

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15359

研究課題名（和文）生殖細胞欠損胚を用いた、効率的なキメラ生産技術について

研究課題名（英文）Efficient chimeric mouse production technology using germ cell-deficient embryos

研究代表者

長友 啓明 (Nagatomo, Hiroaki)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：30746813

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：次世代に目的の遺伝子を残す技術は有用であり、医療、家畜生産や、絶滅危惧種の維持の側面からも重要である。目的の子孫を残す方法として、キメラ技術がある。そこで、本研究では直接受精卵で生殖細胞欠損胚を作出することで、通常キメラと比較し、目的細胞の生殖細胞への寄与率改善を目指した。Prdm14をターゲットとして4種類のgRNAを使用し受精卵に注入することで、約6割の胚で効率的に欠損出来ることが示された。実際にキメラ個体を作成したが、通常胚とのキメラと比較し生殖細胞への寄与率に大幅な改善はみられなかった。加えて、本研究でアガロースカプセルを用いた胚培養技術を開発し、凍結保存等に有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

目的遺伝資源を生産する方法として、キメラ技術がある。受精卵に、別の個体の受精卵やES細胞、iPS細胞などを注入、あるいは集合培養によりキメラ胚を作出することで、生まれた個体の精子や卵子は注入された受精卵やiPS細胞の遺伝情報を受け継ぐことが可能である。しかしながら、キメラ個体の場合、生殖細胞まで寄与する割合はあまり高くない場合が多い。そこで本研究で実施した手法をさらに洗練することでより効率的な遺伝資源の増産が可能となる。また、本研究で開発したアガロースカプセルを用いることで、産仔率や耐凍性が向上するため、少ない資源でも次世代へつなぐ一助となる。

研究成果の概要（英文）：The technology to leave a target gene for the next generation is important for medicine, livestock production, and the maintenance of endangered species. Therefore, in this study, we aimed to improve the contribution rate of target cells to germ cells compared with normal chimera by production germ cell-deficient embryos directly with fertilized eggs. It was shown that by injecting four types of Prdm14-targeted gRNA into fertilized eggs, germ cells can be efficiently deleted in about 60% of the embryos. Although chimeric mice were actually produced, the contribution to germ cells was not significantly improved as compared with the chimera using normal embryos. In addition, in this study, we developed an embryo culture technology using agarose capsules and showed that it is useful for cryopreservation.

研究分野：発生工学

キーワード：発生率 遺伝資源 発生工学

1. 研究開始当初の背景

目的遺伝資源を増産する方法として、クローン技術やキメラ技術があげられる。体細胞クローン技術を用いることで、同一個体の増産が可能であり、極めて有用な技術であるが、クローン成功率の低さや、実験動物マウスにおいては、クローン作出可能な系統が限られている、さらに、実験手技が難しく相当な熟練を要するといった問題があり、実用的な応用までは、達していないのが現状である。もう一つの目的遺伝資源を生産する方法として、キメラ技術がある。受精卵に、別の個体の受精卵や ES 細胞、iPS 細胞などを注入、あるいは集合培養によりキメラ胚を作成することで、生まれた個体の精子や卵子は注入された受精卵や iPS 細胞の遺伝情報を受け継ぐことが可能である。しかしながら、キメラ個体の場合、生殖細胞まで寄与する割合はあまり高くない場合が多い。胎子系列の細胞をすべて目的の細胞由来にするため、胚盤胞補完技術(4N キメラ)があるが、産仔獲得に至る割合は数パーセントと低い。キメラ技術によって、増殖させたい動物を効率よく生産できる可能性があるが、更なる改良が必要である。

そこで、生殖細胞を欠損させた胚を作成し、その胚と目的細胞をキメラにすることで目的の細胞が生殖細胞により寄与できると考えた。マウスでは NANOS3 遺伝子を欠損させると精巣や卵巣内に精子と卵子がつかられないことも報告されており、2016 年に NANOS3 遺伝子を KO した繊維芽細胞由来の体細胞クローン胚と受精卵のキメラ胚を移植し、黒毛和牛にホルスタインの卵子をつくらせることに成功している (scientific reports, 2016)。しかしながら、体細胞クローン胚を用いてキメラ胚を作成させることは非常に手間がかかり、技術も必要である。より簡単に生殖細胞欠損胚を作成することが可能になれば、効率的に目的の遺伝資源を増産可能となる。

