

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05758

研究課題名（和文）マウス核移植技術の開発による正常クローン胚・胎盤の構築

研究課題名（英文）Construction of normal cloned embryos and placentas by improvements of nuclear transfer technology in mice

研究代表者

小倉 淳郎（Ogura, Atsuo）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・室長

研究者番号：20194524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 114,800,000円

研究成果の概要（和文）：体細胞クローンは、卵子（母性）因子を利用して体細胞ゲノムを初期化し、全能性を賦与する技術である。そこで、クローン胚を解析し、初期化異常を探索した。体細胞クローン胚ではH3K27me3依存性の非典型刷込み遺伝子の記憶（loss of imprinting; LOI）が消去されており、それが妊娠末期の巨大胎盤および初期胎盤における異常な上皮間葉系転換（epithelial-mesenchymal transition, EMT）の原因となることを明らかにした。また、新規G9a（ヒストン H3K9メチル化酵素）阻害剤を用いることで、クローンマウスの出生率が有意に改善することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、核移植クローン技術は、エピゲノム修復原理に基づく格段の進歩につながった。その解析結果は、いかに全能性をもとに新しい生命が始まるかという生物学の最大の課題の一つに対し、解決の糸口を与えると期待される。また、クローン技術の進歩は、畜産・創薬などの産業応用（生物工場）、ヒト疾患モデルの開発（特に霊長類）、移植用臓器の作出、絶滅危惧種の保全などきわめて多くの応用へつながる。特に近年は、ブタを用いた異種移植用臓器の臨床利用が始まっており、その遺伝子改変ブタドナーの作成に必須となる核移植クローン技術の効率化は、将来の移植医療の普及に大きなインパクトを与えると期待される。

研究成果の概要（英文）：Somatic cell cloning is a technique to endow the somatic cell genome with totipotency within the recipient ooplasm. We analyzed cloned embryos/placentas at the epigenome level to see how the genome acquires normal/abnormal reprogramming. We found that loss of H3K27me3-dependent imprinting occurred in cloned placentas, leading to placental enlargement at term and abnormal epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the early placental tissues. We also found that treatment with a new G9a (histone methyltransferase) inhibitor significantly improved the cloning efficiency.

研究分野：発生工学

キーワード：全能性 ゲノム再プログラム化 核移植クローン 受精 胎盤

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子および卵子ゲノムは、受精により全能性を獲得する。この全能性の獲得には、卵子細胞質が大きく関わる。体細胞核移植は、その卵子細胞質中に存在する母性因子を利用して体細胞ゲノムに全能性を賦与する技術である。1990年代よりヒツジ、マウス、ウシを用いて体細胞核移植クローンが次々と成功してから四半世紀が経過しているが、本研究開始当初は、その成功率は体外受精や顕微授精に遠く及ばないものであった。それでも核移植クローン技術の改善は、着実に進展しており、特にエピゲノム情報が得られやすいマウスでは、脱アセチル化酵素阻害剤や Xist ノックアウトによる X 染色体遺伝子発現の正常化など、分子生物学的基礎に基づく技術的改善が進んでいた。そして、その改善を加速化する技術的基盤として、low input の次世代シーケンサー解析が徐々に可能になってきていた。まさに時機をみた研究計画の開始であったと言える。

2. 研究の目的

多くのマウス体細胞クローン胚は、生殖細胞ゲノムと体細胞ゲノムの差に起因するエピジェネティクス異常により発生が停止する。胚側の発生異常は比較的ランダムであるのに対し、胎盤側の異常は定型的であるという特徴がある。よってクローン着床前胚および着床後の胎盤を詳細に解析することで、クローン特異的なエピゲノム異常を理解し、その改善策を検討することができるかと期待される。本研究では、ゲノム刷込み異常および非ゲノム刷込み部位の異常をエピゲノム操作で正常化し、限りなく受精卵に近いクローン胚および胎盤を作成する。また、得られたクローン産子の表現型解析も行ない、発生率の改善と表現型の関連についても解析を実施する。これらの結果をもとに、全能性獲得とその後の正常な発生・出生・育成に至るエピゲノム条件を明らかにする。

