

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19300151
 研究課題名（和文） 非齧歯類実験動物の核移植由来 ES 細胞の樹立
 研究課題名（英文） Establishment of nuclear transfer ES cells in non-rodent laboratory species
 研究代表者 小倉 淳郎（Ogura Atsuo）
 独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・室長
 研究者番号：20194524

研究成果の概要：

ヒト核移植由来 ES 細胞のモデル作出の目的で実験を行った。サルおよびウサギの核移植では、マウスクローンで効果が認められている Trichostatin A あるいは scriptaid の再構築胚への処理は効果が無いことがわかった。ブタ卵子をレシピエントに用いたサルクローンを実施し、桑実期胚を得た。ウサギ ES 細胞の樹立に成功した。その未分化性維持には bFGF や Activin が重要な役割を担っている一方で、LIF は未分化性維持に関与していないことが明らかになった。ウサギ ES 細胞がその形態だけでなく未分化性維持機構までもヒト ES 細胞に類似していることを示している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：核移植、クローン、ES 細胞、再生医療

1. 研究開始当初の背景

ヒト胚性幹（ES）細胞を用いた組織の再生は、近年急速な発展を遂げている再生医療のうちでも最も大きな期待を担っているが、移植する細胞等が他者に由来する場合、免疫拒絶等の問題の克服が大きな課題の一つとなっている。その免疫拒絶のない再生医療を実現できる最大の切り札の一つとして、核移植胚由来 ES 細胞（以下、ntES 細胞）の利用がある。しかしながら、ヒト ntES 細胞は未だ

に 1 株も樹立できておらず、また樹立されたとしてもその安全性確認には相当な時間と手間がかかることが予想される。よって、この過程を迅速化し、かつ安全に展開するためには、動物モデルの確立が必須であった。

2. 研究の目的

本研究は、将来のヒト再生医学研究において極めて重要な ntES 細胞をマウス以外の実験動物で樹立しようと試みるものである。実

験動物はヒトに比べて倫理上の制約が少ない。しかしながら、ヒトのモデルとして考えた場合、1つの動物種がヒトの完全なモデルとなることはなく、いくつかの動物種から得られた情報を総合的に判断する必要がある。本研究は、そのntES樹立システムを、齧歯類よりもヒトに類似した特性を有する実験動物(サル、ウサギ)をモデルとして確立することを目的とする。

3. 研究の方法

すべての動物種について体細胞クローンを行い、胚培養により胚盤胞の作出とES細胞の樹立を試みるが、動物種により技術開発のポイントが異なるので、それぞれ工夫を行った。サルでは主に卵子の質向上、ドナー細胞種および処理の検討、培養細胞へDNAメチル化やヒストン修飾を変化させる処理を行った。ウサギは、受精卵からも安定してES細胞を樹立する方法が確立していないので、ES細胞樹立法の確立およびその性質の同定を行った。

4. 研究成果

カニクイザルおよびウサギの核移植では、マウスクローンで効果が認められているTrichostatin Aあるいはscriptaidの再構築胚への処理を行った。いずれも統計的に有意差のある効果は現れなかった。すなわち、サルは8-16細胞期まで発生し、ウサギは胚盤胞まで発生したがその率は改善しなかった。卵子活性化方法が安定していないカニクイザルについて、構築された核移植胚の活性化刺激を検討したところ、IonomycinおよびDimethylaminopurine処理の有効性が確認された。また、最近ヒト核移植由来ES細胞の作出に際して、卵子を用いる倫理的な問題回避のために3前核胚を用いた核移植が提唱され、マウスで成功している。そこでサルでICSI胚を作出し、その第一体細胞分裂M期の胚をレシピエントに用いた核移植クローンを実施した。Nocodazole処理をすることにより、2個の桑実期胚まで得ることができたが、胚盤胞は得られなかった。また、ブタ卵子をレシピエントに用いたサルクローンを実施した。成体雄の線維芽細胞を用いて1個の胚盤胞を得たが、ES細胞の樹立には至らなかった。ウサギES細胞の樹立に成功した。すなわち、樹立および継代には、フィーダー細胞濃度の調整が極めて重要であることを明らかにした。約50回の継代後もテロメラーゼ活性が高いことを証明し、ほぼ無限に近く増殖できることが期待された(図1)。また、長期継代後のES細胞からも、移植後にテラトーマ形成を確認できた(図2)。多能性維持に関する特性解析も行った。未分化性維持にはbFGFやActivinが重要な役割を担って

いる一方で、LIFは未分化性維持に関与していないことが明らかになった。実際に、LIF非存在下で長期間培養したウサギES細胞の未分化性は失われなかった。さらにY27632の添加により、効率よく増殖させることができることも判明した。これらの結果は、ウサギES細胞がその形態だけでなく未分化性維持機構までもヒトES細胞に類似していることを示している。

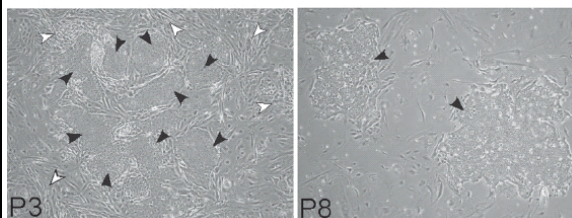


図1. 樹立したウサギES細胞のコロニー形態。ヒトやサルのコロニーと同様に、平板で増殖をしていく。



図2. ウサギES細胞は長期継代後も、多能性を維持し、マウス腎皮膜下にテラトーマを形成する能力を保持する。

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8件)(すべて査読有り)

1. Kim J-M, Ogura A. Changes in allele-specific association of histone modifications at the imprinting control regions during mouse preimplantation development. **Genesis** (in press)
2. Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A. A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. **PLoS One** 4(3): e4943. doi:10.1371/journal.pone.0004943.

