

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：13501

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062015

研究課題名（和文） 卵子による核の初期化機構の解明およびその促進方法の開発

研究課題名（英文） How to enhance the nuclear reprogramming by oocyte cytoplasm and analysis the mechanism

研究代表者

若山 照彦 (WAKAYAMA TERUHIKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：40360672

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤を用いてクローン技術の成功率を改善することに成功し、この技術を用いることで16年間凍結保存されていた死体からのクローンマウスの作出に成功した。一方、従来再クローニングには限界があると言われていたが、この技術により再クローンを25回以上繰り返すことに成功し、1匹のドナーマウスから600匹ものクローンマウスを作ることに成功した。初期化異常は蓄積されないことが初めて示された。

研究成果の概要（英文）：We could demonstrate several possibilities. 1. The cloning success rate was improved up to 10% by HDACis. 2. Health cloned mice were born from frozen dead mouse, which preserved 16 years under -20C. 3. Over six hundreds cloned mice were born from one donor mouse by repeating nuclear transfer up to 27 times.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	20,000,000	0	20,000,000
2009年度	20,000,000	0	20,000,000
2010年度	20,000,000	0	20,000,000
2011年度	20,000,000	0	20,000,000
2012年度	20,000,000	0	20,000,000
総計	100,000,000	0	100,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：応用動物、再生医学、獣医学、畜産学、発生分化

## 1. 研究開始当初の背景

クローン技術は最初のクローン動物が生まれてから10年が経過していたが、その成功率は非常に低く、核の初期化については全くわかっていなかった。さらに、クローン動物特有の初期化異常が報告され始め、クローン動物の正常性や価値について再検討が必要となっていた。

での1-2%から実用化に耐えうる率である10%以上へあげること、および初期化異常を減らし正常なクローン個体を作ることを第一の目標とする。同時に、初期化のメカニズムの解明も試みる。一方応用研究として、死滅した個体の体細胞からのクローン個体を作成する技術開発や、優良家畜の無限増殖の可能性を検討する。

## 2. 研究の目的

クローン動物(マウス)の成功率を、現時点

## 3. 研究の方法

初期化機構の解明に関しては、1. ドナー

細胞の種類や状態を変えることで初期化の程度を調べる。2. 様々なヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤を用い、もっとも成功率が高くなる阻害剤を見つけ出す。またそれぞれの阻害剤の標的の違いから、阻害しなければならぬHDACを見つけ出す。3. 複数の卵子を融合し細胞質を増やすことで初期化因子の量を増やし、初期化効率への影響を調べる。4. 得られたクローン胚、クローンES細胞およびクローン個体に対して、エピジェネティック異常や網羅的遺伝子発現異常を調べる。

死滅細胞の核の初期化に関しては、1. 凍結死体の体細胞核移植技術の開発。2. 凍結死体のどの臓器がドナーとして最適かみつけだす。3. 凍結保存期間の影響。4. 直接核移植では無理な場合、途中でntES細胞技術を挟む2段階核移植方法の開発を行い、最終的に長期間凍結保存されていた死体からのクローン復活を行う。

初期化異常の蓄積に関しては、1. ドナーマウスから作られたクローンマウスの体細胞から再びクローンマウスを作ることを限界が来るまで繰り返す。2. 得られた再クローンマウスの出産率、体重、生殖能、寿命などを調べコントロールと比較する。3. 網羅的遺伝子発現による異常の有無、およびTSA依存の有無を調べ、これらのことから考察する。

#### 4. 研究成果

- (1) 未成熟卵子の細胞質内に存在する初期化能力は成熟卵子より強く、特にヒストンの脱メチル化能が高いことを明らかにした。そこで未成熟卵子の細胞質で体細胞に前処理を行うことで、クローン動物の成功率を若干だが改善することに成功した (Bui et al., 2008)。
- (2) 単為発生胚由来のES細胞を用いてインプリント遺伝子のエピゲノムの安定性を調べたところ、核移植操作により少なくとも2つのPEG遺伝子のエピゲノムが変化してしまうことを明らかにした(Hikichi et al 2008)。
- (3) 初期化因子を増やすことを目的に、2つ以上の卵子を融合させた巨大卵子を作成し、クローンマウスの作成率の改善を試みた。しかし巨大卵子を用いてもクローン個体のお産率は改善できなかったことから、初期化因子は量より濃度の方が重要だと思われた (Wakayama et al., 2008)。
- (4) 一方核移植技術の改善によって従来不可能だった死滅体細胞からの核移植が可能になり、最長16年間凍結保存されていたマウスの死体からクローン個体作出に成功した (Wakayama et al., PNAS 2008)。この成果は国内のみならず多くの国で紹介された。
- (5) 同様に我々は凍結乾燥状態で保存した細胞の核移植にも成功し、ntES細胞およびキメ