3. 研究の方法

実験動物には主にマウスを用いた。核移植クローン法は、Honolulu 法(Wakayama et al. 1998)に適宜、脱アセチル化酵素阻害剤などのエピジェネティクス修飾変化の処理、脱メチル化酵素 mRNA の注入など、適宜改善を加えた。主に以下の3つの課題を遂行した。

(1) canonical imprinting の DMR である IG-DMR の異常の解析：これまでの解析から、クローン胚において、IG-DMR に支配される刷込み遺伝子群の発現異常を明らかにしている。そこで、特殊な母方ヘテロノックアウト (KO) (国立成育医療研究センター高田修治先生より)を用いて IG-DMR を正常化することにより、Dlk1 など複数の coding 遺伝子だけでなく、Mirg 領域にある大規模な micro(mi)RNA 群の発現も正常化するため、そのターゲット遺伝子も含めた多くの遺伝子の発現が正常化すると期待される。クローン胚の発生と網羅的な遺伝子発現の変化を胚および胎児の両者について解析する。

(2) H3K27me3 依存性 noncanonical imprinting のクローンへの影響の解析：遺伝子クローン胚では、H3K27me3 依存性の胎盤特異的刷込み遺伝子で loss of imprinting (LOI)が生じていることを明らかにしている(Okae et al. 2014)。その LOI のクローン胚発生への影響および胎盤異常への関連を明らかにする。

(3) 新たな体細胞核移植クローンの改善法の検討：新たな体細胞核移植クローンの改善法の検討も行った。具体的には、ヒストン脱メチル化酵素 Kdm4d の trophoblast stem cell (TSC)クローンへの応用と、特異性が高く、胚毒性の低い新規 G9a (H3K9me1/2 酵素)阻害剤のクローン胚の発生への効果を解析した。

4. 研究成果

(1) canonical imprinting の DMR である IG-DMR の異常の解析：母方ヘテロ KO を用いて IG-DMR を正常化することにより、coding 遺伝子および micro(mi)RNA 群の発現も正常化し、クローンの発生効率が改善することが期待されたが、出生率および胎盤形成の正常性は実験ごとのばらつきが大きく、クローンの改善には至らなかった。そこで、この IG-DMR を正常化したクローン胚の n 数を増やし、解析を行ったが、クローン産子の出生率および胎盤形成の正常性は改善しなかった。その結果、IG-DMR のみでなく、その周囲におよびエピゲノム変化が生じていることが示唆された。実際に、この領域が関係すると思われる Placenta only (胎子が死亡し、胎盤のみが発生して妊娠が維持される)の胎盤を解析したところ、父方母方にかかわらず、すべての遺伝子の発現が低下しており、IG-DMR を含む Dlk1-Dio3 領域全体がヘテロクローマチン化していることが示唆された。現在、このヘテロクローマチン化の原因解明および改善を試みている。

(2) H3K27me3 依存性 noncanonical imprinting のクローンへの影響の解析：クローン胚では、H3K27me3 依存性の胎盤特異的刷込み遺伝子で loss of imprinting (LOI)が生じ、両アレル性の発現(高発現)が生じていることが明らかになっている。これらのうち、Sfmbt2、Slc38a4、Gab1、Smoc1、および Sfmbt2 内の miRNA クラスターの計5つの母方ヘテロ KO 体細胞を用いて、正常な父方発現を示すクローン胚を作成し、胎盤の表現型を観察した。その結果、Sfmbt2 miRNA

の発現正常化によって胎盤の形成異常(巨大化)が改善するとともに、出生率も3%から7%へ改善した。さらに、5つの遺伝子以外に残されていた *Smoc1* および *Phf17* の母方 KO を用いてクローンを行ったが、胎盤の表現型は変化がなかった。よって、この2遺伝子はクローン胎盤の異常には関係していないことが示唆された。すなわち、クローン胚の発生に影響するエピジェネティクス異常として H3K27me3 の LOI による *Sfmbt2* miRNA の過剰発現(両アレル性発現)を同定し、その正常化によるクローン効率の改善に成功した。