生殖細胞を欠損した個体を作成すると、個体の維持が不可能であり、その都度ヘテロで欠損した個体どうしを掛け合わせ、ホモ欠損個体を得る必要があったが、この手法では、実験動物マウス以外へ応用することを想定した場合、現実的ではない。実際、マウスにおいては、ヘテロ欠損個体を作成してから、性成熟させ個体を掛け合わせて受精卵を得るまでに約 3 カ月を要するので、ヘテロ欠損個体を作成できたとしても、その後数年を要し、なおかつ、大量の受精卵を得られないので、ほぼ机上の空論となってしまう。そこで、これらの問題を克服するために、受精卵を用いて直接生殖細胞欠損個体を作成し、その胚とキメラを作成する方法を考えた。近年ゲノム編集技術が飛躍的に進歩し、CRISPR/Cas9 を用いることで、受精卵で直接遺伝子改変動物を作成可能となり、広く普及されている。そこで、本研究において十分に KO 効率の高い guideRNA を選択し、直接受精卵で生殖細胞 KO 胚を高効率で作成することで、通常胚キメラと比較し、目的細胞の生殖細胞への寄与率改善を試みる。

2. 研究の目的

目的の子孫を増産させる方法の一つとして、キメラ技術がある。キメラ技術は複数の手法が確立されており、受精卵キメラや四倍体胚を用いた、胚盤胞補完法が代表的であり、目的の細胞の遺伝情報を受け継ぐことが可能であるが、生殖細胞まで寄与する割合はあまり高くないことや、産仔率が低いといった問題がある。そこで、本研究では直接受精卵で生殖細胞欠損胚を作成することで、通常胚キメラと比較し、目的細胞の生殖細胞への寄与率改善を目指す。また、キメラ作製に必要な胚操作を施した初期胚の新しい培養技術の開発も行う。キメラの改善に成功できれば、絶滅の危機に瀕している動物の精子や卵子を効率よく別の動物に作らせることや、体細胞クローン技術と併用することで絶滅動物を復活させる技術に応用が期待される。

3. 研究の方法

1) 受精卵による直接的な生殖細胞欠損個体作出の試み

初めに、生殖細胞を欠損させるためのターゲットとなる遺伝子を決定する必要があるが、始原生殖細胞形成初期から発現する Prdm14 および Nanos3 をターゲットとすることにした。初めにターゲット遺伝子の guide RNA を設計し、体外受精により作出した px330 ベクターを受精卵前核に注入し、仮親へ移植し産仔を取得する。その後繁殖適齢期に成長した個体より、精巣を摘出し、精巣切片を作製し形態観察を行う。また、尾より採取したゲノム DNA より目的遺伝子の変異を解析する。

2) 高効率な欠損胚作出のための guide RNA の検討

本研究では、可能な限り生殖細胞を欠損させる効率を高めることが後々の結果に大きく関わるため、guide RNA の検討が非常に重要な項目である。遺伝子中の重要なドメイン上や転写開始点に guide RNA を設計し、それぞれの効率を検討し、また、複数の guide RNA を組み合わせ同時に注入することで、最も効率的に KO 可能な条件を検討する。

3) 目的遺伝子を生殖細胞に有する個体の作出

キメラ個体における目的細胞の寄与を明確に確認するために、蛍光マーカーを有するトランスジェニック ES 細胞を樹立する。また、ES 細胞のライン毎にキメラ寄与率や体細胞クローンの産仔率が異なるため、複数のラインを樹立し、実験に供する必要がある。ES 細胞は樹立済みで、ドナー細胞として体細胞クローンを行い、産仔を得ること、受精卵とのキメラ胚を移植し、キメラ産仔が得られることを確認している。この ES 細胞を用いてエレクトロポレーション法により

CAG プロモーターでヒストンが赤くラベルされる、CAG-H2B-mCherry のトランスジェニック ES 細胞を作成する。これらの ES 細胞を用いて Prdm14 および Nanos3 ノックアウトベクターを前核注入した胚とのキメラを作成し、E12.5 の胎仔より genital ridge を摘出し、生殖細胞への ES 細胞の寄与率を調査する。

4) キメラを作成する方法として顕微操作を用いた注入法と、透明帯を除去した凝集法があるが、透明帯が無いと胚発生が低下することが知られている。そこで、アガロースカプセルを用いた人工透明帯を開発し、胚発生率、移植後の産仔率、ガラス化保存に及ぼす影響を調査する。

4. 研究成果

guide RNA を複数設計し受精卵前核へ注入後、移植し産仔を解析すると、図 1 に示す通り、ホモで欠損している個体を確認でき、精巣を 16 週齢で摘出すると、同齢の野生型と比較し明らかにサイズが小さくなり、また精巣内および精巣上部尾部中に精子は無く、生殖細胞が完全に欠損していることが確認できた。また、Prdm14 遺伝子のヘテロ欠損個体において、野生型と比較して顕著に精巣のサイズが小さくなっており、ヘテロ欠損であっても、キメラにおける目的細胞の寄与効率が上昇することが期待できる。

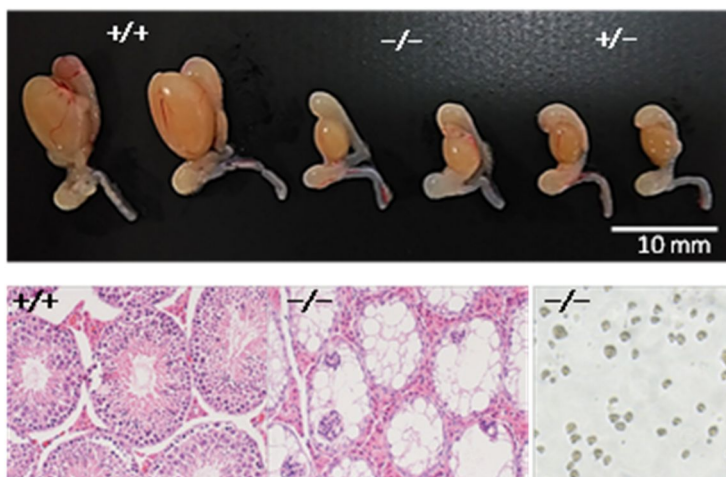


図 1 受精卵前核注入法による Prdm14 KO マウスの精巣。上段：シーケンスにより確認後、16 週齢で摘出した精巣写真。下段：HE 染色した精巣切片およびホモ欠損個体の精巣上部尾部内の細胞。完全に生殖細胞が欠損している。ヘテロ欠損個体も精巣のサイズは顕著に小さくなるが精子は存在する

Nanos3 欠損個体は Prdm14 欠損個体と比較し、産仔率が低い傾向がみられたため、Prdm14 を使用するほうが適していると考えた。そこで複数の gRNA を設計しそれぞれ単独および複数を組み合わせた場合の KO 効率を検討した。その結果、gRNA を一種類ずつ注入した場合は、gRNA の種類によりほぼ効果を示さないものから 30%程度 KO 産仔が得られるものまで、配列依存性であった。上位 4 種類を同時に注入することで KO 効率が 6 割程度に上昇することがわかり、実用的な効率に達したと判断した。

次に、樹立した H2B-mCherry ES 細胞を胚盤胞期胚に注入し移植後 genital ridge を摘出し、観察を行ったところ、本研究で作出した ES 細胞が生殖細胞へ寄与可能であることが認められた。通常受精卵とのキメラ作出において、生殖細胞への寄与個体の割合は、約 32%であった。さらに、KO 効率の高い、ベクターの組み合わせで前核注入した受精卵とのキメラ作出において、生殖細胞への寄与個体の割合は、78%となり、通常胚よりも高い寄与率を示した(図 2)。しかしながら、帝王切開あるいは自然分娩にて出生させ、10 週まで成育させた個体では、通常胚と比較して有意な寄与率の差は見られなかった。理由として、考えられることの一つに、本研究において使用した ES 細胞が比較的全身への寄与率が高かったことが考えられる。