ラを経ることでドナーの遺伝子を復活させることに成功した (Ono et al., 2008)。

(6) 以前我々は初期化を促進させるためにTSA (HDACiの一種)処理が効果的だと報告したが、この方法では近交系マウスのクローンは不可能だった。今回Scriptaid (別のHDACi)処理によって主要な近交系マウス全てからクローン個体の作出に成功した。さらにScriptaid処理によって2細胞期のRNA合成が活発になること、ヒストンH3K9のアセチル化の割合が未処理クローン胚より受精卵に近づくことなどが明らかとなった (Van Thuan et al., 2009)。

(7) クローン胚および個体には異常が多発することが知られているが、これまでは胚を固定、染色して異常を調べなければならず、調べた胚がはたして個体へ発生できたのか不明だった。そこで胚を生きのまま観察し、その後個体へ発生させることが可能な特殊顕微鏡および観察方法を確立した。具体的には超高感度カメラおよびGFPなどの蛍光色素遺伝子を結合した目的遺伝子のmRNAを胚に注入することで、チューブリンやヒストンを観察可能にし、5万枚以上の蛍光写真を撮影後に産仔への発育を可能にした (Yamagata et al 2009)。

(8) クローン研究には必須の卵子の初期化能力を測定するために、核にダメージを与えず卵子活性化能だけを消失した精子の作出を試みた。その結果、精子を10mMのNaOH処理を1時間行うことで、出産率の低下を起さないうで卵子活性化能力を完全に除去した精子を作り出せることがわかった(Li et al., 2009)。

(9) クローン動物特異的なエピゲノム異常を様々なHDACiによって修正し成功率を高める試みを行った。その結果、成功率のさらなる改善は出来なかったが、クラスIIBのHDACを抑えることが重要だということが明らかとなった。またiPS細胞の作製には効果があると報告されたHDACiのバルプロ酸は全く効果が無く、クローンとiPS細胞の作成には異なるリプログラム機構があることが示された (Ono et al., 2010)。

(10) TSAでクローン動物の成功率は改善されるが、そのメカニズムはよくわかっていなかった。そこでTSA処理後にどのような変化が起こっているのか初期胚を観察した結果、TSA処理によってクローン胚の染色体の脱凝縮は未処理胚より進み、ヒストンのアセチル化は促進されていた。そして2細胞期において、未処理区では割球間で不均等な新生RNAが観察されたが、TSA処理によって受精卵と同様に割球同士が同期しながらRNAの合成を行うようになった (Bui et al., 2010、雑誌の表紙に選ばれた)。

(11) 単為発生胚由来のES細胞を核移植する

ことでインプリント遺伝子の改変を試みた。その結果、核移植操作を繰り返すことで単為発生胎児の死亡時期は延びたが、核移植による初期化には限界があることが示された。一方、単為発生由来胚から正常な機能を有する胎盤を作ることに成功した。この研究によって、これまで単為発生胚は胎盤が形成できないため致死だと言われていたが、胎盤より胎児自身に致死の原因があることが明らかとなった (Hikichi et al 2010)。

(12) 我々が以前発見した HDACi による初期化促進について、クローン胚にどのような変化が生じているのか詳しく検討したところ、rRNA の転写効率が改善され、初期胚遺伝子活性が正しく行われる確率が高まることが明らかとなった (Bui 2011)。