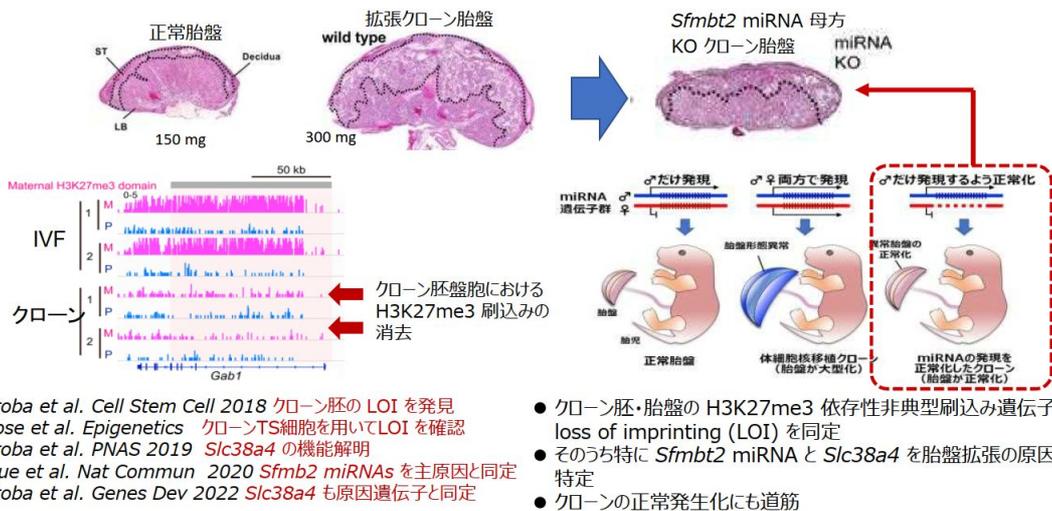


図1. クローンマウスの胎盤異常の原因を解明 – 20年以上にわたるマウスクローンの謎を明らかにした

また、クローン胎盤は、逆に着床直後は低形成であることが明らかになっている。そこで、trophoblast stem cell (TSC) を初期胎盤のモデルとして、クローン胚から作出した TS 細胞を受精卵由来 TSC と単一細胞遺伝子発現解析 (single cell RNA-seq: scRNA-seq) を行った。マウスの TSC はかなりヘテロな特徴を持つ細胞の集団であり、細胞ごとに未分化度が異なる。まず、受精胚由来 TSC では *Cdx2*, *Esrrb*, *Eomes*, *Elf5*, *Tfap2c* などの胎盤幹細胞のマーカー遺伝子が幅広く発現しており、大半が上皮マーカーである *Cdh1* 陽性だった。また、一部の細胞集団では分化マーカーである *Krt8* や *Vimentin* などが発現しており、分化しつつある細胞が集団内に含まれることが分かった。一方クローン胚由来 TSC では、受精胚由来 TSC と同様に胎盤幹細胞のマーカー遺伝子は広く発現していた一方で、*Cdh1* 陰性で *Vimentin* 陽性の細胞集団が顕著に増加しており、上皮間葉転換(EMT)が起きていることが示唆された。*Vimentin* 陽性細胞の増加はドナーとして使用した体細胞の種類によらず存在した。さらに、着床直後のマウスクローン胚の胚体外外胚葉においても、受精胚では認められないような *Vimentin* 陽性の細胞がみとめられた。現在までに、noncanonical imprinting の LOI *Eed* KO TSC も解析し、同様の現象が生じていることがあきらかになったことから、クローンの初期胎盤異常の原因として noncanonical imprinting の LOI との関連が示唆されている。

(3) 新たな体細胞核移植クローンの改善法の検討: これまで胎盤系列細胞の核移植クローンの成功の報告はない(試みは報告されているが、胚発生が極めて悪い)。そこで、TSC のエピゲノムの特徴を解析するために、ヒストン H3 パリアント H3.1/3.2 と H3.3 の ChP-seq による解析を行い、ES 細胞 (ESC) と比較した。その結果、TSC には、H3.1/H3.2 と H3K9me3 が共存する巨大なドメインが存在し、それが胎盤としての identity を保っていることが明らかになった。そこで、クローン胚に H3K9me3 特異的ヒストン脱メチル化酵素 *Kdm4d* mRNA を注入したところ、初の TSC 由来クローンマウスが誕生した。

