

発育鶏卵を用いたテラトーマ形成試験のバリデーション評価

山口大学共同獣医学部・助教（テニュアトラック） 今井 啓之

■ 緒言

胚性幹細胞や誘導多能性幹細胞をはじめとする多能性幹細胞は、基礎研究から臨床応用まで、研究用途は多岐にわたり、それぞれの研究目的に応じた品質管理が重要である。これらの多能性幹細胞の品質の指標としてゲノム DNA のメチル化修飾やマーカー遺伝子の発現動態が挙げられる¹⁾。これらの指標では細胞の品質の予測はできるものの、幹細胞の腫瘍化や分化抵抗性等を含めた細胞の状態の精密な把握には実際の分化誘導後の表現型の検証が必要である。したがって、幹細胞の性状の包括的な把握にあたっては、in vivo での動物を用いた試験が必要である。

しかしながら動物を用いた in vivo 環境での試験では、飼育環境の整備や数ヶ月単位での経過観察、多数の動物の使用が必要となり、研究遂行の障壁となっている。そこで本研究では in vivo 試験のうち特にテラトーマ形成試験について、代替法の確立とそのバリデーション評価を目的とした。

そこで本研究では発育鶏卵に着目した。発育鶏卵は SCAW 分類で動物実験に該当しない期間を含み、占有場所が小さく、動物個体と比較して安価である。古くからウイルスや微生物などの分離に用いられてきたが、近年担がん試験の代替法として注目されつつある。本研究では、この方法を多能性幹細胞のテラトーマ形成試験への展開を行うため、マウス胚性幹細胞を用いた試験を行った。

■ 方法

1. 鶏卵における腫瘍形成での接種部位・期間のプロトコルの最適化

プロトコルの確立にあたり、接種部位は既存の鶏卵接種法を参考にした^{2,3)}。発育鶏卵は深川養鶏より購入した。接種部位と期間の探索には接種後の腫瘍形成を追跡するためにマウスメラノーマ細胞株(B16F10 細胞株)を用い、分化状態の類似した細胞としてマウステラトカルシノーマ細胞株(F9 細胞株)を用いた。接種部位は尿膜腔内、漿尿膜上の2方法の比較を行い、10日齢卵の各部位に接種して2, 4, 6日間孵卵器でインキュベートし、観察を行った。接種後の転卵は行わなかった。

細胞の培養はRPMI培地にウシ胎児血清、抗生物質を添加したものをを用いた。接種担材としてHBSSにウシ胎児血清を加えたものをを用い、1接種あたり100 μ Lを注入した。細胞接種に先立ち、ヒビテンアルコール浸漬綿にて卵表面を十分に清拭し、接種後は粘着テープにより卵殻を塞いだ。

観察は滅菌シャーレ内で行い、必要に応じて組織化学解析や遺伝子発現解析を行った。組織化学解析にあたり、中性緩衝ホルマリンまたはブアンにより固定を行い、定法に従ってパラフィン包埋および薄切ののちヘマトキシリン-エオジン染色を行った。遺伝子発現解析にあたり、Monarch Genomic DNA Purification Kit および ISOGEN II を用いて核酸を回収し、各種実験に用いた。肉眼観察およびゲノム DNA を用いた PCR により生着率を算出し、total RNA を用いた遺伝子発現解析により生着状態をモニタリングした。

2. マウス胚性幹細胞を用いた発育鶏卵におけるテラトーマ形成試験

マウス胚性幹細胞株は著者らが作出し保管したもの⁴⁾を用いた。ESGRO plus complete clonal grade 培地に Knockout Serum Replacement および抗生物質を添加したものをを用いて培養し、接種担材に HBSS に Knockout Serum Replacement を添加したものをを用いた。解析は上述の通り行った。

3. 従来のテラトーマ形成試験との比較

免疫不全マウスとして C.B-17/IcrHsd-Prkdc^{scid} を用いた。上述のマウス胚性幹細胞をマトリゲルを担材として皮下接種を行った。経過観察を行い、採材した。動物の飼育は SPF 環境下で AAALAC International 認証施設 (ARCLAS) で行った。

4. 動物について

動物の使用は山口大学山口地区動物使用委員会の許可を受けた上で行った(承認番号:503)。発育鶏卵の使用について19日齢までSCAW分類のカテゴリーAのため動物実験に該当しないものの、生命に対する敬意をもって人道的な取り扱いを行った。