(13) 外見は正常でも出産に至るクローン胚と流産する異常胚を、蛍光プローブによりあらかじめ選別する手法を開発することが出来れば、移植後の産仔率が上がるだけでなく、異常な胚と正常な胚を比較することで異常の原因を突き止めることが可能となる。そこで我々は受精直後から桑実期胚までの 72 時間を生きたままダメージなしで蛍光観察する方法を開発し、この方法を用いてクローン胚の蛍光観察を行った。クローン胚の細胞数、細胞分裂速度、分裂同調性、染色体異常などを指標に外見は正常な桑実期胚を分類し移植したところ、もっとも出産に影響を与えていたのは染色体異常であり、イメージングによって正常胚だけを選ぶことで産仔率を大きく改善することに成功した (Mizutani 2012)。

(14) 従来の蛍光観察では水銀ランプを使用するため、ランプによるダメージが避けられない。そこで通常のハロゲンランプを用いて蛍光観察を可能にする方法を開発した。通常の顕微鏡に励起フィルターを接続するためのアダプターを取り付け、さらにアダプターに絞りを付けることで、励起フィルターの外側からハロゲン光が漏れこむようにすることで、1 つの光源から蛍光像と明視野の同時観察も可能にした、その結果、家畜卵子のように核が全く見えない卵子でも、ハロゲンランプで核を見ながら除核出来るようになった。(Yamagata 2012)。

(15) 核移植の各工程を見直し、ダメージを最小限に抑える方法を検討した。その結果、現在おそらくすべての研究者が使用しているサイトカラシン (F-アクチンに結合しアクチンの重合を阻害する。卵子を柔らかくし核の除去や染色体の損失を防ぐ効果) が、その後の卵子のアクチン分布を攪乱していることが判明した。そこでサイトカラシンの代わりにラトランクリン A (G-アクチンに結合しアクチンの重合を阻害する) を用いたところ、アクチンの異常な分布が減少し、成功率が 2 倍近くまで改善された。さらに、核移植の工

程には深夜まで数回にわたる培地交換が必要で研究者を疲労させていたが、ラトランクリン A は毒性が低いので培地交換を減らすことが出来、実験にかかる負担が大きく軽減した (Terashita et al., 2012)。

(16) クローン動物特有のエピジェネティック異常について調べるため、核移植を何度も繰り返した再クローンマウスの作製を試みた。もし異常が核移植ごとに蓄積するものであれば、再クローンマウスの出産率は低下し奇形率は増加するはずだが、核移植を 25 回繰り返しても出産率は低下せず、生まれた再クローンマウスの寿命や生殖能力に異常は見られなかった。網羅的に遺伝子発現を調べても、エピジェネティック異常は初代のクローンマウスと同程度であったことから、クローン特有の異常は蓄積しないことが明らかとなった。したがって連続核移植を用いれば 1 匹のドナー個体から無限のクローン個体を作り出せることになり、優良家畜の無限増殖など農業を大きく改善する可能性が示された (Wakayama et al., 2013)。本成果は世界各国の新聞や雑誌、テレビで紹介された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 60 件)

1. Lee AR, Kishigami S, Amano T, Matsumoto K, Wakayama T, Hosoi Y  
Nicotinamide: a Class III HDACi Delays In Vitro Aging of Mouse Oocytes. **J Reprod Dev.** 2013 Mar 10. [Epub ahead of print] 査読有り
2. Takase M, Iida R, Maruya M, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Wakayama T, Nishigami S, Fagarasan S, Kanagawa O.  
Nuclear transferred embryonic stem cell for analysis of B1 B-lymphocyte development. **Int Immunol.** Int Immunol. 2013 Mar;25(3):145-156. 査読有り
3. Wakayama S, Kohda T, Obokata H, Tokoro M, Li C, Terashita Y, Mizutani E, Nguyen VT, Kishigami S, Ishino F, Wakayama T  
Successful Serial Recloning in the Mouse over Multiple Generations. **Cell Stem Cell** 2013 Mar 7;12(3):293-7. (Cover article of issue) 査読有り
4. Kohda T, Kishigami S, Kaneko-Ishino T, Wakayama T, Ishino F.  
Gene Expression Profile Normalization in Cloned Mice by Trichostatin A Treatment. **Cell Rerogram.** 2012 14 : 45-55 査読有り
5. Mizutani E, Yamagata K, Ono T, Akagi S, Geshi M, Wakayama T.  
Abnormal chromosome segregation at early cleavage is