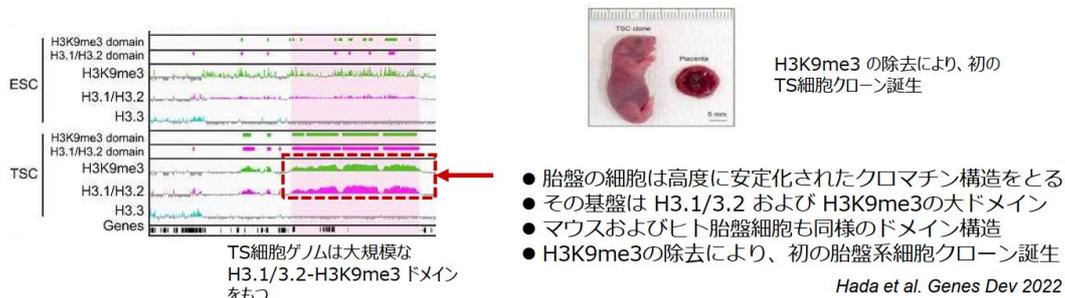


図2. 胎盤らしさを支える分子基盤を解明 – 胎盤幹細胞 (TSC) から初のクローンマウスの誕生

上記の TSC クローンも含め、体細胞クローン胚を *Kdm4d* mRNA を注入することで抑制性

の H3K9me3 が除去され、クローンの効率が改善することが明らかになっている。しかし、胚への mRNA 注入は侵襲的であり、それ自体が胚へのダメージを与えている。そこで、ヒストンメチル化の阻害剤処理を検討した結果、本来 H3K9m1/2 メチル化酵素である G9a の阻害剤が効果があることが明らかになった。ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A との併用で、出産率が 10 倍以上改善した。また、本処理を小型霊長類であるマーモセットのクローンに試みたところ、胚盤胞率が改善し、初の核移植由来 ES 細胞の樹立に成功した。G9a 阻害剤処理は簡便な手法であるため、今後幅広い応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計46件（うち査読付論文 42件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 27件）