■ 結果

1. 鶏卵における腫瘍形成での接種部位・期間のプロトコルの確立

一般細胞株を用いて実験を行った。肉眼的に黒色として視認できるメラノーマに由来する細胞株である B16F10 細胞、未分化なテラトカルシノーマに由来する F9 細胞株を用いた。鶏卵への接種部位を探索するために、尿膜腔内接種および漿尿膜上接種を行った。接種後、2, 4, 日後に観察を行ったところ、漿尿膜上接種法において、生着した腫瘍塊が得られることがわかった(表 1)。また、生着率について、接種後の期間が長いほど観察により得られる腫瘍塊が多かった。得られた腫瘍の塊は、漿尿膜上の黒色のメラノーマ様細胞塊として認められ(図 1A)、漿尿膜と細胞塊の分離は困難であった(図 1B)。組織化学解析を行ったところ、漿尿膜の内部への黒色の細胞の浸潤が認められた(図 1C)これは移植した B16F10 細胞が漿尿膜へ生着したことを示している。

続いて F9 細胞株を用いて同様の実験を行った。接種 4 日後と 6 日後の生着率に違いは見られなかった(表 2)。接種後の肉眼観察では、漿尿膜内に乳白色の腫瘍塊様構造が観察された(図 2A)。組織化学解析を行ったところ、結合組織を主とした漿尿膜内にヘマトキシリン好性の細胞集団が認められ、がん組織に特徴的な細胞分裂像も多数観察された(図 2B)。接種前の細胞と接種後の腫瘍塊における遺伝子発現解析を行ったところ、F9 細胞のマーカー遺伝子 *Dmrt1*, *Tex13*, *Stra8* の発現が両細胞・組織内で認められた(図 2C)。また、遺伝子オントロジー解析を行ったところ、乳白色腫瘍様塊において多数の GO タームがエンリッチした(表 3)。特に LIF への細胞応答や多細胞生物発生、細胞分化などは F9 細胞株の由来組織であるテラトカルシノーマを反映したものであると推察される。これにより接種後に得られた腫瘍塊は F9 細胞株が漿尿膜へ生着し形成した腫瘍組織であることが示された。

以上から、10 日齢の発育鶏卵に細胞を接種後、6 日間のインキュベートにて腫瘍形成を再現できる方法として検証の上、確立した。

2. マウス胚性幹細胞を用いたテラトーマ形成試験

ここまでで発育鶏卵を用いた一般細胞株を用いた腫瘍形成試験の方法を検証し、確立した。次に実際のマウス胚性幹細胞を用いたテラトーマ形成試験を従来法と発育鶏卵法とで比較した。まず上述の方法で発育鶏卵へマウス胚性幹細胞を接種した結果、接種 6 日後において漿尿膜内に乳白色の腫瘍塊様構造が観察された(図 3A)。組織化学解析を行ったところ、エオジン好性の腺房様構造や粘膜上皮様構造、角化重層扁平上皮様構造が観察された(図 3B)。以上から発育鶏卵内でのテラトーマの形成に成功したと判断した。従来法として免疫不全マウスを用いた手法を行った。その結果、平均して 3 週間程度でテラトーマの形成が確認された(図 3C)。

■ 考察

マウス多能生幹細胞のテラトーマ形成試験の *in vitro* 代替法の確立として発育鶏卵接種によるテラトーマ形成試験の開発を試みた。まず、プロトコルの検証と確立のために一般細胞株を用いた。細胞自体が黒色で視認しやすいメラノーマ細胞株である B16F10 細胞株およびテラトカルシノーマに由来する分化能を有する F9 細胞株を用いた。その結果、10 日齢の発育鶏卵に接種後 6 日間のインキュベートにより腫瘍の良好な生着を確認できた。インキュベートの期間を長くすれば形成される腫瘍も大きくなることから、インキュベート期間をさらに延長することで確認できる腫瘍も多くなることが予想される。しかしながら、19 日齢を超えると鶏卵内の胚が痛みを感じるため、むやみな期間の延長は動物福祉上好ましくない。また、各鶏卵の発生の個体差を考慮し、孵化期間の±10%程度と見積もり、本研究では最大 16 日齢までのインキュベートに留めた。近年では動物試験の代替法開発が盛んになりつつあり、発育鶏卵を活用した試験方法が提案されているものの、開発が先行し鶏卵の動物福祉に配慮した報告は依然として少ない。最近、発育鶏卵の苦痛度を評価する方法が報告され⁵⁾、より詳細なガイドラインが構築できれば、本プロトコルもより堅牢なものになりうるだろう。

