日後、形成された EB を予め 0.1% ゼラチン溶液でコートしておいた 6 cm 組織培養ディッシュへ移し、m-ES 細胞培養液中で接着培養を行ない、細胞接着性を観察した。

3-6-2. レチノイン酸の添加

ES細胞の分化誘導因子の一つとして、RA（all-trans-retinoic asid, Cat. No. R2625, Sigma Aldrich）の添加を行った。RAの調整に関しては使用説明書に準じ、Dimethyl sulfoxide（DMSO）を溶媒として使用した。EBの接着培養を開始するタイミングで、最終濃度が0.5 μM、1 μM、10 μM、100 μMになるように希釈調整したRA溶液を、m-ES細胞培養液に添加した。その後、3日おきに新鮮なRA添加m-ES細胞培養液に交換し、

接着培養開始から30日後に光学顕微鏡にて細胞形態を、蛍光顕微鏡にてそれぞれの神経系細胞特異的マーカーの発現を免疫蛍光抗体染色により観察した。

3-6-3. FGF2の添加

RAと同様に、ES細胞の分化誘導因子の一つとして、FGF2の添加を行った。EBの接着培養を開始するタイミングで、10 ng/ml FGF2をm-ES細胞培養液に添加し、その後、3日おきに新鮮なFGF2を添加したm-ES細胞培養液に交換し、EBの接着培養開始から30日後に光学顕微鏡にて細胞形態を、蛍光顕微鏡にて神経系細胞特異的マーカーの発現を免疫蛍光抗体染色により観察した。

3-6-4. 免疫蛍光抗体染色

免疫蛍光抗体染色法により神経系細胞で特異的に発現しているタンパク質の染色を3-4-2 で述べた方法により行った。一次抗体には、神経細胞マーカーであるβ-tubulin III に対する抗体（マウス IgG 抗β-tubulin III 抗体, 1 : 200, T8660, Sigma Aldrich）、アストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein（GFAP）に対する抗体（マウス IgG 抗 GFAP 抗体, 1:1000, M0716, Dako）、オリゴデンドロサイトマーカーである myelin basic protein（MBP）に対する抗体（ウサギ抗 MBP 抗体, 1:1000, M3821, Sigma Aldrich）の 3 種類を用いた。翌日、細胞の洗浄を行った後、希釈した二次抗体を含む 3% BSA を含む PBS 溶液に 1 時間浸した。二次抗体には Alexa Fluor 488 で標識した抗マウス IgG 抗体（1:1000, A-11001）、同じく抗ウサギ抗体（1:1000, A-11070）、Alexa Fluor 555 で標識した抗マウス IgG 抗体（1:1000, A-21425）、同じく抗ウサギ抗体（1:1000, A-21430）（全て、Life Technologies）を用い、3%BSA を含む PBS 溶液に添加した。一次抗体、および二次抗体はカニクイザル成体の脳由来神経系細胞の観察に用いられ、陽性細胞の観察が確認されているものを用いた。以降は、3-5-2.と同じ方法で

細胞核を DAPI により染色し、封入した後、共焦点レーザー顕微鏡（Digital Eclipse C1, Nikon）にて蛍光観察を行った。

3-7. 統計処理

統計学的解析は一元配置分散分析法（One-way ANOVA）およびスチューデントの t 検定（Student's t-test）を用いて行った。$P<0.05$ の場合を有意差として判定した。

4. 結果

4-1. 受精卵の調整からES様細胞の培養

始めに、霊長類由来 ES 細胞の樹立に使用するため、カニクイザル受精卵の調整方法を検討した。まず、多数の受精卵を計画的に得るために卵胞発育誘起を行うこととし、既報[79]に示すように、ホルモン製剤と接種間隔の異なる 3 種の方法で成熟雌性カニクイザルから成熟卵子を採取した（Fig. 2）。Method A では、グリセロールと生理食塩水の混合溶液に溶解した hFSH を 24 時間ごとに 9 日間投与した後に hCG を投与し、7 頭の成熟雌個体より平均 31±12 個の卵子が採取された。そのうち、12±6 個が成熟（M II 期）卵子（Fig. 4C）であった。Method B では、生理食塩水に溶解した eCG を 10 日間で 6 回投与した後に hCG を投与し、8 頭より平均 18±4 個の卵子が得られた。このうち、成熟卵子は 7±2 個であった。Method C では、グリセロールと生理食塩水の混合溶液に溶解した hFSH を 6 日間で 3 回投与した後に hCG を投与し、5 頭より平均 21±4 個の卵子を採取し、10±3 個が成熟卵子であった（Table 1）。Method A および Method C において、Method B より多くの成熟卵子を獲得できたが、これら 3 つの卵胞発育誘起方法により得られた卵子の数や成熟卵子の数に有意差は認められなかった。

次に、上記のMethod AおよびMethod Bの卵胞発育誘起方法により獲得した成熟卵子70個に対してICSIによる顕微授精操作を行い（Fig. 4D）、受精卵を作出した。Method Aで獲得した62個の卵子に対してICSIにより精子を注入したところ、雌雄前核および2つの極体を持つ28個の正常胚（Fig. 4E）が得られた。一方、Method Bで獲得した8個の卵子は、全てICSIにより受精し、8個の正常胚が作出された（Table 2）。

hFSHの皮下投与とhCGの静脈内投与によるMethod Aでは、多くの正常胚が得られたが、ICSIによる体外受精の効率は低く、eCGの静脈内投与とhCGの静脈内投与によるMethod Bでは得られる正常胚の数は少ないが、ICSIによる体外受精の効率は高い傾向が認められた。

次に、受精卵より ES 様細胞の培養を行った。Method A および Method B による卵胞発育誘起で獲得した成熟卵子に、ICSI による体外受精で作り出した受精卵 36 個を 7～10 日間にわたり体外培養し、最終的に 8 個の胚盤胞期胚を得た。得られた胚盤胞期胚は全て Method A により得られた成熟卵子を由来とするものであった。これらの胚盤胞期胚の透明帯および栄養外細胞を除去して ICM を露出させ、それぞれフィーダー細胞を播種した培養ディッシュにて静置培養を行った。その結果、75%（6/8）の ICM がフィーダー細胞上に接着し増殖を続け、ES 細胞様のコロニーを形成した（Fig. 5A）。形成された ES 細胞様のコロニーを FGF2、human LIF、2-ME を含む ES 細胞培養液の環境下で維持培養を行い、10 世代の継代を行った。その後、FGF2、human LIF、2-ME を添加しない m-ES 細胞培養液を用いて継代を行ったところ、1 つの ICM 由来の ES 様細胞が安定して維持培養が可能であった。その他の ICM 由来の ES 様細胞は複数のコロニーが形成できず、次世代への継代操作にピックアップによるクローニングが必要であるか、継代操作が不可能なものであった。この未分化維持が可能であった ES 様細胞において、m-ES 細胞培養液で維持培養および継代操作を行ったところ、持続して複数のコロニーを形成する維持培養が可能であり、コロニー形態も既知の霊長類 ES 細胞が示す形態と同様であった（Fig. 5B）。これらの形態学的な特徴は、維持培養や継代を繰り返しても変化することなく、安定的に維持できたため、次に ES 細胞としての生理生化学的特性について解析することとした。

4-2. 特性解析

FGF2を添加しないm-ES細胞培養液で維持培養が可能である新規に樹立したES様細胞において15～20世代の継代操作を行った後、生理生化学的な特性解析を行った。

まず、18世代目のES様細胞を用いてGバンド法による染色体分析を行った。その結果、今回分析した18世代目のES様細胞において観察した細胞総数の約80％（159/200）が正常な染色体数（42本）で、性染色体としてXYを有していた（Fig. 6A-B）。

次に、15～20世代目のES様細胞を用いて未分化性の解析を行った。まず、未分化性の指標として、もっとも簡便であるALP染色による解析の結果、特異的な染色反応からALP酵素の発現が認められ、得られたES様細胞が未分化性を維持していることが示唆された（Fig. 7）。さらに、免疫蛍光抗体染色法によりOct-3/4、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60およびTRA-1-81の未分化マーカーの発現状況を検討した。その結果、ES様細胞においてOct-3/4、SSEA-4、TRA-1-60およびTRA-1-84の陽性細胞が認められた。一方、SSEA-1、SSEA-3陽性細胞は認められなかった（Fig. 8）。これらの結果より、既知のカニクイザルES細胞株と同様の特性を有していることが示唆された。

続いて、同じく15～20世代目のES様細胞を用いて分化多能性の検討を行った。まず、新規に樹立したES様細胞を用いてEBの形成能を観察した。その結果、早いものでは浮遊培養を行なった2日後に直径が300 μmほどの大きさに増殖し、凝集塊様の形態を示し始めた。その後、3～5日後には大半が直径300 μm以上の大きさに増殖し、最大700 μmほどの直径の大きさのEBも形成された（Fig. 9）。さらに、ES様細胞を免疫不全マウスに接種することにより、テラトーマ形成能を検討した。その結果、ES様細胞を接種した2匹中2匹において接種部位に腫瘤が形成された（Fig. 10A）。その腫瘤を摘出しヘマトキシリン・エオジン染色、および免疫ペルオキシターゼ染色により組織学的に解析したところ外胚葉由来組織である皮膚組織（Fig. 10B）および神経細胞マーカーのsynaptophysin

陽性細胞（Fig. 10C）、中胚葉由来組織である血液（Fig. 10D）と平滑筋細胞マーカーのα-smooth muscle actin陽性細胞（Fig. 10E）、内胚葉由来組織である消化腺（Fig. 10F）と肝細胞マーカーのα-fetoprotein陽性細胞（Fig. 10G）が観察された。これらのことから、接種したES様細胞由来のテラトーマ形成が確認され、*in vivo*における分化多能性も確認された。

これらの結果より、FGF2非添加の培養条件で獲得した新規カニクイザルES様細胞は従来の霊長類ES細胞と同様の未分化性および分化多能性を示し、15～20世代の継代を経てもその特性を維持できていることから、FGF2低依存性カニクイザルES細胞株を樹立できたことが明らかとなった。そして、このFGF2低依存性カニクイザルES細胞株をFGF2-low-dose-dependent（Fld-）ES細胞株と呼ぶこととした。

4-3. 神経系細胞への分化誘導

新規に樹立した Fld-ES 細胞は、FGF2 非添加の m-ES 細胞培養液で未分化性が維持され、この特性は神経系細胞への分化に重要な役割を有すると考えられる RA および FGF2 の機能を解析するうえで有用と考えられる。そこで、RA および FGF2 による Fld-ES 細胞の神経系細胞へ分化誘導を検討した。