1. 著者名 Miyazaki Takehiro, Kanatsu-Shinohara Mito, Ogonuki Narumi, Matoba Shogo, Ogura Atsuo, Yabe-Nishimura Chihiro, Zhang Hongliang, Pommier Yves, Trumpp Andreas, Shinohara Takashi	4. 巻 150
2. 論文標題 Glutamine protects mouse spermatogonial stem cells against NOX1-derived ROS for sustaining self-renewal division <i>in vitro</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev201157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.201157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchida Aya, Imaimatsu Kenya, Suzuki Honoka, Han Xiao, Ushioda Hiroki, Uemura Mami, Imura-Kishi Kasane, Hiramatsu Ryuji, Takase Hinako M., Hirate Yoshikazu, Ogura Atsuo, Kanai-Azuma Masami, Kudo Akihiko, Kanai Yoshiakira	4. 巻 13
2. 論文標題 SOX17-positive rete testis epithelium is required for Sertoli valve formation and normal spermiogenesis in the male mouse	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35465-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Michiko, Tomishima Toshiko, Ogura Atsuo	4. 巻 2637
2. 論文標題 Editing the Genome of the Golden Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 247 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3016-7_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shikata Daiki, Matoba Shogo, Hada Masashi, Sakashita Akihiko, Inoue Kimiko, Ogura Atsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Suppression of endogenous retroviral enhancers in mouse embryos derived from somatic cell nuclear transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1032760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.1032760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wakayama Sayaka, Soejima Mariko, Kikuchi Yasuyuki, Hayashi Erika, Ushigome Natsuki, Hasegawa Ayumi, Mochida Keiji, Suzuki Tomomi, Yamazaki Chiaki, Shimazu Toru, Sano Hiromi, Umehara Masumi, Matsunari Hitomi, Ogura Atsuo, Nagashima Hiroshi, Wakayama Teruhiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of a new device for manipulating frozen mouse 2-cell embryos on the International Space Station	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0270781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0270781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogonuki Narumi, Kyogoku Hirohisa, Hino Toshiaki, Osawa Yuki, Fujiwara Yasuhiro, Inoue Kimiko, Kunieda Tetsuo, Mizuno Seiya, Tateno Hiroyuki, Sugiyama Fumihiko, Kitajima Tomoya S, Ogura Atsuo	4. 巻 23
2. 論文標題 Birth of mice from meiotically arrested spermatocytes following biparental meiosis in halved oocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e54992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202254992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Ayumi, Mochida Keiji, Nakamura Ayaka, Miyagasako Rico, Ohtsuka Masato, Hatakeyama Masahiko, Ogura Atsuo	4. 巻 107
2. 論文標題 Use of anti-inhibin monoclonal antibody for increasing the litter size of mouse strains and its application to <i>in vivo</i> -genome editing technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 605 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioac068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara Mito, Ogonuki Narumi, Matoba Shogo, Morimoto Hiroko, Shiromoto Yusuke, Ogura Atsuo, Shinohara Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Regeneration of spermatogenesis by mouse germ cell transplantation into allogeneic and xenogeneic testis primordia or organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 924 ~ 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2022.02.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara Mito, Ogonuki Narumi, Matoba Shogo, Morimoto Hiroko, Shiromoto Yusuke, Ogura Atsuo, Shinohara Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Regeneration of spermatogenesis by mouse germ cell transplanted into allogeneic and xenogeneic testis primordia or organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 924 ~ 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2022.02.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Ayumi, Mochida Keiji, Nakamura Ayaka, Miyagasako Rico, Ohtsuka Masato, Hatakeyama Masahiko, Ogura Atsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Use of anti-inhibin monoclonal antibody for increasing the litter size of mouse strains and its application to <i>i</i> -GONAD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaoc068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 HAYASHI Erika, WAKAYAMA Sayaka, ITO Daiyu, HASEGAWA Ayumi, MOCHIDA Keiji, OOGA Masatoshi, OGURA Atsuo, WAKAYAMA Teruhiko	4. 巻 68
2. 論文標題 Mouse in vivo-derived late 2-cell embryos have higher developmental competence after high osmolality vitrification and -80C preservation than IVF or ICSI embryos.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 118 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2021-115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno-Iijima Saori, Nakashiba Toshiaki, Ayabe Shinya, Nakata Hatsumi, Ike Fumio, Hiraiwa Noriko, Mochida Keiji, Ogura Atsuo, Masuya Hiroshi, Kawamoto Shoko, Tamura Masaru, Obata Yuichi, Shiroishi Toshihiko, Yoshiki Atsushi	4. 巻 33