- a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. **Dev Biol.** 2012 364:56-65 査読有り
6. Yamagata K, Iwamoto D, Terashita Y, Li C, Wakayama S, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Saeki K, Wakayama T. Fluorescence cell imaging and manipulation using conventional halogen lamp microscopy. **PLoS One.** 2012;7(2):e31638 査読有り
  7. Terashita Y, Wakayama S, Yamagata K, Li C, Sato E, Wakayama T. Latrunculin A Can Improve the Birth Rate of Cloned Mice and Simplify the Nuclear Transfer Protocol by Gently Inhibiting Actin Polymerization. **Biol Reprod.** 2012 86 : 180 1-6査読有り
  8. Itoi F, Tokoro M, Terashita Y, Yamagata K, Fukunaga N, Asada Y, Wakayama T. Offspring from mouse embryos developed using a simple incubator-free culture system with a deoxidizing agent. **PLoS One.** 2012;7:e47512. 査読有り
  9. Bui HT, Wakayama S, Mizutani E, Park KK, Kim JH, Van Thuan N, Wakayama T. Essential role of paternal chromatin in the regulation of transcriptional activity during mouse preimplantation development. **Reproduction.** 2011 141:67-77. 査読有り
  10. Murakami K, Araki K, Ohtsuka S, Wakayama T, Niwa H. Choice of random rather than imprinted X inactivation in female embryonic stem cell-derived extra-embryonic cells. **Development.** 2011 138:197-202. 査読有り
  11. Hirata S, Fukasawa H, Wakayama S, Wakayama T, Hoshi K. Generation of Healthy Cloned Mice using Enucleated Cryopreserved Oocytes. **Cellular Reprogramming** 2011, 13 : 7-11. 査読有り
  12. Cui, XS., Shen, XH., Lee CK., Kang, YK., Wakayama, T. Kim NH. Analysis of proteomic profiling of mouse embryonic stem cells derived from fertilized, parthenogenetic and androgenetic blastocysts. **Stem Cell Discovery** 2011, 1: 1-15. 査読有り
  13. Terashita Y, Li C, Yamagata K, Sato E, Wakayama T. Effect of Fluorescent Mercury Light Irradiation on In Vitro and In Vivo Development of Mouse Oocytes after Parthenogenetic Activation or Sperm Microinjection. **J Reprod Dev.** 2011 57: 564-571 (Cover article of issue) 査読有り
  14. Kohda T, Ogonuki N, Inoue K, Furuse T, Kaneda H, Suzuki T, Kaneko-Ishino T, Wakayama T, Wakana S, Ogura A, Ishino F. Intracytoplasmic sperm injection induces transcriptome perturbation without any transgenerational effect. **Biochem Biophys Res Commun.** 2011 410: 282-288. 査読有り
  15. Li C, Mizutani E, Ono T, Terashita Y, Jia XF, Shi HJ, Wakayama T. Intracytoplasmic Sperm Injection with Mouse Spermatozoa Preserved Without Freezing for Six Months Can Lead to Full-Term Development. **Biol Reprod.** 2011 85:1183-1190. 査読有り
  16. Bui HT, Seo HJ, Park MR, Park JY, Van Thuan N, Wakayama T, Kim JH. Histone Deacetylase Inhibition Improves Activation of Ribosomal RNA Genes and Embryonic Nucleolar Reprogramming in Cloned Mouse Embryos. **Biol Reprod.** 2011 85: 1048-1056. 査読有り
  17. Okada, Y. Yamagata, K. Hong, K. Wakayama, T. Zhang, Y. A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. **Nature** 2010, 463: 554-558. 査読有り
  18. Bui H.T., Wakayama S., Kishigami S., Kim HJ., Van Thuan N., and Wakayama T. Effect of Trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication and transcriptional activity in cloned mouse embryos. **Biol Reprod.** 2010, 83: 454-463. 査読有り
  19. Sakaue M, Ohta H, Kumaki Y, Oda M, Sakaide Y, Matsuoka C, Yamagiwa A, Niwa H, Wakayama T, Okano M. DNA Methylation Is Dispensable for the Growth and Survival of the Extraembryonic Lineages. **Curr Biol.** 2010, 20: 1452-1457. 査読有り
  20. Hikichi T., Ohta H., Wakayama S., and Wakayama T. Functional full-term placentas formed from parthenogenetic embryos using serial nuclear transfer. **Development** 2010, 137: 2841-2847. 査読有り
  21. Yamagata K, Ueda J, Mizutani E, Saitou M, Wakayama T. Survival and death of epiblast cells during embryonic stem cell derivation revealed by long-term live-cell imaging with an Oct4 reporter system. **Dev Biol.** 2010, 346: 90-101. 査読有り
  22. Ono T., Li C., Mizutani E., Terashita Y., Yamagata K., and Wakayama T. Inhibition of Class IIb Histone Deacetylase Significantly Improves Cloning Efficiency in Mice. **Biol Reprod.** 2010, 83:929-937. 査読有り
  23. Kim HR, Han RX, Wakayama T, Park CS, Jin DI.. Aberrant protein expression in the placenta of cloned mouse derived from

