

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780213
 研究課題名 (和文) ドナー細胞の性質がクローン胚由来胚性幹細胞に与える影響について
 研究課題名 (英文) The effect of donor cell characteristic to the ability of nuclear transfer embryonic stem cell lines.
 研究代表者
 水谷 英二 (MIZUTANI EIJI)
 独立行政法人理化学研究所・ゲノム・リプログラミング研究チーム・研究員
 研究者番号：80443034

研究成果の概要：クローン胚由来胚性幹細胞 (ntES 細胞) に与えるドナー細胞の性質を調べるため、超高齢マウス 5 匹の尾から線維芽細胞を採取し核移植を行い、全ての個体から ntES 細胞を樹立することに成功した。これらの ntES 細胞は全て ES 細胞マーカーに陽性であり、キメラマウスを介して、全てのドナー個体由来の産仔作出に成功した。次にこれら ntES 細胞をドナー核として核移植を行った結果、2 年 9 カ月齢という非常に高齢な個体からクローンマウスを作出することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：発生工学・核移植・胚性幹細胞・初期化・加齢・生殖細胞・繁殖

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES細胞) は胚盤胞の内部細胞塊から樹立され、全ての体細胞組織および生殖細胞へ分化できる多能性を持つ。近年、このES細胞の多能性を利用した再生医療分野への応用研究が進んでいる。しかしながら、実際にヒトへの利用を考えた場合、

最大の問題となるのが急性拒絶反応である。我々は核移植技術を組み合わせることで、マウスにおいて体細胞由来ES (ntES) 細胞を樹立することに成功した。さらにES細胞とntES細胞が同一の性質を持つのかを調べた結果、これらのntES細胞はES細胞マーカーを発現しており、胚盤胞へ注入す

ると受精卵由来のES細胞と同様にキメラマウスを形成し、体細胞のみならず生殖細胞へも分化可能であることが確認された (Wakayama T. et al. Science 2001)。このことは、ntES細胞はES細胞同様に非常に類似した性質を持つことを示唆している。ntES細胞は自身の体細胞をドナーとして用いることにより、拒絶反応を回避することが可能となるため、その利用価値が注目されている。また、例えば突然変異した個体等、貴重なサンプルを解析する際にはntES細胞を樹立することで、無限に増殖する細胞として全遺伝子を保存することが可能であり、ntES細胞は基礎生物学における新たなツールとしての利用価値もある (Wakayama S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003)。通常、核移植によるクローンマウス作出効率は非常に低く 2-3%であるのに対して、ntES細胞の樹立成績は 30%以上と非常に高率である (Wakayama S. et al. Biol. Reprod 2005)。これはntES細胞が利用しやすいことを示すと同時に、個体へと成長することが出来ない異常なクローン胚からでも樹立されている可能性を示している。また核移植のドナー細胞としてntES細胞を用いた場合、その成功率はES細胞よりも体細胞に近く、何らかの点でES細胞とは異なっていることも考えられる。核移植では注入された細胞核が卵子細胞質内で初期化 (リプログラミング) されることが必要であるが、これまでにリプログラミングのメカニズムやそれに関わる因子群についてはほとんど明らかになっていないこともあり、ntES細胞における基礎的な知見はいまだに不足しているのが現状で、実際に利用するためにはさらに基礎研究を重ねることが必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究は将来的な再生医療分野での利用を視野に入れ、すでに体細胞核移植技術が確立されており、ES細胞に関する多くの知見が存在するマウスをモデル動物として用いてntES細胞を作出し、ntES細胞の基礎的な特性解析を行うことを目的とした。

- (1) これまでの研究から、体細胞クローン個体作出効率は胎仔など若い組織の細胞や、ES細胞などの未分化な細胞をドナーとした場合の方が高いことが分かっており、高齢個体からのクローン個体作出は非常に困難であると考えられている。しかしながら、ntES細胞の樹立成績は非常に高率であるため、高齢個体の体細胞からでもntES細胞ならば樹立できる可能性がある。そこで本研究では、実際に再生医療の対象となることが想定される高齢個体の体細胞からntES細胞の樹立を試みる。次に、高齢個体からntES細胞が樹立出来た場合、これらの細胞の分化能、生体内での機能を受精卵由来の比較、検討することにより、ntES細胞の性質に及ぼす加齢の影響を明らかにする。
- (2) これまでにクローンマウスを作出することに成功していない種々の体細胞核を核移植し、ntES細胞が樹立できるかを調べる。樹立されたntES細胞の形態、体外における分化能および生体内での機能を解析し、その特性を比較することにより、もともとのドナー細胞がntES細胞の性質に及ぼす影響を明らかにする。
- (3) さらに、最近報告された体細胞クローン作出効率を向上する薬剤処理等 (Kishigami S. et al. Biochemi. Biophys. Res. Commun. 2006) を利用して、薬剤濃度、暴露時間等を検討することでntES細胞からのクローン個体作出効率の改善を目指す。核移植技術を利用して体細胞をntES