2. 論文標題 Mouse resources at the RIKEN BioResource Research Center and the National BioResource Project core facility in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00335-021-09916-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hada Masashi, Miura Hisashi, Tanigawa Akie, Matoba Shogo, Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Hirose Michiko, Watanabe Naomi, Nakato Ryuichiro, Fujiki Katsunori, Hasegawa Ayumi, Sakashita Akihiko, Okae Hiroaki, Miura Kento, Shikata Daiki, Arima Takahiro, Shirahige Katsuhiko, Hiratani Ichiro, Ogura Atsuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 84 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.348782.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Loubalova Zuzana, Fulka Helena, Horvat Filip, Pasulka Josef, Malik Radek, Hirose Michiko, Ogura Atsuo, Svoboda Petr	4. 巻 23
2. 論文標題 Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-021-00746-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamimura Satoshi, Inoue Kimiko, Mizutani Eiji, Kim Jin-Moon, Inoue Hiroki, Ogonuki Narumi, Miyamoto Kei, Ihashi Shunya, Itami Nobuhiko, Wakayama Teruhiko, Ito Akihiro, Nishino Norikazu, Yoshida Minoru, Ogura Atsuo	4. 巻 105
2. 論文標題 Improved development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos by chlamydocin analogues, class I and IIa histone deacetylase inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 543 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioab096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Hiroko, Ogonuki Narumi, Kanatsu-Shinohara Mito, Matoba Shogo, Ogura Atsuo, Shinohara Takashi	4. 巻 16
2. 論文標題 Spermatogonial stem cell transplantation into nonablated mouse recipient testes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1832 ~ 1844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.05.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mochida Keiji, Hasegawa Ayumi, Shikata Daiki, Itami Nobuhiko, Hada Masashi, Watanabe Naomi, Tomishima Toshiko, Ogura Atsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Easy and quick (EQ) sperm freezing method for urgent preservation of mouse strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93604-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akter Most Sumona, Hada Masashi, Shikata Daiki, Watanabe Gen, Ogura Atsuo, Matoba Shogo	4. 巻 11
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based genetic screen of SCNT-reprogramming resistant genes identifies critical genes for male germ cell development in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94851-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Kento, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Ogura Atsuo	4. 巻 104
2. 論文標題 Generation of chimeric mice with spermatozoa fully derived from embryonic stem cells using a triple-target CRISPR method for <i><i>Nanos3</i></i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 223 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa176	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yuki, Tomizawa Shin-ichi, Ono Michio, Kuroha Kazushige, Minamizawa Keisuke, Natsume Koji, Dizdarevic Selma, Dockal Ivana, Tanaka Hiromitsu, Kawagoe Tatsukata, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Ogonuki Narumi, Inoue Kimiko, Matoba Shogo, Anastassiadis Konstantinos, Mizuki Nobuhisa, Ogura Atsuo, Ohbo Kazuyuki	4. 巻 148
2. 論文標題 Tsga8 is required for spermatid morphogenesis and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.196212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 SUN Shuai、YANO Shota、NAKANISHI Momo O、HIROSE Michiko、NAKABAYASHI Kazuhiko、HATA Kenichiro、OGURA Atsuo、TANAKA Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Maintenance of mouse trophoblast stem cells in KSR-based medium allows conventional 3D culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Yoshifumi、Ogonuki Narumi、Hasegawa Ayumi、Kanatsu-Shinohara Mito、Ogura Atsuo、Wang Yufeng、McCarrey John R、Shinohara Takashi	4. 巻 104
2. 論文標題 OGG1 protects mouse spermatogonial stem cells from reactive oxygen species in culture†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 706 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Morimoto Hiroko、Yamamoto Takuya、Miyazaki Takehiro、Ogonuki Narumi、Ogura Atsuo、Tanaka Takashi、Kanatsu-Shinohara Mito、Yabe-Nishimura Chihiro、Zhang Hongliang、Pommier Yves、Trumpp Andreas、Shinohara Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 An interplay of NOX1-derived ROS and oxygen determines the spermatogonial stem cell self-renewal efficiency under hypoxia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 250 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.339903.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasegawa Ayumi、Mochida Keiji、Matoba Shogo、Inoue Kimiko、Hama Daiki、Kadota Masayo、Hiraiwa Noriko、Yoshiki Atsushi、Ogura Atsuo	4. 巻 104
2. 論文標題 Development of assisted reproductive technologies for Mus spretus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 234 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Kento, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Ogura Atsuo	4. 巻 104
2. 論文標題 Generation of chimeric mice with spermatozoa fully derived from embryonic stem cells using a triple-target CRISPR method for Nanos3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 223 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishiuchi Takashi, Abe Shusaku, Inoue Kimiko, Yeung Wan Kin Au, Miki Yuka, Ogura Atsuo, Sasaki Hiroyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Reprogramming of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 38 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-00521-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchimoto Akihiro, Tone Masaaki, Ogonuki Narumi, Hada Masashi, Ogura Atsuo, Takashima Seiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Germ cell depletion in recipient testis has adverse effects on spermatogenesis in orthotopically transplanted testis pieces via retinoic acid insufficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67595-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Kamimura Satoshi, Inoue Hiroki, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Honda Arata, Miura Kento, Hada Masashi, Hasegawa Ayumi, Watanabe Naomi, Dodo Yukiko, Mochida Keiji, Ogura Atsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfmbt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16044-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara Mito, Ogonuki Narumi, Matoba Shogo, Ogura Atsuo, Shinohara Takashi	4. 巻 117
2. 論文標題 Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7837 ~ 7844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1914963117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Atsuo, Matoba Shogo, Inoue Kimiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Epigenetic abnormalities associated with somatic cell nuclear transfer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-21-0013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 的場章悟, 小倉淳郎	4. 巻 39
2. 論文標題 配偶子形成を経ない体細胞クローンの解析から見えてくる経世代エピゲノムの重要性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 889 ~ 895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogonuki Narumi, Abe Yukiko, Kurotaki Yoko K., Nakao Kazuki, Aiba Atsu, Sasaki Erika, Ogura Atsuo	4. 巻 86
2. 論文標題 Birth of a marmoset following injection of elongated spermatid from a prepubertal male	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 928 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 FULKA Helena, OGURA Atsuo, LOI Pasqualino, FULKA, Jr. Josef	4. 巻 65
2. 論文標題 Dissecting the role of the germinal vesicle nuclear envelope and soluble content in the process of somatic cell remodelling and reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 433 ~ 441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matoba Shogo, Nakamuta Shoko, Miura Kento, Hirose Michiko, Shiura Hirosuke, Kohda Takashi, Nakamuta Nobuaki, Ogura Atsuo	4. 巻 116
2. 論文標題 Paternal knockout of Slc38a4/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 21047 ~ 21053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1907884116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MOCHIDA Keiji, HASEGAWA Ayumi, OGONUKI Narumi, INOUE Kimiko, OGURA Atsuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Early production of offspring by <i>in vitro</i> fertilization using first-wave spermatozoa from prepubertal male mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 467 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Michiko, Honda Arata, Fulka Helena, Tamura-Nakano Miwa, Matoba Shogo, Tomishima Toshiko, Mochida Keiji, Hasegawa Ayumi, Nagashima Kiyoshi, Inoue Kimiko, Ohtsuka Masato, Baba Tadashi, Yanagimachi Ryuzo, Ogura Atsuo	4. 巻 117
2. 論文標題 Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2513 ~ 2518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1917595117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara Mito, Ogonuki Narumi, Matoba Shogo, Ogura Atsuo, Shinohara Takashi	4. 巻 117
2. 論文標題 Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7837 ~ 7844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1914963117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hino Toshiaki, Yanagimachi Ryuzo	4. 巻 101
2. 論文標題 Active peristaltic movements and fluid production of the mouse oviduct: their roles in fluid and sperm transport and fertilization†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 40 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matoba Shogo, Shikata Daiki, Shirai Fumiyuki, Tatebe Takaki, Hirose Michiko, Nakata Akiko, Watanabe Naomi, Hasegawa Ayumi, Ito Akihiro, Yoshida Minoru, Ogura Atsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Reduction of H3K9 methylation by G9a inhibitors improves the development of mouse SCNT embryos	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2024.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mochida Keiji, Morita Kohtarō, Sasaoka Yoshio, Morita Kento, Endo Hitoshi, Hasegawa Ayumi, Asano Masahide, Ogura Atsuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Superovulation with an anti-inhibin monoclonal antibody improves the reproductive performance of rat strains by increasing the pregnancy rate and the litter size	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-58611-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakayama Sayaka et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of microgravity on mammalian embryo development evaluated at the International Space Station	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara Mito, Shiromoto Yusuke, Ogonuki Narumi, Inoue Kimiko, Hattori Satoko, Miura Kento, Watanabe Naomi, Hasegawa Ayumi, Mochida Keiji, Yamamoto Takuya, Miyakawa Tsuyoshi, Ogura Atsuo, Shinohara Takashi	4. 巻 133