検証及び確立したプロトコルを活用してマウス胚性幹細胞での試験を行った。その結果、一般細胞株と同様に腫瘍形成に成功し、詳細な解析を行ったところテラトーマであると判断した。同一のマウス胚性幹細胞株を用いて免疫不全マウスを用いる従来手法を行ったところ、テラトーマ形成に成功した。以上、免疫不全マウスを用いる従来手法でも、発育鶏卵を用いた新手法でもどちらの方法でもテラトーマ形成試験を実現できることを実証した。従来法と本方法の特徴の比較を表 4 にまとめた。本方法は従来法と比較して試験期間を 1/3 程度に短縮でき、試験単価を 1/60 程度に抑え、動物飼育にかかる餌・水・床材やその他の費用をかけないため、大幅な研究の加速と効率化が実現できた。さらに動物実験への非該当や一般実験室への導入の敷居の低さから今後の活用が期待できると考

える。

■ 要 約

マウス多能生幹細胞の *in vivo* 試験項目の1つのテラトーマ形成試験の代替法の開発を行った。具体的には、一般のがん細胞株を用いてプロトコルの検証と確立を行い、その上でマウス胚性幹細胞を用いて10日齢の発育鶏卵の漿尿膜上接種法を行い、6日間のインキュベートによりテラトーマ形成が確認できた。従来手法と比較して大幅な高効率化に成功した。

■ 文 献

- 1) Koyanagi-Aoi M., Ohnuki M., Takahashi K., Okita K., Noma H., Sawamura Y., Teramoto I., Narita M., Sato Y., Ichisaka T., Amano N., Watanabe A., Morizane A., Yamada Y., Sato T., Takahashi J. and Yamanaka S. (2013) Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analysis of human pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 20569-20574.
- 2) 吉野亀三郎、1978、ふ化鶏卵内培養法、改定二版ウイルス実験学総論、国立予防衛生研究所学友会編、113-129、丸善株式会社(東京都)
- 3) 小松葵、松本光太郎、玉野井冬彦、2019、がんの鶏卵モデル、患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド、佐々木博己編、246-254、羊土社(東京都)
- 4) Imai H., Kano K., Fujii W., Takasawa K., Wakitani S., Hiyama M., Nishino K., Kusakabe K.T., and Kiso Y. (2015) Tetraploid embryonic stem cells maintain pluripotency and differentiation potency into three germ layers. *PLoS ONE.* 10, e0130585.
- 5) Horr M., Sommerfeld S., Silva M.V., and Fonseca B.B. (2023) A fast and simple protocol to anaesthesia in chicken embryos. *Exp. Anim.* In press

表1 B16F10 細胞の接種部位・接種後日数別の生着率

	2日目		4日目		6日目	
	接種数	生着数	接種数	生着数	接種数	生着数
コントロール	9	0	9	0	12	0
尿膜腔	12	0	6	2	6	1
漿尿膜上	30	16	31	23	31	28

表2 F9 細胞の接種後日数別の生着率

	4日目		6日目	
	接種数	生着数	接種数	生着数
コントロール	4	0	13	0
漿尿膜上	26	19	105	76

表 3 漿尿膜上の腫瘍塊の発現遺伝子の GO 解析

GO term (Process)	p-value
cellular response to leukemia inhibitory factor	4.20E-21
negative regulation of transcription by RNA polymerase II	1.40E-10
positive regulation of gene expression	1.90E-08
positive regulation of transcription by RNA polymerase II	2.00E-08
in utero embryonic development	2.50E-08
multicellular organism development	2.90E-08
metabolic process	9.30E-08
cell migration	1.10E-07
regulation of transcription, DNA-templated	1.20E-07
cell differentiation	3.70E-07
regulation of cell shape	1.10E-06
membrane protein ectodomain proteolysis	3.10E-06
G1/S transition of mitotic cell cycle	3.80E-06
protein phosphorylation	4.50E-06
transcription, DNA-templated	6.40E-06
cellular protein localization	7.30E-06

表 4 従来法と本研究で開発した新手法の比較(価格情報は 2023 年 1 月ごろのもの)

	従来手法	新手法
報告数	多数	なし(今回開発)
試験期間	3週間以上	1週間程度
単価	6000円程度	100円程度
維持費	飼育代+施設代	なし
設備	培養実験室 SPF飼育室	培養実験室 恒温機
申請	動物実験	なし

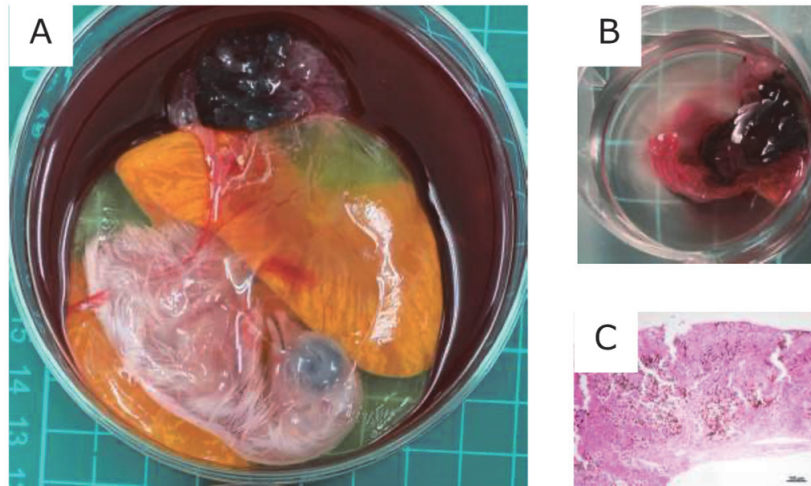


図1 B16F10 細胞による尿漿膜上での腫瘍形成
 A：接種6日後のニワトリ胚。漿尿膜上に黒い組織が見られる。
 B：摘出した漿尿膜。
 C：漿尿膜上の黒い組織のHE染色像。

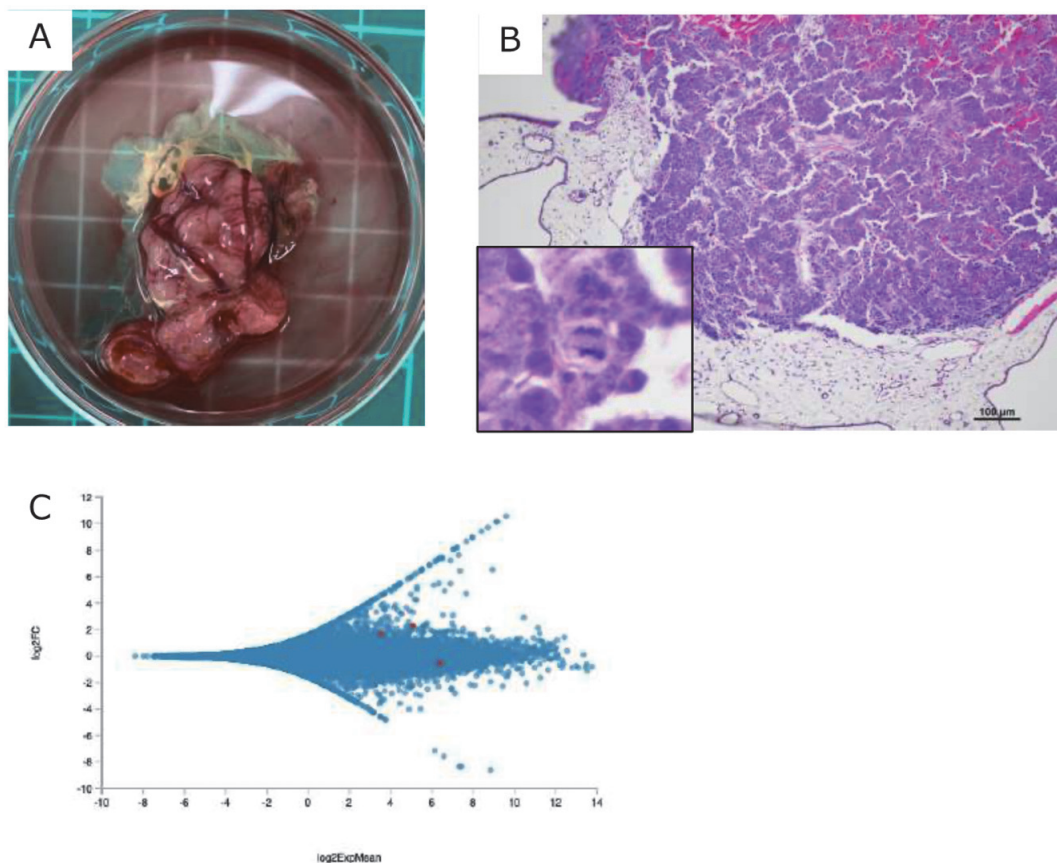


図2 F9 細胞による尿漿膜上での腫瘍形成
 A：接種6日後のニワトリ胚より摘出した漿尿膜上と腫瘍塊。
 B：漿尿膜上の腫瘍塊のHE染色像。分裂像も多数観察された(左下)。
 C：マーカー遺伝子の発現解析。