- embryonic stem cell. **Placenta** 2010, 31:853-859. 査読有り
24. Yamagata K, Suetsugu R, Wakayama T. Long-term, Six-dimensional Live-cell Imaging for the Mouse Preimplantation Embryo That Does Not Affect Full-term Development. **J Reprod Dev.** 2009, 55:343-350. 査読有り
  25. Bui HT, Hwang KC, Kim JH, VAN Thuan N, Wakayama T, Miyano T. Effect of Vanadate on the Chromatin Configuration in Pig GV-oocytes. **J Reprod Dev.** 2009, 55 : 367-372. 査読有り
  26. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. **Cell.** 2009, 137:571-584. 査読有り
  27. Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, Hikichi T, Wakayama S, Kishigami S, Mizutani E, Wakayama T. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. **Reproduction.**, 2009, 138:309-317. 査読有り
  28. Yamagata K, Suetsugu R, Wakayama T. Assessment of chromosomal integrity using a novel live-cell imaging technique in mouse embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.** 2009, 24: 2490-2499. 査読有り
  29. Oda, M. Tanaka, S. Yamazaki, Y. Ohta, H. Iwatani, M. Suzuki, M. Ohgane, J. Hattori, N. Yanagimachi, R. Wakayama T. Shiota, K. Establishment of trophoblast stem cell lines from somatic cell nuclear-transferred embryos **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009, 106 : 16293-16297. 査読有り
  30. Wakayama S, Kishigami S, Thuan NV, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Bui HT, Miyake M, and Wakayama T. Effect of volume of oocyte cytoplasm on embryo development after parthenogenetic activation, intracytoplasmic sperm injection, or somatic cell nuclear transfer. **Zygote** 2008, 16:211-222. 査読有り
  31. Hikichi T, Kohda T, Wakayama S, Ishino F, and Wakayama T. Nuclear Transfer Alters the DNA Methylation Status of Specific Genes in Fertilized And Parthenogenetically Activated Mouse Embryonic Stem Cells. **Stem Cells.** 2008, 26: 783-788. 査読有り
  32. Ohta H, Sakaide Y, and Wakayama T. The Birth of Mice from Testicular Spermatozoa Retrieved from Frozen Testicular Sections. **Biol Reprod** 2008, 78: 807-811. 査読有り
  33. Tabar V, Tomishima M, Panagiotakos G, Wakayama S, Menon J, Chan B, Mizutani E, Al-Shamy G, Ohta H, Wakayama T, and Studer L. Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. **Nat. Med.** 2008, 14: 379-381. 査読有り
  34. Shibata S, Yokota T, and Wakayama T. X-chromosome inactivation in nuclear transfer ES cells. **Cytogenetic and Genome Research** 2008, 121:96-101. 査読有り
  35. Suzuki T, Kondo S, and Wakayama T, Cizdziel PE, and Hayashizaki Y. Genome-Wide Analysis of Abnormal H3K9 Acetylation in Cloned Mice. **PLoS One** 2008, 3:e1905. 査読有り
  36. Mizutani E, Ono T, Li Chong, Maki-Suetsugu R, Wakayama T. Propagation of senescent mice using nuclear transfer embryonic stem cell lines. **Genesis** 2008, 46; 478-483. 査読有り
  37. Ono T., Mizutani E., Li C., Wakayama T. Nuclear transfer preserves the nuclear genome of freeze-dried mouse cells. **J. Reprod Dev.** 2008, 54: 486-491. 査読有り
  38. Bui HT., Wakayama S., Kishigami S., Thuan NV. Wakayama T. The cytoplasm of mouse germinal vesicle (GV) stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. **Development** 2008, 135:3935-3945. 査読有り
  39. Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008, 105, 17318-17322. 査読有り
  40. Nishida H, Kondo S, Suzuki T, Tsujimura Y, Komatsu S, Wakayama T, Y Hayashizaki. An epigenetic aberration increased in intergenic regions of cloned mice. **Mammalian Genome** 2008, 19: 667-674. 査読有り
- 〔図書〕 (計 12 件)
1. Mizutani E, Ogura A. and Wakayama T. Nuclear transfer in the mouse oocyte In "Mammalian Oocyte Regulation" Ed. by Hayden Homer (Humana press, USA), Methods in Molecular Biology 2013;957:285-300. 査読有り
  2. Obokata, H., Wakayama T. Cloned mice from Adults Stem Cells. In "Advanced in Molecular Biology and Medicine: Stem cells. From Biology to Therapy" Vol. 1 (Ed.