2. 論文標題 Intracytoplasmic sperm injection induces transgenerational abnormalities in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e170140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI1170140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ihashi Shunya, Hamanaka Mizuto, Kaji Masaya, Mori Ryunosuke, Nishizaki Shuntaro, Mori Miki, Imasato Yuma, Inoue Kimiko, Matoba Shogo, Ogonuki Narumi, Takasu Atsushi, Nakamura Misaki, Matsumoto Kazuya, Anzai Masayuki, Ogura Atsuo, Ikawa Masahito, Miyamoto Kei	4. 巻 6
2. 論文標題 Incomplete activation of <i>Alyref</i> and <i>Gabpb1</i> leads to preimplantation arrest in cloned mouse embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202302296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202302296	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamatoya Kenji, Kurosawa Masaru, Hirose Michiko, Miura Yoshiki, Taka Hikari, Nakano Tomoyuki, Hasegawa Akiko, Kagami Kyosuke, Yoshitake Hiroshi, Goto Kaoru, Ueno Takashi, Fujiwara Hiroshi, Shinkai Yoichi, Kan Frederick W K, Ogura Atsuo, Araki Yoshihiko	4. 巻 110
2. 論文標題 The fluid factor OVGP1 provides a significant oviductal microenvironment for the reproductive process in golden hamster	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 465 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioad159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Naomi, Hirose Michiko, Hasegawa Ayumi, Mochida Keiji, Ogura Atsuo, Inoue Kimiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Derivation of embryonic stem cells from wild-derived mouse strains by nuclear transfer using peripheral blood cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-38341-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Guo Y et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Obox4 promotes zygotic genome activation upon loss of Dux.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 ハムスターから学ぶ新たな生殖生物学
3. 学会等名 第4回有性生殖研究会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 核移植技術を用いた野生由来マウスES細胞の樹立
3. 学会等名 第33回モロシヌス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 小型実験動物の発生工学技術の開発およびその応用研究について
3. 学会等名 第45回 北海道大学獣医学学术交流基金群講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 顕微鏡下で命をつくる - 核移植クローンと顕微授精 -
3. 学会等名 第12回日本マーモセット研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuo Ogura
2. 発表標題 How to improve mouse cloning
3. 学会等名 19th International Congress on Animal Reproduction（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuo Ogura
2. 発表標題 How somatic cell nuclear transfer helps us probe the placental epigenome
3. 学会等名 International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development"（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuo Ogura
2. 発表標題 Nuclear transfer for the study of the developmental epigenetics
3. 学会等名 The 36th International Mammalian Genome Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 論文執筆・投稿からacceptまで～私の経験
3. 学会等名 日本繁殖生物学会オンラインセミナー(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 小型実験動物を用いた受精・胚発生・胎盤発生機構の解明
3. 学会等名 第5回HAC鹿児島(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉淳郎、廣瀬美智子、富島俊子
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたノックアウトハムスターの作出
3. 学会等名 第94回日本生化学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 核移植クローンによる胎盤エピゲノムの特性解析
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研セミナー 生殖細胞・減数分裂研究の最前線 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogura A, Ogonuki N
2. 発表標題 Recent advancements of assisted fertilization using spermatogenic cells
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 マウス体細胞クローンを用いた胎盤形成機構の解析
3. 学会等名 第113回 日本繁殖生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsuo Ogura
2. 発表標題 What do we learn from somatic cell nuclear transfer (SCNT)?
3. 学会等名 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 受精におけるヒストンアルギニンメチル化の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 実験動物を用いた生殖技術の開発とその応用
3. 学会等名 第57回東北生殖医学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiaki Hino
2. 発表標題 Amazingly active peristaltic movements and fluid production of the mouse oviduct: their roles in fluid and sperm transport and fertilization
3. 学会等名 52nd annual conference, Society for the study of the reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小倉淳郎他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 368
3. 書名 繁殖生物学改訂版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝工学基盤技術室 https://kougaku.brc.riken.jp/ja/ Bioresource Engineering Division https://kougaku.brc.riken.jp/en/ Bioresource Engineering Division https://kougaku.brc.riken.jp/en/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	日野 敏昭 (Hino Toshiaki) (10550676)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development"	開催年 2022年～2022年
---	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------