細胞とすることで、貴重な高齢個体由来細胞を大量に入手することができるだけでなく体細胞よりも未分化な状態にすることが出来るはずである。この性質を利用し、先の実験で樹立したntES細胞を核移植のドナーとして用いて、困難であるとされている高齢個体の体細胞クローン作出を試みる。

3. 研究の方法

高齢（12ヶ月齢以上）のマウスから採取した体細胞をドナー核として核移植を行い、ntES細胞を樹立する。得られたntES細胞が受精卵由来ES細胞および若齢マウスから樹立されたntES細胞と同様の性質を持つのか検討した。

(1) 高齢マウス体細胞からの ntES 細胞の樹立。

材料となる ntES 細胞を確実に得るためには、容易に準備でき、且つこれまでに ntES 細胞が樹立されている体細胞をドナーとして用いる必要がある。そこでオス、メスどちらの個体からも ntES 細胞を作出するために、尻尾の線維芽細胞をドナー細胞として用いた。また、対照として若齢マウスの尻尾細胞からも ntES 細胞を作出し、樹立効率の比較をした。

(2) 高齢マウス由来 ntES 細胞の正常性の検討。

樹立した ntES 細胞の遺伝子発現を免疫蛍光染色によって調べる。マーカーとして ES 細胞で発現している *Oct4*、*Nanog* 等を用いる。また未分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼによる染色を行った。樹立した ntES 細胞を体外で分化誘導し、受精卵由来 ES 細胞および若齢マウス由来 ntES 細胞の分化誘導率および形態的变化を比較した。さらに胚盤胞注入法によるキメラマウスの作製を行った。

(3) 種々の体細胞からの ntES 細胞の樹立。

これまでいろいろな体細胞からクローンマウスが作出されてきたが、核移植しても

クローン個体が作出できない細胞も存在する。卵細胞質内での初期化が不十分であることが原因として考えられているが、明らかではない。しかしながら、このような細胞のクローン胚からでも ntES 細胞は樹立できるかもしれない。そこでフリーズドライ処理した卵丘細胞および ES 細胞をドナー細胞として、ntES 細胞の樹立を試み、そこから樹立した ntES 細胞の性質を比較することで、ドナー細胞の状態が ntES 細胞の性質に及ぼす影響を調べた。

(4) 高齢マウス由来 ntES 細胞を用いた核移植すでに不妊となってしまっているような高齢個体から個体を得るには核移植が唯一の方法である。高齢個体の体細胞クローン作出は非常に困難であるが、ntES細胞を利用することで可能となるかもしれない。そこで、(1)で樹立した高齢マウス由来ntES細胞を核移植し、高齢マウス体細胞クローン個体作出を試みた。

4. 研究成果

(1) 高齢マウス体細胞からの ntES 細胞の樹立。

2年9カ月齢 BCF1 (B6×C3H) オス 2 匹、2年1カ月齢 BDF1 (B6×DBA2) メス 1 匹および2年齢 BDF1 オス 2 匹の尾から線維芽細胞を採取して核移植を行い、ntES 細胞樹立率を検討した。体細胞の直接核移植によるクローン個体作出に成功したのは 5 個体中 1 匹のみであったが、ntES 細胞は 5 個体すべてから樹立することに成功した。樹立率は 10~25%であり、以前に報告された若い個体からの樹立率と同等のものであった。

(2) 高齢マウス由来 ntES 細胞の正常性の検討。

樹立した ntES 細胞はすべて ES 細胞マーカー (*Oct4*、*Nanog*) および未分化マーカー

一(アルカリフォスファターゼ)に陽性であった。また、エンブリオイドボディーの形成も見られた。これらの結果から、高齢個体の体細胞でも卵細胞質内で正常に初期化され、ntES 細胞が樹立可能であること、高齢個体由来の ntES 細胞は ES 細胞と同様の性質をもつことが明らかとなった。さらにキメラマウスにおいて体細胞、生殖細胞系列への寄与も見られ、交配により高齢マウス 5 個体全てから産仔を得ることに成功した。