EBはES細胞を浮遊培養することで形成される球状の細胞塊で、組織培養用ディッシュ接着し2～3週間程度培養すると様々な細胞種への分化が観測される。したがって、新規樹立ES細胞の神経系細胞への分化誘導を検討する上で、EBは極めて重要なステージである[60,61,85]。一方、霊長類ES細胞では、単離した細胞で継代すると増殖が不良となりコロニー形成が困難となることが報告されている[38,86-88]。本研究において樹立されたFld-ES細胞も同様な傾向を示し、単離ES細胞からのEB形成も困難であった。このため、EB形成の際の浮遊培養は100～1000個程度の細胞塊から開始し、形成されたEBは浮遊培養開始3日後で直径300～700 μmの幅があった（Fig.9）。

そこで、Fld-ES細胞の神経系細胞への分化誘導を検討する上で、EBのサイズと接着性について予備的な検討を行った。その結果、浮遊培養開始後3日目において大型のEB（500～700 μm程度）は78.9％（45/57）が接着性を示したのに対して、小型のEB（300～500 μm程度）は9.5％（6/63）となり、両者に有意な差が認められた（Fig.12）。このため、以降の分化誘導の実験において、直径500～700 μmのEBを使用することとした。

新規に樹立したFld-ES細胞株および対照となる既存のカニクイザルES 細胞であるCMK6細胞株を用いて、神経系細胞への分化誘導を検討した（Fig. 11）。まず、RA濃度によるFld-ES細胞から神経系細胞への分化の有効性について、GroupAの条件下で比較した。Fld-ES細胞株から形成したEBを最終濃度0.5 μM、1 μM、10 μM、100 μMのRAを添加したm-ES細胞培養液で培養し、EBのディッシュ上への接着率を比較したところ、それぞれ70.8％（34/48）、78.9％（45/57）、75.5％（40/53）、2.1％（1/47）となり、0.5 μM、1 μMおよび10 μMではコントロール74.5％（38/51）と同様に接着性が認められた。一方で、100 μMのRAを添加した培養環境におけるEBの接着率は有意に低い結果となった（Fig.13A）。さらに、接着培養を開始してから30日後に、細胞のコロニーの形態変化の観察を行ったところ、1 μM RAを添加した条件で接着培養を行ったEB由来のコロニーにおいて82.2％（37/45）の率で神経線維と推測される構造の出現を確認した（Fig. 13B, 13E, 14A）。これに対して、0.5 μM および 10 μMのRAを添加した培養条件下では、同様の構造を有するコロニーはそれぞれ20.6％（7/34）、10.0％（4/40）と有意に低い結果となった（Fig. 13B）。これらの結果から、Fld-ES細胞の神経系細胞への分化誘導には1 μMのRA添加が有効であることが示唆された。

次に、Group Bの条件でFld-ES細胞株から形成したEBを1 μM RAと10 ng/ml FGF2を添加したm-ES細胞培養液を用いて接着培養を行った。その結果、EBの接着培養開

始から30日後にGroup Aと同様の神経線維状の構造が観察された（Fig. 14B）。また、既存のカニクイザルES細胞株であるCMK-6細胞でもRAによる神経系細胞への分化誘導を検討した。この場合、CMK-6細胞は未分化維持培養にFGF2を必要とするため、EB形成までは4 ng/ml FGF2添加m-ES細胞培養液で培養し、EB形成後にFGF2非添加のm-ES細胞培養液に交換し、さらに3日後に1 μMの RAを添加した（Fig. 11, Group C）。その結果、CMK-6細胞でも、Group AによるFld-ES細胞と同様に神経線維状の構造物が観察された（Fig. 14C）。

さらに、上記のGroup A、Group BおよびGroup Cの方法で誘導された神経線維状の構造が確認されたサンプルを用いて、それぞれの神経系細胞に特異的な細胞マーカーを免疫蛍光抗体染色により観察した。その結果、全てのGroupにおいて神経細胞の細胞マーカーであるβ-tubulin III陽性細胞が確認された（Fig. 14E-G）。一方で、Group BおよびGroup Cでアストロサイトの細胞マーカーであるGFAP陽性細胞への分化が認められた（Fig. 14J）が、Group CではGFAP陽性細胞は極めて少数であった（Fig. 14K）。また、全てのGroupにおいてオリゴデンドロサイトの細胞マーカーであるMBP陽性細胞は認められなかった（Fig. 14M-O）。

これらの結果より、未分化維持培養においてFGF2を必要としないFld-ES細胞株においては、EB形成後に1 μM RAを添加したm-ES細胞培養液のみで神経細胞への分化誘導が可能であり、さらに1 μM RAと10 ng/ml FGF2を添加した培養条件下で神経細胞とアストロサイトへの分化が誘導されることが明らかとなった。また、CMK6細胞株においても1 μM RAを添加により神経細胞と極めて僅かなアストロサイトへの分化が確認された。このことからマウスES細胞と同様、カニクイザルES細胞においてもRAは神経系細胞への分化を誘導することが示唆された。また、FGF2はさらに神経系細胞の分化を促進し、神経細胞だけでなくアストロサイトへの分化も誘導すること

が明らかとなった。また、今回の分化誘導の方法ではオリゴデンドロサイトへの分化誘導は確認されなかった。

5. 考察

本研究において、筆者はカニクイザル ES 細胞の樹立のために成熟雌性カニクイザルの有効な卵胞発育誘起方法の検討を行い、効率的に成熟卵子を獲得する方法を特定することに成功した。加えて、FGF2 非添加の環境下で未分化維持培養が可能なカニクイザル ES 細胞である Fld-ES 細胞株の樹立に成功し、この ES 細胞株において RA および FGF2 を用いた神経系細胞への分化誘導を行い、それぞれの役割を明らかにした。

5-1. カニクイザルにおける生殖基盤技術

カニクイザルを含めたサル類においては、より効率よく成熟卵子を得るための方法として、ホルモン製剤を投与する卵胞刺激方法が最も多く用いられ、ホルモン製剤の組み合わせ、投与する濃度、投与回数などは多岐に渡っている [49-58]。例えば、ホルモン製剤では今回の実験に使用した hFSH、eCG に加え、閉経婦人尿性腺刺激ホルモン（human menopausal gonadotropin : hMG）などが用いられ、投与する濃度も 1 回の投与濃度が国際単位（international unit : IU）として規定されているものや投与する個体の体重によって濃度を定めるもの（IU/kg）など、最適とされる組み合わせを特定することは非常に困難である。

本研究において、カニクイザルではグリセロールと生理食塩水の混合溶液に溶解した hFSH を 24 時間ごとに 9 日間皮下投与した後に hCG を静脈内投与による卵胞発育誘起方法（Fig.2, Method A）を用いることで、より多くの成熟卵子の調整が可能であり、それに続く ICSI による体外受精で多くの正常胚の作出が可能であることが明らかとなった（Table 1 and 2）。このことから、カニクイザルの卵胞刺激に用いるホル

モン製剤は eCG より hFSH がより適しており、加えて、粘性の高いグリセロールを溶媒として 24 時間毎に皮下投与することで、徐々に体内に吸収され恒常的にホルモンが循環し卵胞を刺激することが有効であると考えられる。事実、ウサギやウシ、ヒツジにおいて高い粘性をもつ溶媒（例えば、ポリビニルピロリドンやグリセロールなど）にホルモン製剤を溶解し投与することにより、卵胞発育へ持続的な効果を示すという報告もある[89-92]。一方、受精卵の作出方法として、新鮮な射出精子との媒精による体外受精（in vitro fertilization ; IVF）法と ICSI による顕微授精方法がある。IVF 法は成熟卵子に対して精子の数が圧倒的多数であるため多精子受精の原因となることから、正常胚作出の確実性が低下する可能性がある。対して、ICSI による顕微授精方法は卵子と精子の比率が１：１であり、また、新鮮な射出精子でなくても凍結保存後融解した精子などを用いても、精子が正常な染色体を保持していれば正常胚の作出が可能であることから、計画的な実験が容易であるという利点もある。このことから、カニクイザルのより多くの正常胚を確実に作出するには、粘性の高い溶液に溶解した hFSH の 24 時間毎に 9 回の皮下投与と hCG の静脈投与、および ICSI による顕微授精が効果的であると考えられる。

5-2. FGF2 低依存性 ES 細胞株の樹立

ヒトを含む霊長類の ES 細胞では FGF2 の添加によって TGF-β/Activin/Nodal シグナル伝達経路が活性化され、自己複製が促進され未分化状態が維持されている[26,27,35-37]。また、FGF2 はヒト ES 細胞において他の分化誘導因子と併用することで、神経幹細胞への分化誘導に効果を示している 。しかしながら、FGF2 を起点とする分化の作用は AKT シグナル伝達経路や ERK/MAPK シグナリング伝達経路など多岐に渡っており、神経系細胞への分化に寄与するシグナル伝達経路やそれに付随する効果は

明らかになっていない。

一方で、ヒトを含めた霊長類 ES 細胞ではフィーダー細胞の役割が重要であり、MEF などのフィーダー細胞に起因する FGF2 シグナルが ES 細胞の自己複製を制御していることが報告されている[26,27,38-40]。実際に、今回の研究において標準的なカニクイザル ES 細胞として使用した CMK6 細胞株は、本来、FGF2 非添加の培養条件では未分化性の維持に $0.5\sim1\times10^5$ cell/cm^2 の播種密度のフィーダー細胞が必要である[93]。そのため、本研究において Fld-ES 細胞の樹立および未分化維持培養には 0.4×10^5 cell/cm^2 のフィーダー細胞を用いたが、CMK6 では 0.4×10^5 cell/cm^2 のフィーダー細胞を用いて、さらに FGF2 を添加した環境下で培養を行った。そのため、FGF2 を添加していない培養条件下でもフィーダー細胞に起因する FGF2 シグナルの影響は避けられない。

本研究では FGF2 を添加せずに未分化維持培養が可能な Fld-ES 細胞株を樹立した。染色体分析、ALP 染色および免疫蛍光抗体染色による未分化マーカー陽性細胞の解析、EB およびテラトーマ形成能と *in vivo* での分化多能性の解析により、Fld-ES 細胞がこれまでに報告されているカニクイザル ES 細胞と同様の特性を有していることが認められた[18,94-97]。一方で、未分化マーカーの解析で、マウス ES 細胞で特異的に発現している SSEA-1 と、ヒト ES 細胞で特異的に発現している SSEA-3 の未分化マーカー陽性細胞は認められなかった。この現象は、カニクイザル ES 細胞において特有のものであり[18,94,96,97]、マウス ES 細胞はもちろん、同じ霊長類であるヒト ES 細胞とも異なる性質を有している可能性が示唆された。

5-3. Fld-ES 細胞の神経系細胞への分化

分化誘導実験を行うにあたり、まず、Fld-ES 細胞株から形成した EBs は、そのサイズによりディッシュへの接着性が異なることを見出した。EB には後の三胚葉（外