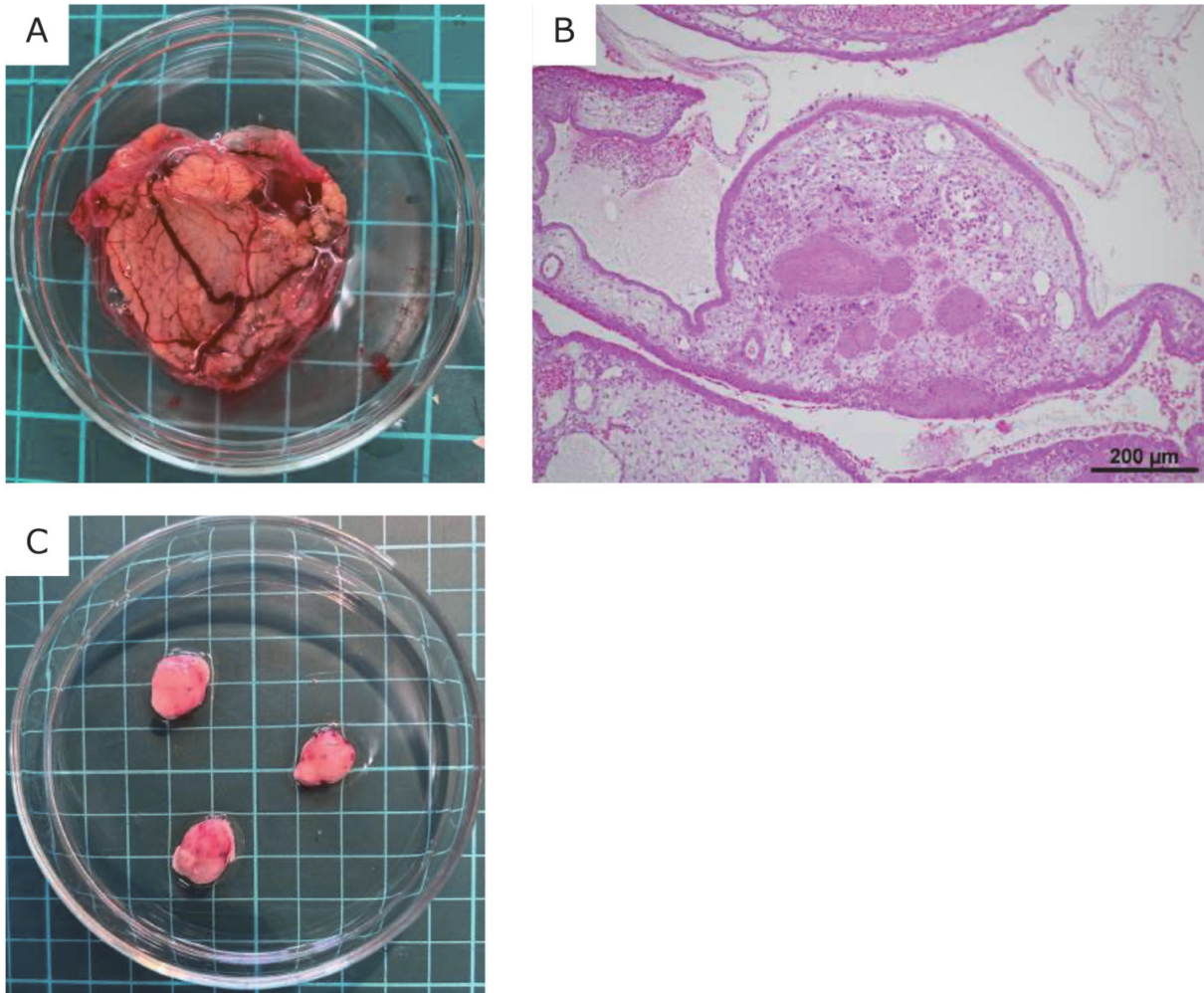


図3 マウス胚性幹細胞を用いた腫瘍形成

A: 漿尿膜上接種6日後のニワトリ胚より摘出した漿尿膜上と腫瘍塊。

B: 漿尿膜上の腫瘍塊のHE染色像。

C: 従来手法でのテラトーマ形成試験。