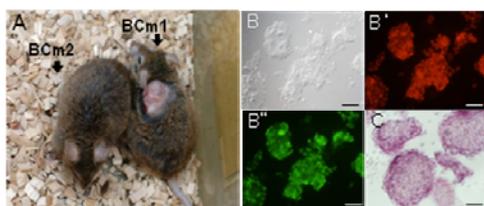


図 1. 超高齢ドナーマウスと樹立した ntES 細胞。A:2 年 9 ヶ月齢のマウス、B:ntES 細胞、B' :Oct4、B'' :Nanog、C: アルカリフォスファターゼ染色



図 2. キメラマウスと ntES 細胞由来の産仔(矢印)

(3) 種々の体細胞からの ntES 細胞の樹立。

直接クローン個体作出が困難な細胞のモデルとしてフリーズドライ処理した卵丘細胞および ES 細胞を用いて、ntES 細胞の樹立を試みた結果、胚盤胞形成率は卵丘細胞 10%、ES 細胞 4%と低率であったが、これらの胚盤胞から 20%以上の効率

で ntES 細胞を樹立できた。またこれらの ntES 細胞は ES 細胞マーカーおよび未分化マーカーに陽性でありキメラマウス形成能も持っていた。

(4) 高齢マウス由来 ntES 細胞を用いた核移植。

高齢マウスの全ゲノムの完全な復活を目指し、樹立した ntES 細胞を用いて核移植を行い、超高齢マウスのクローン個体作出を試みた。残念ながら全ての高齢個体からはクローン個体作出はできなかったものの、体細胞からの直接核移植ではクローンが作れなかった、2 年 9 ヶ月齢という超高齢個体から ntES 細胞をドナーとすることでクローン個体を得ることに成功した。



図 3. 2 年 9 ヶ月齢マウス ntES 細胞から得られたクローンマウス。左:出生直後。右:正常に成長したクローンマウス

以上の結果より、繁殖不能な高齢個体やフリーズドライした死んだ細胞からでも正常な ntES 細胞を樹立することが可能であり、また ntES 細胞を介することでこれまで不可能であった高齢個体からの産仔作出が可能となることが示された。本研究で用いた技術は畜産分野などでの個体生産にも応用可能なものと考えられる。

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 6 件)

- ① 若山清香、水谷英二(7名中6番目)、Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies、Stem Cells、25巻4号、986-993、2007年 査読有
- ② 富岡郁夫、水谷英二(7名中2番目)、Spindle formation and microtubule organization during first division in reconstructed rat embryos produced by somatic cell nuclear transfer.、Journal of Reproduction and Development、53巻4号、835-842、2007年、査読有
- ③ Tabar V.、水谷英二(11名中7番目)、Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice.、Nature Medicine、14巻4号、379-81、2008年、査読有
- ④ 水谷英二、小野哲男、李羽中、牧—末次里奈子、若山照彦、Propagation of senescent mice using nuclear transfer embryonic stem cell lines.、Genesis、46巻9号、478-83、2008年、査読有
- ⑤ 小野哲男、水谷英二、李羽中、若山照彦、Nuclear transfer preserves the nuclear genome of freeze-dried mouse cells.、The Journal of Reproduction and Development、54巻6号、486-91、2008年、査読有
- ⑥ 若山清香、水谷英二(7名中4番目)、Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years.、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America、105巻45号、17318-22、2008年、査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 水谷英二、高齢マウス体細胞からの胚性幹細胞の樹立と体細胞クローン個体作出、第100回 日本繁殖生物学会、2007年10月20日、東京大学農学部
- ② 水谷英二、Successfully producing cloned mice from somatic cells of aged mice via established ntES cell lines.、4th Asian Reproductive Biotechnology Society、2007年11月24-26日、Singapore
- ③ 水谷英二、Successfully producing cloned mice from somatic cells of aged mice via established ntES cell lines.、34th International Embryo Transfer Society、2008年1月5-9日、Denver, Colorado, USA

- ④ 水谷英二、ライブセルイメージングによるマウス体細胞クローン胚の解析およびクローン産仔の作出、第101 日本繁殖生物学会、2008年9月20日、九州大学医学部百年講堂
- ⑤ 水谷英二、Retrospective and correlation analysis of the cloned embryos using long-term, six dimensional live-cell imaging、5th Asian Reproductive Biotechnology Society、2008年11月26-30日、Kunming, Yunnan, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 英二 (MIZUTANI EIJI)

独立行政法人理化学研究所・ゲノム・リプログラミング研究チーム・研究員

研究者番号：80443034