3. Honda A, Hirose M, Ogura A. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. **Exp Cell Res** (in press)
4. Shimozawa N, Sankai T, Ogura A. (Review) Reproductive Technologies and the related studies in cynomolgus monkey. **Mamm Ova Res** 25: 133-142, 2008
5. Miki H, Hirose M, Ogonuki N, Inoue K, Kezuka F, Honda A, Mekada K, Hanaki K, Iwafune H, Yoshiki A, Ishino F, Ogura A. Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. **Genesis**, 47: 155-60, 2009
6. Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Murata T, Hirose H, Katayama K, Wakisaka N, Miyoshi H, Yokoyama KK, Sankai T, Ogura A. Stable ES cell lines in rabbits - potential small animal models for human ES cell research. **Reprod Biomed Online**, 17: 706-715, 2008.
7. Honda A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T, Shinohara T, Ogura A. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 104: 12389-12394, 2007
8. Inoue K, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H, Ogura A. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. **Stem Cells**, 25: 1279-1285, 2007
- 1 井上 貴美子, 小倉 淳郎, "体細胞クローン動物の低効率に改善されるのか" 第 100 回日本繁殖生物学会大会・第 12 回日本生殖内分泌学会学術集会 2007 年 10 月 東京
- 2 Ogura A, Honda A, Hirose M, "Characterization of thecal stem cells and primordial oocytes concomitantly isolated from mouse neonatal ovaries" 4th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007 Singapore Singapore Nov. 2007
- 3 Ogura A, "Reproductive engineering techniques at the RIKEN BRC" 2007 Annual Meeting of The Chinese Society of Laboratory Animal Science Taipei Taiwan Dec. 2007
- 4 Hirose M, Honda A, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Wakisaka N, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Katayama K, Miyoshi H, Sankai T, Ogura A, "Improvements in the derivation and culture of rabbit embryonic stem-like cells and their characterization in vitro and in vivo" 4th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2007 Singapore Singapore Nov. 2007
- 5 小倉 淳郎, "新生仔マウス卵巣から分離された莖膜幹細胞と卵子の特徴について" 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「幹細胞の可塑性と未分化維持機構」成果公開シンポジウム「幹細胞研究を支える新しいテクノロジー」2008 年 2 月 東京
- 6 小倉 淳郎, "実験動物学と発工工学の展開" 第 145 回日本獣医学会学術集会 2008 年 3 月 相模原
- 7 廣瀬 美智子, 本多 新, 井上 貴美子, 三木 洋美, 越後 貴成美, 脇阪 紀子, 小倉 淳郎, 下澤 律浩, 羽鳥 真功, 山海 直, "ウサギES様細胞の樹立と解析" 第 24 回日本疾患モデル学会総会 2007 年 8 月 つくば
- 8 本多 新, 廣瀬 美智子, 井上 貴美子, 三木 洋美, 越後 貴成美, 小倉 淳郎, 脇阪 紀子, 下澤 律浩, 羽鳥 真功, 山海 直, "ウサギES様細胞の樹立・培養の効率化と解析" 第 100 回日本繁殖生物学会大会・第 12 回日本生殖内分泌学会学術集会 2007 年 10 月 東京
- 9 小倉 淳郎, "胚を組み立てる：顕微授精と核移植" 第 55 回日本実験動物学会総会 2008 年 5 月 仙台
- 10 小倉 淳郎, "市民公開講座「顕微授精と核移植クローン：顕微鏡下で胚を作る技術」" 第 101 回日本繁殖生物学会大会 2008 年 9 月 福岡

{ 学会発表 } (計 14 件)

- 11 小倉 淳郎, "雄性生殖細胞の胚形成能について顕微授精と核移植クローン技術の応用" 第24回環境医学研究所・第15回研究推進委員会合同セミナー 2008年10月 浦安
- 12 小倉 淳郎, "遺伝子発現パターンから見た体細胞核移植クローン胚の特性について" 文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究第5回「性分化機構の解明」, 「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第1回合同領域会議 2008年11月 熊本
- 13 金 鎮文, 小倉 淳郎, "マウス着床前胚におけるアレル特異的ヒストン修飾の解析" 第22回モロシヌス研究会 2008年9月 東京
- 14 本多 新, 廣瀬 美智子, 井上 貴美子, 越後貫 成美, 三木 洋美, 下澤 律浩, 羽鳥 真功, 清水 なつみ, 村田 武英, 廣瀬 めぐみ, 形山 和史, 脇阪 紀子, 三好 浩之, 横山 和尚, 山海 直, 小倉 淳郎, "ウサギES細胞の効率的な樹立とその維持" 第3回ウサギフォーラム 2008年7月 神戸

〔図書〕(計1件)

井上 貴美子 小倉 淳郎 (共立出版) ドナー細胞の特性から見た核移植クローン 蛋白質 核酸 酵素 Vol.52 16 pp2189-2196 (2007)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brc.riken.go.jp/lab/kougaku/>

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/brc/engineering/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 淳郎 (Ogura Atsuo)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・室長

研究者番号：20194524

(2) 連携研究者

山海 直 (Sankai Tadashi)

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センター・主任研究員

研究者番号：80300937