胚葉、中胚葉、内胚葉）系細胞となる細胞を多数含んでおり、その形成を認めることで多能性を獲得したことが推測できる。それぞれの EB 形成のタイミングや直径の大きさに違いが表れた原因として、霊長類 ES 細胞の特徴でもある、継代操作時に個々の細胞単位まで単離してしまうと、増殖不良を起こしコロニーの形成が困難になってしまうことが起因していると考えられる。同様に、EB の形成も 100-1000 個の定まった数量でない細胞塊から開始されるため、形成のタイミングと直径の大きさの異なる EB になったと推測される。最近、マウス ES 細胞において低酸素応答性の転写因子である Hypoxia-inducible factor 1 alpha（HIF1α）が、内在性のBMP4 から誘導されるシグナルを抑制することで中胚葉および内胚葉への分化を制御し、さらに初期の神経系発生を促進することが報告されている [98]。EBのサイズが増し、EB内部が低酸素状態に陥ることが HIF1αを介して細胞の接着性の亢進やその後の神経系細胞への分化に作用する可能性があり、興味深い。

本研究では全ての実験系に対して、接着性に優れた 500-700 μm の EBs を用いて各濃度の RA を m-ES 細胞培養液により神経細胞への分化誘導実験を行い、1μM の RA が Fld-ES 細胞において神経系細胞への分化を誘導することをはじめて明らかにした。マウス ES 細胞と同様に RA の効果が認められたことから、カニクイザル ES 細胞においても RAR/RXR(retinoic acid receptor / retinoid X receptor)を介して Wnt シグナル伝達もしくは Nodal シグナル伝達系、あるいはその両方を阻害することで中胚葉および内胚葉への分化を抑制し、分化の方向性を外胚葉へと絞り込む役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、マウス ES 細胞において効果的に神経系細胞へと分化誘導する RA 濃度は 0.5 μM であるのに対し [67]、カニクイザル ES 細胞では 1 μM の濃度でピークを示した。このことから、カニクイザル ES 細胞はマウス ES 細胞と比較して神経系細胞への分化誘導には、より高濃度の RA が必要であることが示唆さ

れた。

また、免疫蛍光抗体染色法によりそれぞれの神経系細胞マーカーを検索したところ、Fld-ES 細胞に RA のみを添加した Group A では神経細胞への分化は認められたが、アストロサイトへの分化は認められなかった。一方、Fld-ES 細胞に RA および FGF2 を添加した Group B では接着培養から 30 日後に神経細胞とアストロサイトへの分化が認められた。また、CMK6 細胞に RA のみを添加した Group C では、神経細胞と少数のアストロサイトへの分化が認められた。Group C の CMK6 細胞は FGF2 を添加した m-ES 細胞培養液で維持培養を行っている。これらのことから、FGF2 はカニクイザル ES 細胞においてアストロサイトへの分化に効果的であることが明らかとなった。FGF2 は未分化維持に必要な因子でありながらも、RA 添加により神経系細胞への分化を方向づけられた環境下ではアストロサイトへ分化するために作用したと考えられる。RA 添加の効果は、中胚様および内胚様への分化を抑制することで外胚様に分化するよう方向づけられたと推測され[67]、これにより神経細胞およびアストロサイトに分化したと考えられる。

しかしながら、全ての Group においてオリゴデンドロサイトへの分化は認められなかった。生体の中でも中枢神経系におけるオリゴデンドロサイトの比率は他の神経系細胞に比べかなり低いことから、生体内でも *in vitro* でもオリゴデンドロサイトへ分化誘導させるには特殊な環境下、特殊な因子の関与が必要と考えられる。例えば、マウスやヒト ES、iPS 細胞をオリゴデンドロサイトへ分化誘導するには、SHH や Noggin、SB431542 などの誘導因子をそれぞれ適切なタイミングで添加する方法や、さらに Vitronectin といった細胞外マトリクス上で培養を行う方法が用いられている[63,67,68,73,99,100]。SHH は hedgehog シグナル伝達のリガンドとして働き、神経系細胞[73,101]、造血幹細胞[102]、乳腺[103]などといった多岐にわたる組織への分化を誘導するため、明

確な特性は解明されていない。Noggin は BMP4 / TGF-βシグナル伝達を阻害することで、神経系細胞の成熟を促す効果があるが[63,67,68,73,100]、同じく TGF-βシグナル伝達を制御している FGF2 とは異なる働きを持っていることが考えられる。SB431542も FGF2 と同様、Activin/Nodal シグナル伝達を制御しているが、FGF2 より神経系細胞の成熟を促進する効果があると考えられている[63,67,68,73]。Vitronection は生体内でも SHH タンパクが発現している部位の近傍に分布しており、また *in vitro* においても RA や Noggin、SHH 等の分化誘導因子の効果を高める働きを持っている[99]。したがって、神経系細胞の中でもオリゴデンドロサイトは神経細胞やアストロサイトと比べてより多くの因子の作用を受け、前駆細胞の発生などいくつかのステージを経て生物学的機能を持つ成熟したオリゴデンドロサイトになると考えられる。すなわち、Fld-ES 細胞株をすべての神経系細胞へと誘導させるためには、まず RA による初期誘導を行った後、FGF2 を添加することでアストロサイトへ、さらに特殊な誘導方法を用いてオリゴデンドロサイトへと分化誘導を行う必要があると推測される。これらのことから、オリゴデンドロサイトへの分化誘導には今後の課題が多く、効果的な神経系細胞への分化誘導方法を確立するなどの基礎研究やその延長上にある神経変性疾患の再生治療などの研究を進めうるうえで、分化誘導における FGF2 の効果を明確にすることが可能である本 ES 細胞株は有用な細胞材料であると考えている。

本研究より、FGF2 非添加の培養条件で未分化性の維持が可能なカニクイザル ES 細胞である Fld-ES 細胞株の樹立が可能となった。また、カニクイザルにおける有効な卵胞発育誘起方法、つまり hFSH による恒常的な刺激による卵胞成育および hCG による排卵刺激が有効な手法を用いることで多数の成熟卵子の調整が可能となり、さらに ICSI による顕微授精を行うことで、より確実に正常胚の作出が可能となることが

示された。

また、カニクイザル ES 細胞において RA は極めて初期の段階に神経系細胞へと分化させ、最終的には神経細胞へと分化させる働きを有していることが示唆された。さらに、FGF2 の添加により神経系細胞へと分化する過程で神経細胞に加え、アストロサイトへの分化も可能であることが明らかとなった。しかしながら、神経系細胞の中で最も分化誘導が困難であるオリゴデンドロサイトへの分化には、より多くの誘導因子の添加および長期間に渡る段階的な分化誘導方法の検討が必要であると考える。

6. 参考文献

1. Evans MJ, Kaufman MH. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292:154-156.

2. Martin GR. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA .78:7634-7638.

3. Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, Jones J. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282:1145-1147.

4. Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126:663-676.

5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell 131:861-872.

6. Pau KY, Wolf DP. (2004) Derivation and characterization of monkey embryonic stem cells. Reprod Biol Endocrinol. 2:41.

7. Bavister BD, Wolf DP, Brenner CA. (2005) Challenges of primate embryonic stem cell research. Cloning Stem Cells 7:82-94.

8. Chavez SL, Meneses JJ, Nguyen HN, Kim SK, Pera RA. (2008) Characterization of six new human embryonic stem cell lines (HSF7, -8, -9, -10, -12, and -13) derived under minimal-animal component conditions. Stem Cells Dev. 17:535-546.

9. Tavakoli T, Xu X, Derby E, Serebryakova Y, Reid Y, Rao MS, Mattson MP, Ma W. (2009) Self-renewal and differentiation capabilities are variable between human embryonic stem cell lines I3, I6 and BG01V. BMC Cell Biol. 10:44.

10. Lund RJ1, Närvä E, Lahesmaa R. (2012) Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. Nat Rev Genet. 13:732-744.

11. Wunderlich S, Kircher M, Vieth B, Haase A, Merkert S, Beier J, Göhring G, Glage S, Schambach A, Curnow EC, Pääbo S, Martin U, Enard W. (2014) Primate iPS cells as tools for evolutionary analyses. Stem Cell Res. 12:622-629.

12. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiuwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegrini M, Plath K, Lowry WE. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell Stem Cell 5:111-123.

13. Chin MH, Pellegrini M, Plath K, Lowry WE. (2010) Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. Cell Stem Cell 7:263-269.

14. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature 467:285-290.

15. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat Biotechnol. 28:848-855.

16. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA. 92:7844-7848.

17. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. (1996) Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. Biol Reprod. 55:254-259.

18. Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, Kondo Y, Iritani A, Nakatsuji N. (2001) Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. Dev Dyn. 222:273-279.

19. Shimozawa N, Nakamura S, Takahashi I, Hatori M, Sankai T. (2010) Characterization of a novel embryonic stem cell line from an intracytoplasmic sperm injection-derived blastocyst in the African green monkey. Reproduction 139:565-573.

20. Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Asano S, Nakatsuji N, Okano H, Tani K. (2005) Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Stem Cells 23:1304-1313.

21. Mitalipov S, Kuo HC, Byrne J, Clepper L, Meisner L, Johnson J, Zeier R, Wolf DP. (2006) Isolation and characterization of novel rhesus monkey embryonic stem cell lines. Stem Cells 24:2177-2186.

22. Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. (2009) Generation of transgenic non-human primates with germ line transmission. Nature 459:523-527.

23. 吉田高志, 藤本浩二. (2006) 医科学研究資源としてのカニクイザル ー霊長類医科学研究センター 30 年の集積ー. シュプリンガー・ジャパン株式会社.

24. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, Thomson JA. (2006) Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. Stem Cells 24:568-574.

25. Zhang X, Wang S, Yang S, Li T, Ji S, Chen H, Li B, Jin L, Xie Y, Hu Z, Chi J.(2006) Feeder layer- and serum-free culture of rhesus monkey embryonic stem cells. Reprod Biomed Online. 13:412-420.

26. Greber B, Lehrach H, Adjaye J. (2007) Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. Stem Cells 25:455-464.

27. Diecke S, Quiroga-Negreira A, Redmer T, Besser D. (2008) FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells. Cells Tissues Organs 188:52-61.

28. Honda A, Hirose M, Ogura A.(2009) Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. Exp Cell Res. 315:2033-2042.

29. Eiselleova L, Matulka K, Kriz V, Kunova M, Schmidtova Z, Neradil J, Tichy B, Dvorakova D, Pospisilova S, Hampl A, Dvorak P. (2009) A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. Stem Cells 27:1847-1857.

30. Hirabayashi M, Kato M, Kobayashi T, Sanbo M, Yagi T, Hochi S, Nakauchi H. (2010) Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimerae at high efficiency. Mol Reprod Dev 77:94.

31. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 336:684-687.

32. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 336:688-690.

33. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. Genes Dev. 12:2048-2060.

34. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. (2009) A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. Nature 460:118-122.

35. Okita K, Yamanaka S. (2006) Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 1:103-111.

36. Ohtsuka S, Dalton S. (2008) Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. Gene Ther. 15:74-81.

37. Yu J, Thomson JA. (2008) Pluripotent stem cell lines. Genes Dev. 22:1987-1997.

38. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol. 227:271-278.

39. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 19:971-974.

40. Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC, Hayek A. (2005) Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. Stem Cells 23:489-495.

41. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. (2007) Derivation

of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. Nature 448:191-195.

42. Tesar PJ., Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. Nature 448:196-199.

43. Vallier L1, Touboul T, Chng Z, Brimpari M, Hannan N, Millan E, Smithers LE, Trotter M, Rugg-Gunn P, Weber A, Pedersen RA. (2009) Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. PLoS One 4:e6082.

44. Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW, Jaenisch R. (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proc Natl Acad Sci USA. 107:9222-9227.

45. Greber B., Wu G., Bernemann C., Joo J. Y., Han D. W., Ko K., Tapia N., Sabour D., Sterneckert J., Tesar P., Schöler H. R. (2010) Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. Cell Stem Cell 6, 215-26.

46. Najm FJ, Chenoweth JG, Anderson PD, Nadeau JH, Redline RW, McKay RD, Tesar PJ. (2011) Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos. Cell Stem Cell 8(3):318-325.

47. Nichols J, Smith A. (2009) Naive and primed pluripotent states. Cell Stem Cell 4:487-492.

48. Telugu BP, Ezashi T, Roberts RM. (2010) Porcine induced pluripotent stem cells analogous to naïve and primed embryonic stem cells of the mouse. Int J Dev Biol. 54:1703-1711.

49. 丹羽仁史. (2012) 幹細胞の多様性を規定する分子機構. 領域融合レビュー. 1:e008

50. Hewitson L, Takahashi D, Dominko T, Simerly C, Schatten G. (1998) Fertilization and embryo development to blastocysts after intracytoplasmic sperm injection in the rhesus monkey. Hum Reprod. 13:3449-3455.

51. Nusser KD, Mitalipov S,Widmann A, Gerami-Naini B, Yeoman RR, Wolf DP. (2001) Developmental competence of oocytes after ICSI in the rhesus monkey. Hum Reprod. 16:130-137.

52. Ogonuki N, Tsuchiya H, Hirose Y, Okada H, Ogura A, Sankai T. (2003) Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Hum Reprod. 18:1273-1280.

53. Hayes ES, Curnow EC, Trounson AO, Danielson LA, Unemori EN. (2004) Implantation and pregnancy following in vitro fertilization and the effect of recombinant human relaxin administration in *Macaca fascicularis*. Biol Reprod. 71:1591-1597.

54. Ng SC, Chen N, Yip WY, Liow SL, Tong GQ, Martelli B, et al. (2004) The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a nonhuman primate. Development 131:2475-2484.

55. Wolf DP, Alexander M, Zelinski-Wooten M, Stouffer RL. (1996) Maturity and fertility of rhesus monkey oocytes collected at different intervals after an ovulatory stimulus (human chorionic gonadotropin) in in vitro fertilization cycles. Mol Reprod Dev. 43:76-81.

56. Cseh S, Corselli J, Chan P, Bailey L. (2002) Superovulation using recombinant human FSH and ultrasound-guided transabdominal follicular aspiration in baboon (*Papio anubis*). Anim Reprod Sci. 70:287-293.

57. VandeVoort CA, Leibo SP, Tarantal AF. (2003) Improved collection and developmental competence of immature macaque oocytes. Theriogenology 59:699-707.

58. Marshall VS, Browne MA, Knowles L, Golos TG, Thomson JA. (2003) Ovarian stimulation of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) using recombinant human follicle stimulating hormone. J Med Primatol. 32:57-66.

59. Yoshimoto N, Shimoda K, Mori Y, Honda R, Okamura H, Ide Y, Nakashima T, Nakagata N, Torii R, Yoshikawa Y, Hayasaka I. (2005) Ovarian follicular development stimulated by leuprorelin acetate plus human menopausal gonadotropin in chimpanzees. J Med Primatol. 34:73-85.

60. Okano H, Temple S. (2009) Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. Curr Opin Neurobiol. 19:112-119.

61. Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. (2004). Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. Dev Biol. 275:124-142.

62. Li XJ, Hu BY, Jones SA, Zhang YS, Lavaute T, Du ZW, Zhang SC. (2008) Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. Stem Cells 26:886-893.

63. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotechnol. 27:275-280.

64. Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O. (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. Proc Natl Acad Sci USA. 106:3225-3230.

65. Patani R, Compston A, Puddifoot CA, Wyllie DJ, Hardingham GE, Allen ND, Chandran S. (2009) Activin/nodal inhibition alone accelerates highly efficient neural conversion from human embryonic stem cells and imposes a caudal positional identity. PLoS One 4:e7327.

66. Wada T, Honda M, Minami I, Tooi N, Amagai Y, Nakatsuji N, Aiba K. (2009) Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells. PLoS One 4:e6722.

67. Engberg N, Kahn M, Petersen DR, Hansson M, Serup P. (2010). Retinoic acid synthesis promotes development of neural progenitors from mouse embryonic stem cells by suppressing endogenous, Wnt-dependent nodal signaling. Stem Cells 28:1498-1509.

68. Kim DS, Lee JS, Leem JW, Huh YJ, Kim JY, Kim HS, Park IH, Daley GQ, Hwang DY, Kim DW. (2010) Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. Stem Cell Rev. 6:270-281.

69. Sartore RC, Campos PB, Trujillo CA, Ramalho BL, Negraes PD, Paulsen BS, Meletti T, Costa ES, Chicaybam L, Bonamino MH, Ulrich H, Rehen SK. (2011) Retinoic acid-treated pluripotent stem cells undergoing neurogenesis present increased aneuploidy and micronuclei formation. PLoS One 6:e20667.

70. Terashima M, Kobayashi M, Motomiya M, Inoue N, Yoshida T, Okano H, Iwasaki N, Minami A, Matsuoka I. (2010) Analysis of the expression and function of BRINP family genes during neuronal differentiation in mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. J Neurosci Res. 88:1387-1393.

71. Tonge PD, Andrews PW. (2010) Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. Differentiation 80:20-30.

72. Xu J, Wang H, Liang T, Cai X, Rao X, Huang Z, Sheng G. (2012) Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture. Mol Biol Rep. 39(2):789-795.

73. Zhou J, Su P, Li D, Tsang S, Duan E, Wang F. (2010) High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor β superfamily receptors. Stem Cells 28:1741-1750.

74. Yuan SH, Martin J, Elia J, Flippin J, Paramban RI, Hefferan MP, Vidal JG, Mu Y, Killian RL, Israel MA, Emre N, Marsala S, Marsala M, Gage FH, Goldstein LS, Carson CT. (2011) Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. PLoS One 6:e17540.

75. Shimada H, Okada Y, Ibata K, Ebise H, Ota S, Tomioka I, Nomura T, Maeda T, Kohda K, Yuzaki M, Sasaki E, Nakamura M, Okano H. (2012) Efficient derivation of multipotent neural stem/progenitor cells from non-human primate embryonic stem cells. PLoS One 7:e49469.

76. Farnsworth SL, Qiu Z, Mishra A, Hornsby PJ. (2013) Directed neural differentiation of induced pluripotent stem cells from non-human primates. Exp Biol Med (Maywood). 238:276-284.

77. Li Y, Liu M, Yan Y, Yang ST. (2014) Neural differentiation from pluripotent stem cells: The role of natural and synthetic extracellular matrix. World J Stem Cells. 6:11-23.

78. Honjo S, Cho F and Terao K. (1984) Establishing the cynomolgus monkey as a laboratory animal: Research on non-human primate. Adv Vet Sci Comp Med. 28:51-80.

79. Shimozawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T. (2007) Comparison of methods to stimulate ovarian follicular growth in cynomolgus and African green monkeys for collection of mature oocytes. Theriogenology 67:1143-1149.

80. 豊田 裕, 横山峯介, 星冬四郎. (1971) マウス卵子の体外受精に関する研究。I.精巣上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌. 16:147-151.

81. Edwards RG. (1965) Maturation in vitro of human ovarian oöcytes. The Lancet. 2(7419):926-929.

82. Sankai T, Terao K, Yanagimachi R, Cho F, Yoshikawa Y. (1994) Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). J Reprod Fertil. 101:273-278.

83. Okada A, Igarashi H, Kuroda M, Terao K, Yoshikawa Y, Sankai T. (2001) Cryopreservation-induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Hum Reprod. 16:2139-2147.

84. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. (1989) An improved culture medium supports development of randombred 1-cell mouse embryos in vitro. J Reprod Fertil. 86:679-688.

85. Okano H. (2010) Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 86:438-450.

86. Hasegawa K, Fujioka T, Nakamura Y, Nakatsuji N, Suemori H. (2006) A method for the selection of human embryonic stem cell sublines with high replating efficiency after single-cell dissociation. Stem Cells 24:2649-2660.

87. Ellerström C, Strehl R, Noaksson K, Hyllner J, Semb H. (2007) Facilitated expansion of human embryonic stem cells by single-cell enzymatic dissociation. Stem Cells 25:1690-1696.

88. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 25:681-686.

89. Livesey JH, Roud HK, Metcalf MG, Donald RA. (1983) Glycerol prevents loss of immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone from frozen urine. J Endocrinol. 98:381-384.

90. Kanayama K, Sankai T, Nariai K, Endo T, Sakuma Y. (1994) Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. J Vet Med Sci. 56:599-600.

91. Sugano M, Shinogi T. (1999) Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Anim Reprod Sci. 55:175-181.

92. D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellitti A. (2001) Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP):effects of PVP molecular weight, concentration and

schedule of treatment. Anim Reprod Sci. 5:255-264.

93. Yamashita A, Takada T, Yamamoto G, Torii R. (2006) Stable maintenance of monkey embryonic stem cells in the absence of bFGF. Transplant Proc. 38:1614-1615.

94. Wunderlich S, Haase A, Merkert S, Beier J, Schwanke K, Schambach A, Glage S, Göhring G, Curnow EC, Martin U. (2012) Induction of pluripotent stem cells from a cynomolgus monkey using a polycistronic simian immunodeficiency virus-based vector, differentiation toward functional cardiomyocytes, and generation of stably expressing reporter lines. Cell Reprogram 14:471-484.

95. Okahara-Narita J, Umeda R, Nakamura S, Mori T, Noce T, Torii R. (2012) Induction of pluripotent stem cells from fetal and adult cynomolgus monkey fibroblasts using four human transcription factors. Primates 53:205-213.

96. Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y. (2013) Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. Differentiation 85:131-139.

97. Wunderlich S, Kircher M, Vieth B, Haase A, Merkert S, Beier J, Göhring G, Glage S, Schambach A, Curnow EC, Pääbo S, Martin U, Enard W. (2014) Primate iPS cells as tools for evolutionary analyses. Stem Cell Res. 12:622-629.

98. Zhao Y, Matsuo-Takasaki M, Tsuboi I, Kimura K, Salazar GT, Yamashita T, Ohneda O. (2014) Dual functions of hypoxia-inducible factor 1 alpha for the commitment of mouse embryonic stem cells toward a neural lineage. Stem Cells Dev. 23:2143-2155.

99. Gil JE, Woo DH, Shim JH, Kim SE, You HJ, Park SH, Paek SH, Kim SK, Kim JH. (2009) Vitronectin promotes oligodendrocyte differentiation during neurogenesis of human embryonic stem cells. FEBS Lett. 583:561-567.

100. Izrael M, Zhang P, Kaufman R, Shinder V, Ella R, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Chebath J, Revel M. (2007) Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo. Mol Cell Neurosci. 34(3):310-323.

101. Ahn S, Joyner AL. (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. Nature 437:894-897.

102. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human haematopoetic cells via BMP regulation. Nat Immunol. 2:172-180.

103. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS. (2006) Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. Cancer Res. 66:6063-6071.

7. 謝辞

長きにわたり、暖かい御指導、御鞭撻を賜りました生命システム医学専攻モデル動物学研究室の八神健一教授、杉山文博准教授、國田智講師（現　自治医科大学教授）、水野聖哉助教に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、カニクイザルの繁殖生理学・発生工学については独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターの山海 直 主任研究員、同じく資源開発研究室の下澤律浩主任研究員に、カニクイザルの神経系細胞の検討については同じく疾患制御研究室の木村展之主任研究員（現　国立長寿医療研究センター認知症先端医療研究センターアルツハイマー病研究部・病因遺伝子研究室室長）に、ES細胞の樹立および特性解析については京都大学再生医科学研究所幹細胞研究部門発生分化研究分野の中辻憲夫教授、同じく胚性幹細胞研究分野の末盛博文准教授、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室小倉淳郎室長、同じく本多 新 特別研究員（現　宮崎大学テニュアトラック准教授）に終始懇切丁寧な御指導と適切な御助言を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

また、カニクイザルの飼育管理を担当して頂いた一般社団法人予防衛生協会の皆様に感謝の意を表します。

最後に、長年の研究生活を支えて頂いた両親の羽鳥今朝雄様、羽鳥真理子様に、同じく暖かく御支援頂いた義父母の黒沼英昭様、黒沼春江様に、そして常に寄り添い苦労を共にし、応援してくださいました妻の羽鳥真弓様に感謝致します。

Fig.1.　カニクイザル（cynomolgus monkey）の雌雄成熟個体と飼育環境

独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにて飼育されているカニクイザルの雄（左）と雌（右）の標準個体。通常は一頭ずつ個別のケージにて飼育されるが、自然繁殖のためにケージを連結し同居させている環境を撮影したものである（A）。それぞれのケージサイズは幅 0.50 m、奥行き 0.86 m（床面積 0.43 m^2）、高さ 0.80 m であり、米国立衛生研究所（National Institutes of Health : NIH）の基準を満たしている（B）。個々の飼育室にケージが壁に掛けられており、交配や群れ飼育等の飼育環境に合わせられるよう、隣り合ったケージを連結することが可能である。このような飼育室が複数あり、繁殖や研究用などそれぞれの用途に合わせて、設置されているケージの数は異なっている（C）。

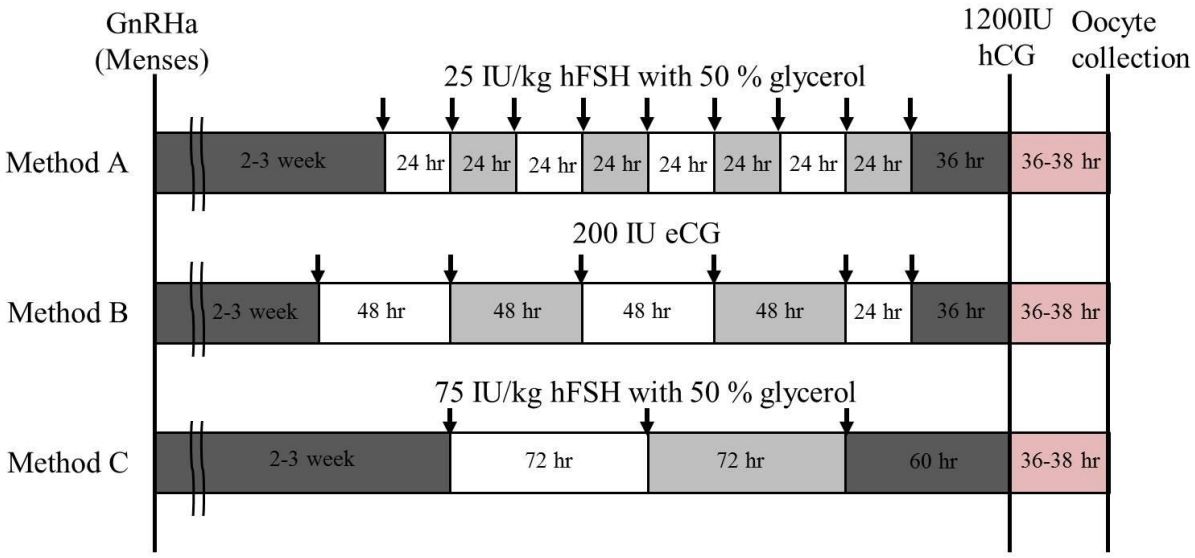

Fig. 2.　カニクイザルにおける卵胞発育誘起方法

カニクイザル雌個体に対し、2 種類のホルモン製剤および接種間隔の異なる 3 種の方法により卵胞発育誘起を行った。性周期 1 日目に GnRH アゴニストを投与した 2～3 週間後、それぞれ、25 IU/kg hFSH を 9 回皮下投与する方法（Method A）、200 IU eCG を 6 回静脈内へ投与する方法（Method B）、75 IU/kg hFSH を 3 回皮下投与する方法（Method C）で卵胞刺激を行い、最終投与から 36 時間後に hCG を静脈内へ投与した。矢頭は hFSH および eCG を投与するタイミングを示す。GnRHa　: gonadotropin-releasing hormone agonist、hFSH : human follicular stimulating hormone、eCG : equine chorionic gonadotropin、hCG : human chorinic gonadotropin

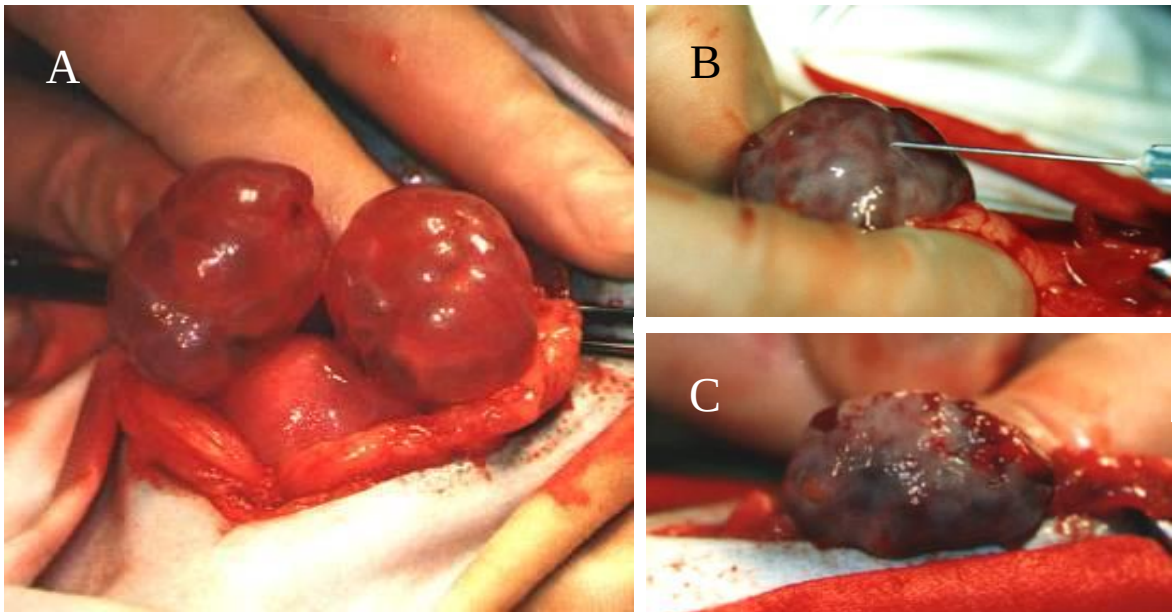

Fig. 3.　カニクイザル卵巣からの卵子の採取

hFSH および eCG、それに続く hCG の投与による卵胞発育誘起により成熟した卵胞（A）から 25 ゲージ注射針を接続した 2 ml シリンジを用いて卵子を含む卵胞液を吸引、採取を行う（B）。卵胞液吸引後の収縮した卵巣（C）。

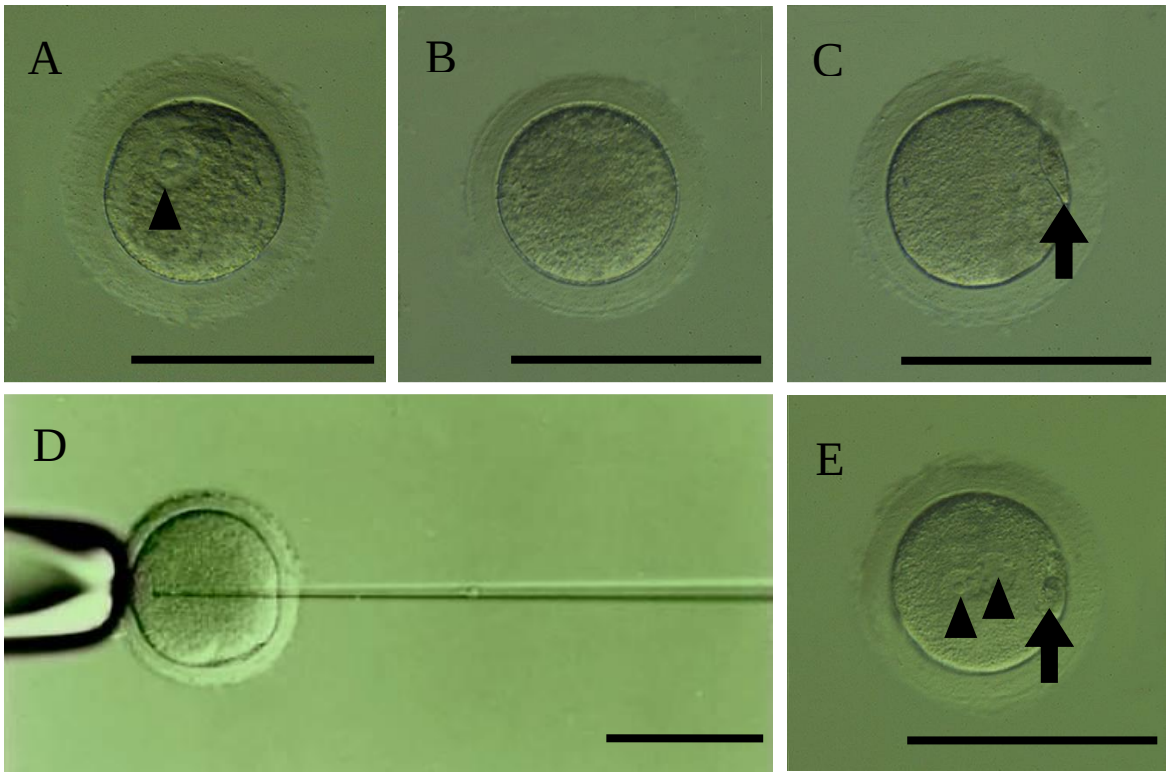

Fig. 4.　カニクイザル卵子と ICSI による顕微授精

卵胞発育誘起により採取した卵子はその成熟段階により 3 種類、つまり卵核胞（矢頭）をもつ GV 期卵（A）、卵核胞が崩壊した GVBD 期卵（B）、第一極体（矢印）を放出した M II 期卵（C）に分類した。もっとも成熟した段階にある M II 期卵に対し ICSI により顕微授精を行った（D）。雌雄前核（矢頭）と第二極体（矢印）をもつ正常な受精卵（E）が認められた。スケールバーは 100 μm。

Table 1. 各卵胞発育誘起法により採取したカニクイザル卵子数と成熟度

卵胞発育誘起方法	頭数	採取した卵子数	各成熟段階の卵子数と比率		
			M II 期卵	GVBD 期卵	GV 期卵
Method A (25 IU/kg hFSH : 9 回)	7	31±12 *	12±6 (38.7%)	8±4 (25.8%)	9±3 (29.0%)
Method B (200 IU eCG : 6 回)	8	18±4	7±2 (38.9%)	4±3 (22.2%)	7±2 (38.9%)
Method C (75 IU/kg hFSH : 3 回)	5	21±4 **	10±3 (47.6%)	3±2 (14.3%)	7±1 (33.3%)

* : P=0.50、** : P=0.57

それぞれの比率は（各成熟段階の卵子数 / 採取した卵子数）である。

Table 2 各卵胞発育誘起法により採取したカニクイザル卵子の受精能

卵胞発育誘起方法	頭数	卵子数	**生存卵子数**	受精率			受精しなかった卵子数
				2PN2PB*	3PN1PB**	1PN2PB***	
Method A (25 IU/kg hFSH : 9 回)	4	62	53 (85.5%)	28 (45.2%)	2 (3.2%)	1 (1.6%)	22 (41.5%)
Method B (200 IU eCG : 6 回)	1	8	8 (100%)	8 (100%)			

*2PN2PB：雌雄前核と第一、第二極体をもつ正常な受精卵

**3PN1PB：3 前核と一つの極体を持つ異常な受精卵

***1PN 2PB：1 前核と第一、第二極体をもつ異常な受精卵

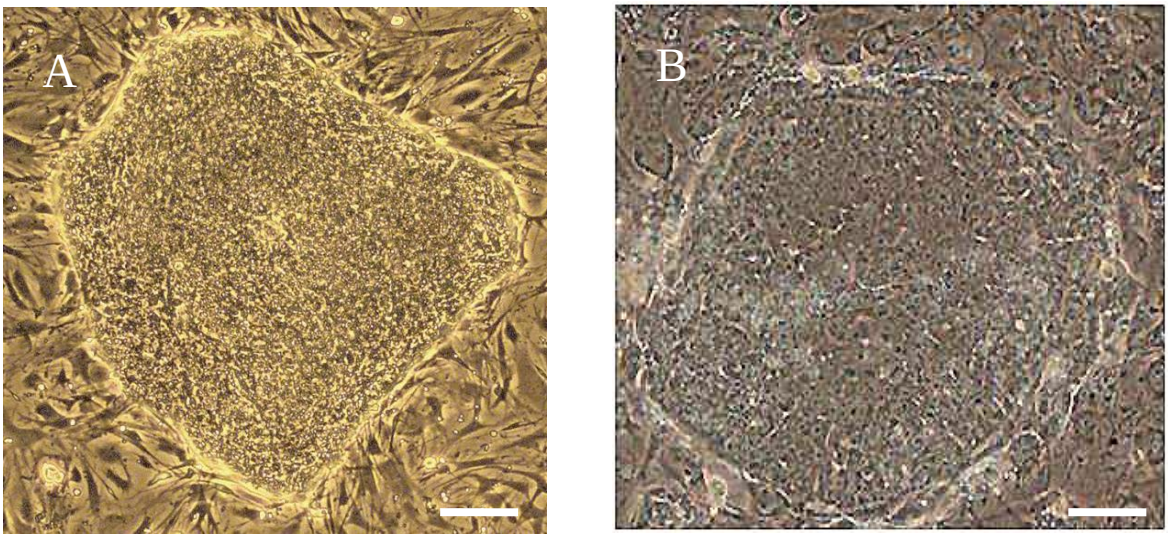

Fig. 5.　新規樹立したカニクイザル ES 様細胞のコロニー

新規樹立した ES 様細胞（A）は標準的なカニクイザル ES 細胞株である CMK6 細胞（B）と類似したコロニー形態を示した。スケールバーは 100 μm。

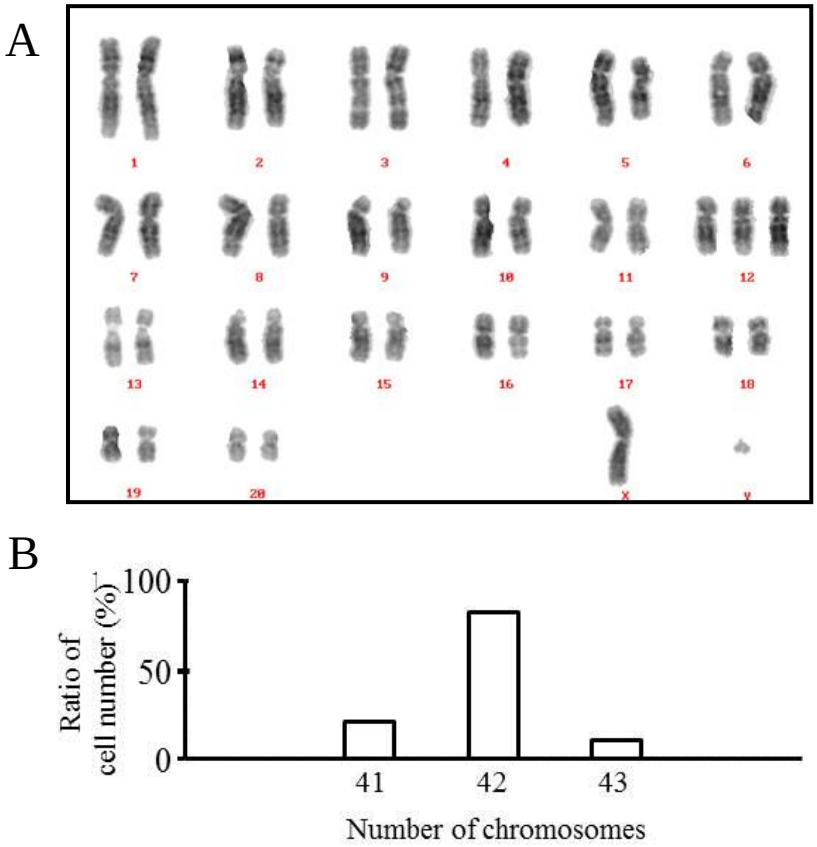

Fig. 6.　新規樹立した ES 様細胞の染色体分析

染色体分析の結果、18 世代目の ES 様細胞において観察した染色体像（A）および染色体の分布（B）。細胞総数の約 80%（159/200）が正常な染色体数（42 本）で、性染色体として XY を有していた。

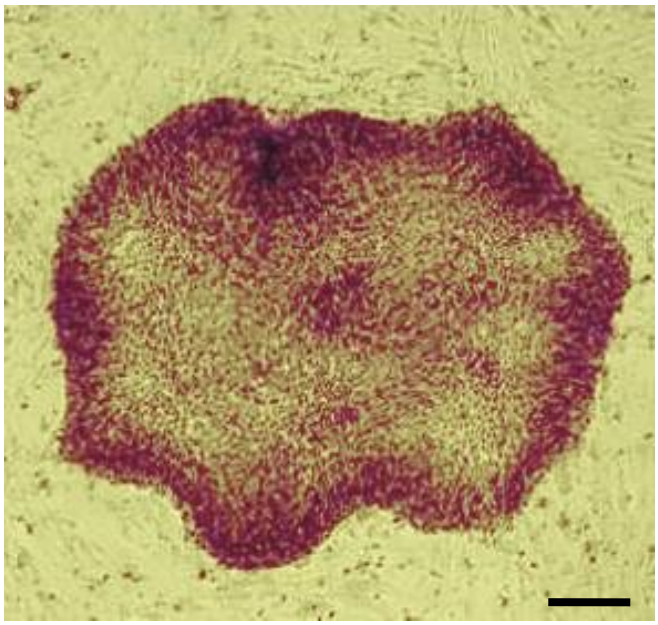

Fig. 7.　ALP 染色による未分化性の解析

ALP 染色により新規樹立した ES 様細胞（A）のコロニーが赤色に染色され ALP の発現を認めた。ES 様細胞のコロニーを取り囲んでいるフィーダー細胞では染色されていない。スケールバーは 100 μm。

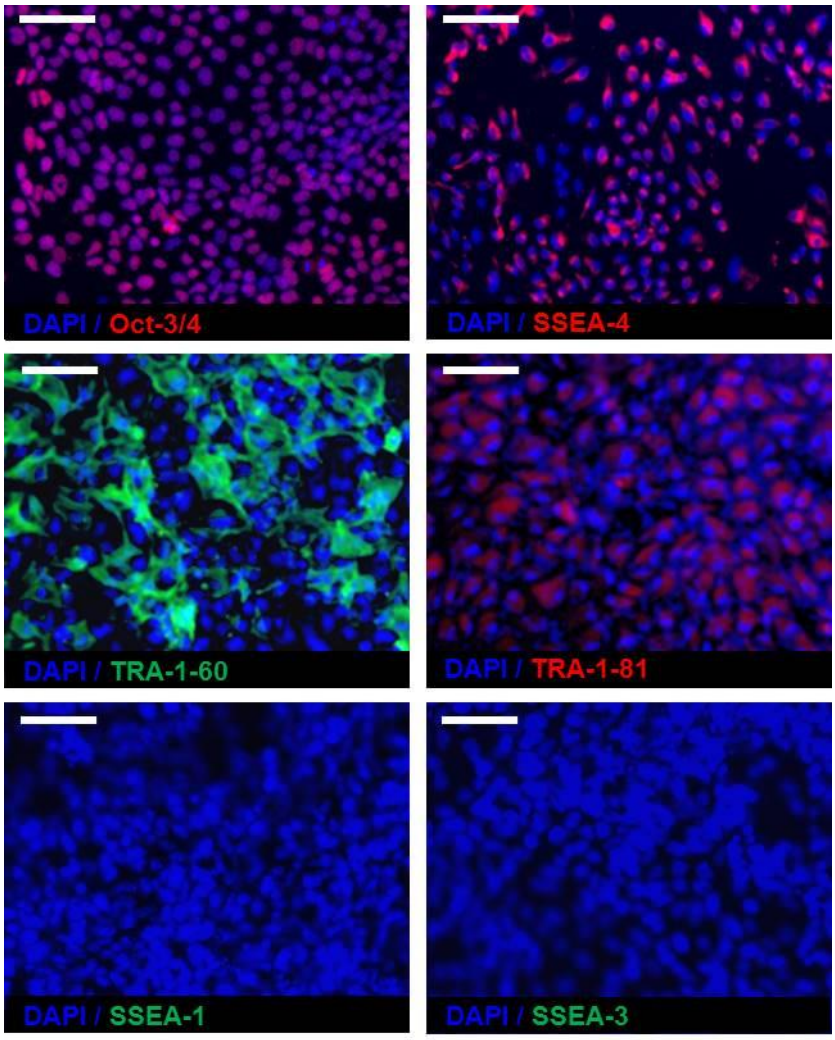

Fig. 8.　免疫蛍光抗体染色法による未分化マーカーの発現

免疫蛍光抗体染色法による未分化マーカー発現の確認を行った。未分化マーカーである Oct-3/4 陽性細胞（赤色）、SSEA-4 陽性細胞（赤色）、TRA-1-60 陽性細胞（緑色）、TRA-1-81 陽性細胞（赤色）が認められた。一方、SSEA-1（緑色）および SSEA-3（緑色）の陽性細胞は認められなかった。DAPI（青色）は各細胞の核を示す。スケールバーは 100 μm。

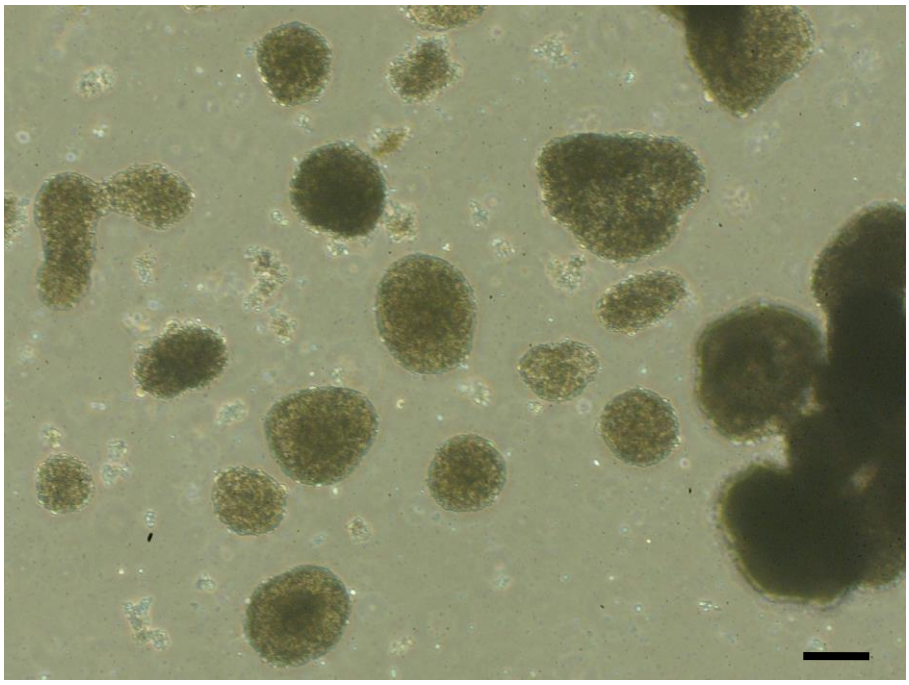

Fig. 9.　新規樹立した ES 様細胞の EB 形成

FGF2 を添加していない m-ES 細胞培養液を用いて、非接着性のペトリディッシュにて浮遊培養を行った。培養 3 日後。スケールバーは 200 μm。

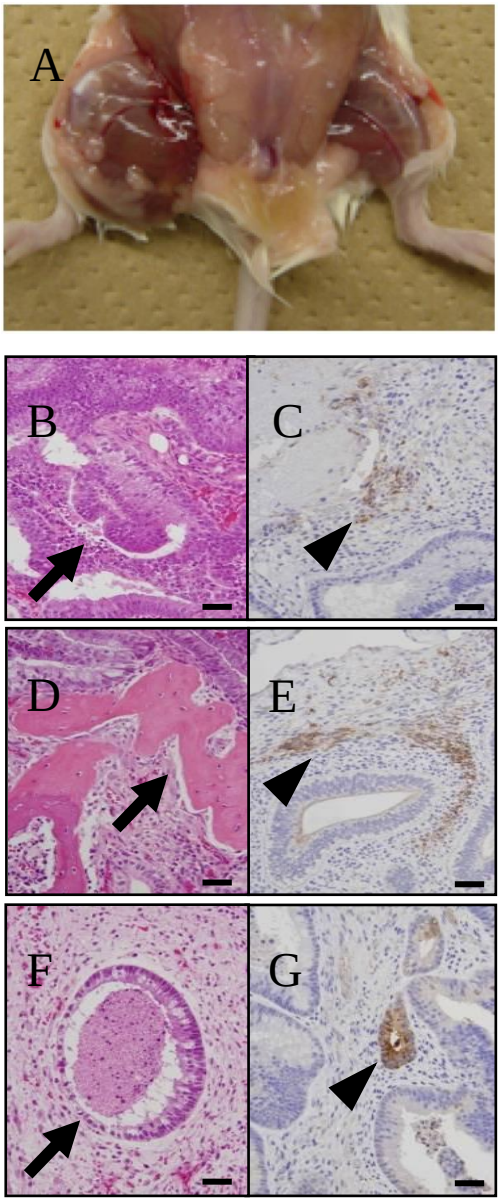

Fig. 10.　テラトーマ形成と *in vivo* で分化した ES 細胞

免疫不全マウス（NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J）の片側の後脚の大腿筋中に 1 頭あたり約 1×10^{6} 個/ml の FGF2 低依存性 ES 様細胞を含む懸濁液を 1 ml 移植し、形成した腫瘤（A）に対しヘマトキシリン・エオジン染色、および免疫ペルオキシターゼ染色を行った。外胚葉由来組織である皮膚組織（B、矢印）と神経細胞マーカーの synaptophysin 陽性細胞（C、矢頭）、中胚葉由来組織である骨（D、矢印）と平滑筋細胞マーカーの α-smooth muscle actin 陽性細胞（E、矢頭）、内胚葉由来組織である消化腺（F、矢印）と肝細胞マーカーの α-fetoprotein 陽性細胞（G、矢頭）が観察された。スケールバーは 100 μm。

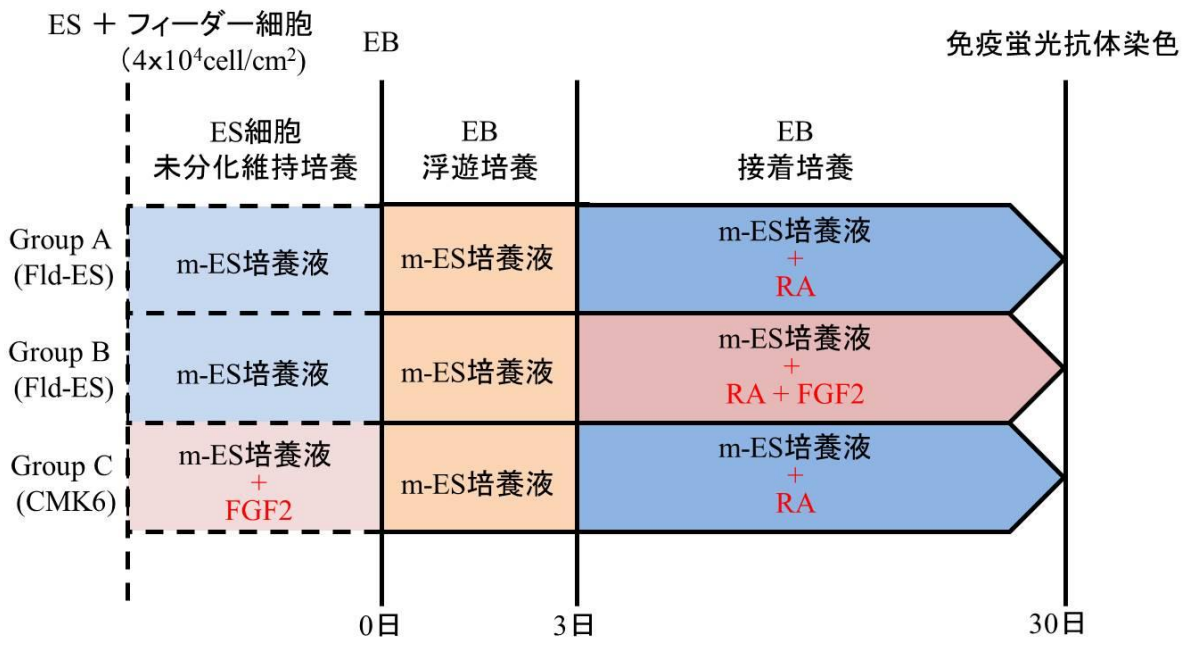

Fig. 11.　カニクイザル ES 細胞の分化誘導スケジュール

FGF2 を添加しない m-ES 細胞培養液で維持培養を行った Fld-ES 細胞を RA のみで分化誘導を行う方法（Group A）、同じく Fld-ES 細胞を RA と FGF2 で分化誘導を行う方法（Group B）、FGF2 を添加した m-ES 細胞培養液で維持培養を行った CMK6 細胞を RA のみで分化誘導を行う方法（Group C）により、RA および FGF2 がカニクイザル ES 細胞の神経系細胞への分化誘導を細胞マーカーの免疫蛍光抗体染色法により検討した。

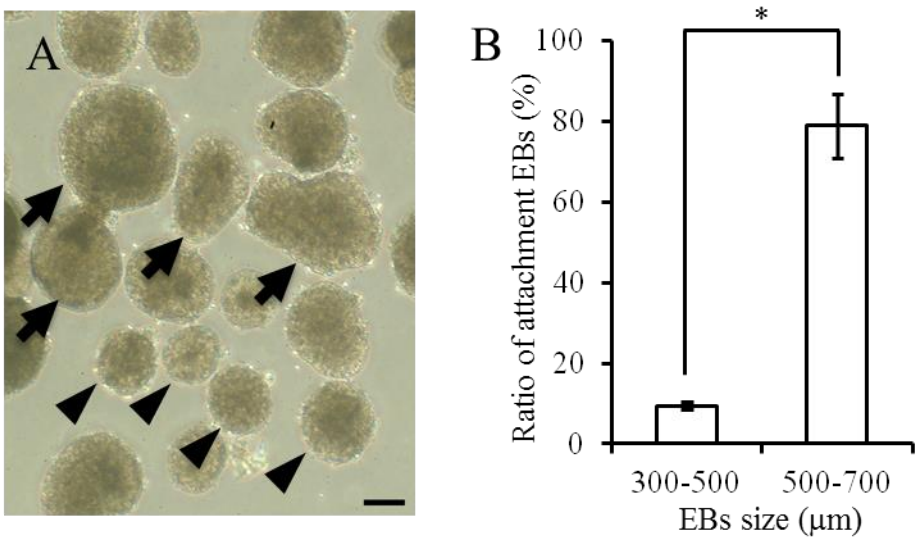

Fig. 12.　EB のサイズにおける接着率

Fld-ES 細胞より 3 日間形成された EB を直径 500～700 μm（矢印）の大きさのものと直径 300～500 μm（矢頭）の大きさのもので選別し、接着培養時のそれぞれの接着率を比較したところ、78.9%（45/57）、9.5%（6/63）と有意差が認められた（$P<0.05$）。スケールバーは 200 μm。

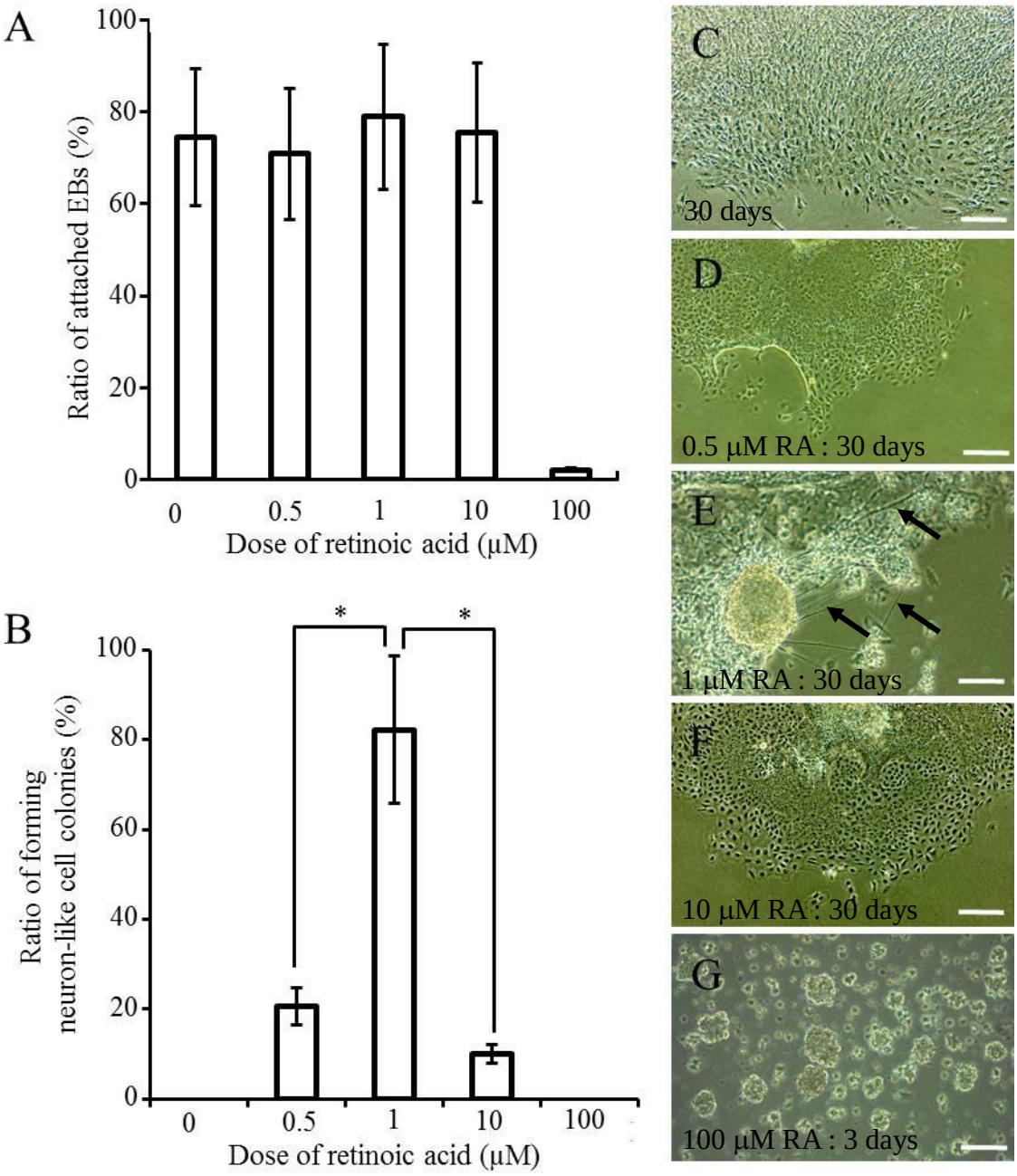

Fig. 13.　RA 濃度による EB の接着率および神経線維状構造の出現率

Fld-ES 細胞株から形成した EB を最終濃度 0.5 μM、1 μM、10 μM、100 μM の RA を添加した m-ES 細胞培養で培養を行い、また、コントロールとして RA を添加していない培養条件にて EB の接着培養を行った。EB の接着率はそれぞれ 70.8%（34/48）、78.9%（45/57）、75.5%（40/53）、2.1%（1/47）、74.5%（38/51）となり 0.5 μM、1 μM、10 μM およびコントロールでは差は認められなかった（A）。接着培養を開始してから

30 日後に、1 μM RA を添加した条件で接着培養を行った EB 由来のコロニーにおいて 82.2％（37/45）のコロニーで神経線維と推測される構造の出現を確認した（B、E、矢印）。コントロールおよび 0.5 μM、10 μM の RA を添加した培養条件下では、神経線維状の構造が確認できなかった（C、D、F）。100 μM の RA を添加した培養条件下では、接着培養開始から 3 日後では接着したコロニーの形成が認められなかった（G）。＊：$P<0.05$。スケールバーは 200 μm。

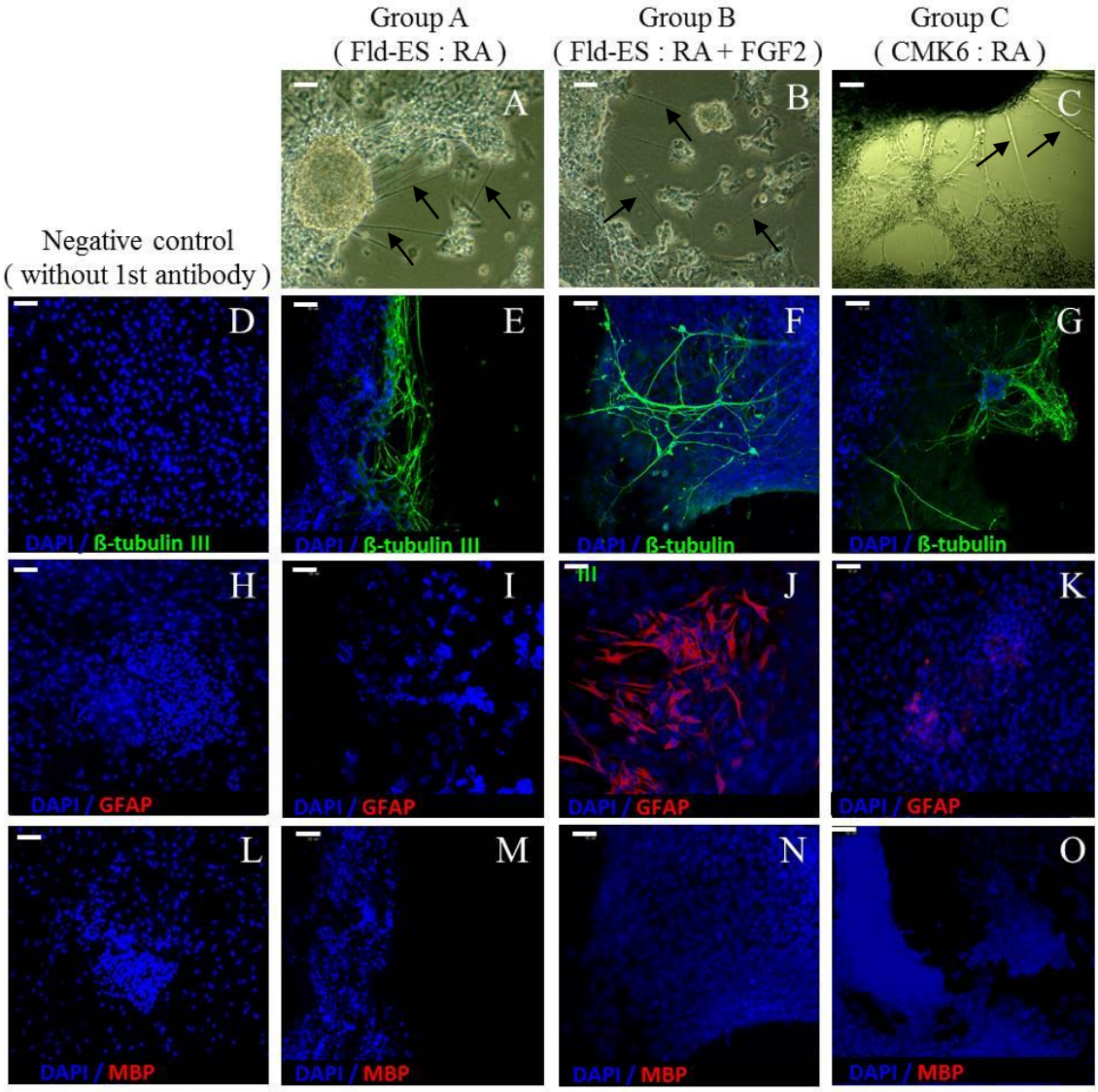

Fig. 14.　カニクイザル ES 細胞から分化誘導した神経系細胞

全ての Group で神経線維状の構造が確認され（A-C、矢印）、神経細胞の細胞マーカーであるβ-tubulin III 陽性細胞（緑色）への分化（E-G）が確認された。Group B および Group C でアストロサイトの細胞マーカーである GFAP 陽性細胞（赤色）への分化が認められた（J）が、Group C においては GFAP 陽性細胞へ分化した細胞は極僅かであり（K）、Group A では認められなかった（I）。全ての Group においてオリゴデンドロサイトの細胞マーカーである MBP 陽性細胞への分化は認められなかった（M-O）。ネガティブコントロールとして、それぞれの一次抗体を除いた条件で二次抗体により染色した（D、H、L）。青色は各細胞の核を示す。スケールバーは 200 μm。