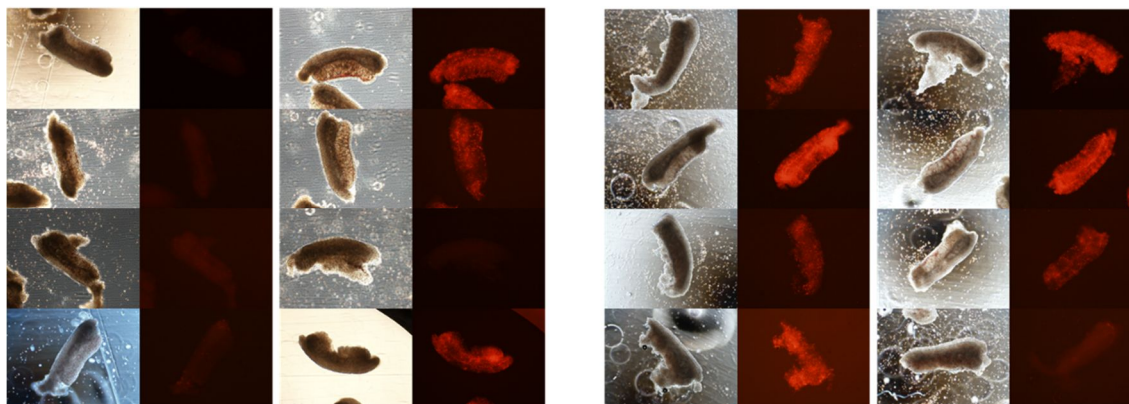


図 2 H2B-mCherry ES 細胞キメラ個体の E12.5 における genital ridge の写真。左：通常胚とのキメラ。右：Prdm14 欠損胚とのキメラ。

次に、遺伝資源の有効活用という観点から派生し、人工透明帯の開発を行った。IVF、顕微授精、凍結保存など、様々な発生工学的手法が用いられる工程において、透明帯が損傷した卵子がしばしば現れるが、そのような卵子は、その後のハンドリングが難しく、また、直接卵子にダメージが及ぶため発生率も低下するので、廃棄されている。人工的に透明帯のような殻を作製することで、操作性が向上すれば、これまで廃棄されていた卵子も使用できるのではないかと考えた。

その結果、アガロースカプセルはマイクロマニピュレータによる顕微操作も十分可能で、ピエゾインパクトドライブによる穿孔もおこなえることがわかった。アガロースカプセル内で培養した胚は正常に発生することができ、アガロースカプセルを取り外す必要なく移植して産仔を得ることができた。また、アガロースカプセル胚は良好な凍結耐性を示し、生存率は透明帯欠損胚と比較して非常に高かった。したがって、アガロースカプセルは、遺伝資源の有効活用という観点で卵母細胞および胚を利用するための貴重なツールであることが示された (Nagatomo H. et al., Sci Rep)。

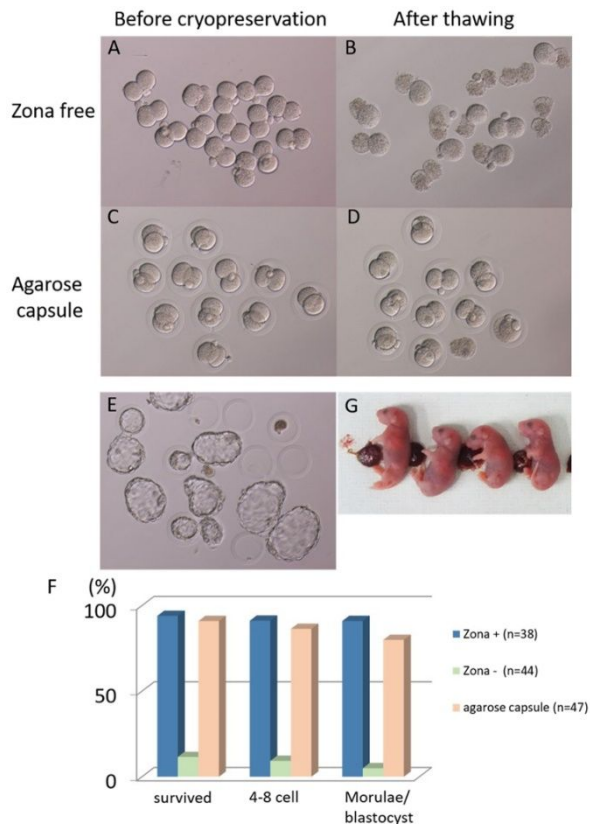


図3 アガロースカプセル胚の耐凍性 二細胞期胚を凍結融解処理したところ、透明帯が無い胚と比較してアガロースカプセル胚は飛躍的に生存率が改善する。また、移植する際に、アガロースカプセルを外す必要なく移植可能で、産仔を得ることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsukiji Nagaharu, Inoue Osamu, Morimoto Mitsuru, Tatsumi Norifumi, Nagatomo Hiroaki, Ueta Koji, Shirai Toshiaki, Sasaki Tomoyuki, Otake Shimon, Tamura Shogo, Tachibana Toshiaki, Okabe Masataka, Hirashima Masanori, Ozaki Yukio, Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 132
2. 論文標題 Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1167 ~ 1179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-12-823369	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 Akizawa Hiroki, Kobayashi Ken, Bai Hanako, Takahashi Masashi, Kagawa Shinjiro, Nagatomo Hiroaki, Kawahara Manabu	4. 巻 155
2. 論文標題 Reciprocal regulation of TEAD4 and CCN2 for the trophectoderm development of the bovine blastocyst	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 563 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-18-0043	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 Nagatomo H, Yao T, Araki Y, Mizutani E, Wakayama T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Agarose capsules as new tools for protecting denuded mouse oocytes/embryos during handling and freezing-thawing and supporting embryonic development in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 17960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18365-z.	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 Tanabe Y, Kuwayama H, Wakayama S, Nagatomo H, Ooga M, Kamimura S, Kishigami S, Wakayama T.	4. 巻 154(6)
2. 論文標題 Production of cloned mice using oocytes derived from ICR-outbred strain.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 859-866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-17-0372.	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 Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T.	4. 巻 114(23)
2. 論文標題 Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 5988-5993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1701425114.	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 Araki R, Mizutani E, Hoki Y, Sunayama M, Wakayama S, Nagatomo H, Kasama Y, Nakamura M, Wakayama T, Abe M.	4. 巻 35(5)
2. 論文標題 The Number of Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells and Nuclear Transfer Embryonic Stem Cells Depends on the Method and Somatic Cell Type Used for Their Generation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1189-1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2601.	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 Narita Keishi, Nagatomo Hiroaki, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Takeda Sen	4. 巻 23
2. 論文標題 Discovery of a Vertebrate-Specific Factor that Processes Flagellar Glycolytic Enolase during Motile Ciliogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100992 ~ 100992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100992	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 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 柴崎 郁江・鎌田 裕子・長友 啓明・大我 政敏・若山 照彦
2. 発表標題 染色体分配異常を起こしたマウス受精卵における異常染色体の回収と同定の試み
3. 学会等名 第59回日本卵子学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 悠ノ介・廣瀬 直樹・大 我 正敏・上 村 悟氏・長 友 啓明・若山さやか・伊 藤 潤哉・若 山 照彦
2. 発表標題 種の PLC で活性化させたマウス卵子の発生能
3. 学会等名 第59回日本卵子学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Nagatomo, Tatsuma Yao, Yasuyuki Araki, Eiji Mizutani, Teruhiko Wakayama
2. 発表標題 Agarose capsules as new tools for protecting denuded mouse oocytes/embryos during handling and freezing-thawing and supporting embryonic development in vivo
3. 学会等名 World Congress of Reproductive Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T.
2. 発表標題 Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months.
3. 学会等名 World Congress of Reproductive Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamamoto Y, Ooga M, Kamimura S, Nagatomo H, Wakayama S, Ito J, Wakayama T
2. 発表標題 Developmental competence of mouse oocyte activated by different species of PLC
3. 学会等名 World Congress of Reproductive Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Detailed strain specific difference on fertilization process by mouse ICSI
2. 発表標題 Samo E, Nagatomo H, Ooga M, Kamimura S, Wakayama S, Kishigami S, Wakayama T
3. 学会等名 World Congress of Reproductive Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 標智仁・兼平雅彦・神沼修・長友啓明
2. 発表標題 Development of vaginal image-based murine estrus detection system by deep learning
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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