- Robert A. Meyers: Wiley-Blackwell Press) 2013, 209-232. 査読有り
3. Li C., Wakayama S. and Wakayama T. Cloned mice from embryonic stem cells. In "Advanced in Molecular Biology and Medicine: Stem cells. From Biology to Therapy" Vol. 1 (Ed. Robert A. Meyers: Wiley-Blackwell Press) 2013, 233-254. 査読有り
  4. 若山清香、若山照彦 体細胞核移植クローン 卵子学 (森崇英総編集) 京都大学学術出版会 pp63-66 2011年9月10日
  5. Wakayama S. Mizutani E. and Wakayama T. Nuclear transfer ES cells as a new tool for basic biology In: Stem Cells & Regenerative Medicine: From Molecular Embryology to Tissue Engineering. (ed. Krishnarao Appasani Raghu K. Appasani) Humana Press, USA. 2010, p351-369. 査読有り
  6. Wakayama S. Thuan NV. and Wakayama T. Mouse cloning by nuclear transfer. In: Advanced protocols for animal transgenesis. (ed. Shirley Pease, Thomas L. Saunders) Springer New York, 2010, p267-290. 査読有り
  7. 若山照彦 (2009) クローンマンモスへの道—クローン技術最前線の技術における発生・再生医療技術を探る (単行本) アドスリー社 東京。
  8. Ohta H. and Wakayama T. Generation of mice from embryonic stem cells using tetraploid embryos as hosts. In: Methods in Bioengineering. (ed. Biju Parekkadan and Martin L. Yarmush) Artech House. London. 2009, pp39-48. 査読有り
  9. Kishigami S, and Wakayama T. Somatic cell nuclear transfer in the mouse. In: Microinjection: Methods and Applications (ed. David J. Carroll) (Humana Press, USA), *Methods in Molecular Biology* 2009, 518:207-218. 査読有り
  10. Wakayama S, Kishigami S, Wakayama T. Cloning of ES cells and mice by nuclear transfer. In: Gene Knockout Protocols ed. Ralf Kuehn, Wolfgang Wurst (Humana Press, USA), *Methods in Molecular Biology* 2009, 530:251-265. 査読有り
  11. Wakayama S, and Wakayama T. Establishment of individual-specific ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer. In: Stem Cell Applications in Diseases (ed. Mikkel L. Sorensen). Nova Science Publishers, Inc. New York USA, 2008, pp. 189-214. 査読有り
  12. Kishigami S, Ohta H, and Wakayama T. Epigenetic remodeling and developmental potentials after intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatids. In: Genetic and Epigenetic Control of Mammalian Germ Cell Development and Function (ed. Masami Nozaki). Research Signpost. Kerala, India. 2008, pp. 133-152. 査読有り
- [その他]  
ホームページ等  
[http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/enkyu/index.php?cat\\_id=5](http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/enkyu/index.php?cat_id=5)
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
若山 照彦 (WAKAYAMA TERUHIKO )  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部  
・教授  
研究者番号 : 40360672
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし