

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06372

研究課題名(和文)ブタ体細胞核移植効率改善に向けたドナー細胞側のゲノム修飾効果の検討

研究課題名(英文) Attempts to perform genome modification towards donor cells for improving SCNT efficiency in pigs

研究代表者

佐藤 正宏 (Sato, Masahiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・共同研究員

研究者番号：30287099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞核移植(SCNT)経由のクローンブタ作製の効率化を目指し、CRISPR/Cas9法にてドナーブタ細胞ゲノム内のヒストン遺伝子群のメチル化を促す遺伝子(DNAメチル化転移酵素1, DNMT1)の破壊を試みた。ドナーブタ細胞にはSCNTの成否を判断するための予めOct-3/4 promoter + EGFP cDNA遺伝子発現ユニットが搭載されている。このゲノム編集細胞をSCNTに付すと、発生率が2倍ほど改善。更に、クローン胚(胚盤胞)でのEGFP蛍光発現が増大した。以上から、クローンブタ作製の効率化には、ヒストン遺伝子群のメチル化の阻害が重要であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、医学や農学分野で重要なブタの遺伝子改変を通じ、ヒトの健康・福祉に貢献する遺伝子改変クローンブタを効率的に作製することを目指す。そのカギとなるのが、ヒストンのDNAメチル化問題であり、今回、その是非をゲノム編集法と体細胞核移植(SCNT)実験により解明した(学術的意義)。これにより、クローンブタ作製は加速。その効果は医学や農林水産業の振興・発展に貢献すると考えられる(社会的意義)。

研究成果の概要(英文)：For enhancing the production efficiency of cloned piglets derived from somatic cell nuclear transfer, disruption of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) gene, which is thought to be important for DNA methylation, in the donor porcine fibroblasts was attempted using CRISPR/Cas9 system. Notably, in the genome of this donor cell an expression unit carrying Oct-3/4 promoter linked to enhanced green fluorescent protein (EGFP) cDNA has already been inserted. SCNT using the donor cells with mutated DNMT1 gene resulted in an increased developmental rate to blastocysts about 2-folds as well as increased expression of EGFP. These results indicate an importance of inhibiting DNA methylation to improve SCNT.

研究分野：発生工学

キーワード：体細胞核移植 クローンブタ 遺伝子改変 DNAメチル化 ゲノム編集 DNAメチル化転移酵素1遺伝子 Oct-3/4 EGFP

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物医学研究に重要な遺伝子改変ブタの作製は、マウスの場合と異なり、遺伝子改変された細胞（主に胎仔性繊維芽細胞）をドナーとする体細胞核移植（SCNT）経由のクローンブタ作製が今でも主流である。しかし、SCNT 効率は極端に低い。通常、ドナー細胞の核は SCNT 直後、卵細胞質内の初期化因子により遺伝子発現様式が幼弱期のものにリセットされる。しかし、ドナー核はこのようなりセットへの対応が不十分なため、多くの SCNT 胚は以降の発生に異常をきたす。特に、ヒストン H3K4、H3K9 のメチル化を促す DNA メチル化転移酵素 1 (DNMT1) 遺伝子は、SCNT 効率を下げる元凶と目されている。そこで、最近開発されたゲノム編集法の一つ CRISPR/Cas9 を用い、SCNT のドナー細胞である胎仔性繊維芽細胞内の DNMT1 遺伝子の破壊を考えた。この遺伝子改変細胞を SCNT に用いれば、SCNT 処置胚の発生が向上し、結果として、SCNT 効率が上がるのではと考えた。

2. 研究の目的

SCNT に使用されるドナー細胞である胎仔性繊維芽細胞に対し、強制的に「幼弱化（あるいは初期化）」を誘導させ、そのような処置を施された細胞をドナーとする SCNT を試み、SCNT 効率改善の有無を検討。最終的に効率的な遺伝子改変クローンブタ作成を目指す。

3. 研究の方法

既に作成済みの遺伝子改変ブタ繊維芽細胞株（未分化細胞マーカーとされる OCT3/4 遺伝子の promoter に駆動される緑蛍光蛋白遺伝子（enhanced green fluorescent protein, EGFP）発現ユニットを搭載；ここでは、「m4 細胞」と呼ぶ）にブタ DNMT1 遺伝子及びブタ α -1,3-galactosyltransferase (α -GalT) 遺伝子 (GGTA1) を標的とした CRISPR/Cas9 系 single guide (sg)RNA を設定し、この 2 種の sgRNA と Cas9 蛋白とを in vitro で混合した mixture (ribonucleoprotein, RNP) を Lonza 社の nucleofector システムに基づく電気穿孔法にて遺伝子導入した。遺伝子導入後、3 日目に m4 細胞を toxin-conjugated IB4 lectin (IB4SAP) に数時間作用させた。その後、細胞を正常培地で 10-12 日間ほど、培養し、生存 colony の出現を待った。因みに、IB4SAP は遺伝子操作されていないブタ細胞表面の α -Gal epitope (α -GalT により合成) に結合する。その後、IB4SAP に含まれる毒素 (toxin) が細胞内に入り込み、細胞を死に至らしめる。一方、CRISPR/Cas9 により GGTA1 遺伝子が破壊されると、細胞は α -Gal epitope を合成できないので、IB4SAP は細胞表面に結合できず、結果、当該細胞は生存する。即ち、遺伝子導入がなされ、且つ、内在性の標的遺伝子（特に、GGTA1）が破壊された細胞のみが生存する、ということになる（我々が独自開発した negative selection 系）。この場合、DNMT1 遺伝子を標的とした sgRNA も同時に細胞内に導入される筈で、IB4SAP による選別で生存した細胞は、DNMT1 遺伝子も破壊されている可能性が高い。最終的に、生じた細胞コロニーをいくつか pick up し、細胞を拡大させ、DNMT1 遺伝子の変異の有無を分子生物学的に調べた。

一方、DNMT1 遺伝子の変異が確認された細胞株に対し、EGFP 由来の蛍光の有無を調べた。細胞内の DNA メチル化が阻害されれば、細胞の遺伝子発現様式が幼弱期のものにリセットされ、その結果、OCT3/4 遺伝子が活性化され、細胞ゲノムに挿入された OCT3/4 promoter + EGFP cDNA + poly(A) site から成る transgene から EGFP 蛍光が発現される可能性があるためである。また、DNMT1 抗体による細胞免疫染色も試みた。

次に、このゲノム編集細胞をドナーとする SCNT を行った。ブタ屠場から採取した産業ブタ卵巢より、成熟卵母細胞を得た。micromanipulator にてドナー細胞を卵子と透明帯の間 (peri-vitelline space) におき、電気のショックを与えることで、ドナー細胞と卵子との細胞融合を誘導した。その後、SCNT 処理胚を培地で培養。胚盤胞期まで培養し、胚盤胞までの発生率及び当該胚における EGFP 蛍光発現を観察・記録した。これまでの実験では、無処置の m4 細胞をドナーとする SCNT を行うと、発生した胚盤胞（クローン胚）では、微弱な EGFP 蛍光を発することを確認している。これは、クローン胚の中でドナー由来の核がある程度、初期化（リセット）されていることを示す。しかし、その蛍光が弱いことから、初期化レベルはまだ低いと目される。一方、ゲノム編集された m4 細胞をドナーとする SCNT から発したクローン胚は、初期化がフルになされていると目され、OCT3/4 promoter から発現される EGFP の蛍光はもっと強くなると期待される。蛍光観察後の胚盤胞は、single embryos として採取し、そこから mRNA を単離。RT-seq による遺伝子の網羅的解析に回した。

4. 研究成果

m4 細胞への遺伝子導入、続く、IB4SAP 処理後、正常培地で培養。10-12 日目に 30 数個の colony の出現を見た。そのうち、10 個の colony を拾い、拡大。10 個のうち 3 個に親株 (intact) では見られない緑蛍光の発現が微弱ながら見られた。後のゲノム解析から、これら 3 個の株では、DNMT1 遺伝子が完全に破壊されていることを確認。更に、DNMT1 抗体による細胞免疫染色でも陰性反応を確認した。これは、DNMT1 遺伝子の破壊により、内在性 OCT3/4 遺伝子が活性化されたこと、即ち、細胞が初期化されたことを示唆する。実際、他の未分化マーカーである alkaline

phosphatase (ALP) の発現も亢進していた。但し、細胞形態は親株と同じで、fibroblastic であった。

次いで、ゲノム編集細胞をドナーとする SCNT を行った。一般的に、ドナー細胞が適切に初期化されておれば、SCNT 胚の発生も単為発生胚（ブタの場合、少なくとも胚盤胞までは、受精卵と同等の発生率を示す）並みに達することが期待される。m4 細胞（親株）をドナーとした SCNT では、胚盤胞への発生率は、~22%であった。一方、ゲノム編集された m4 細胞をドナーとした SCNT では、胚盤胞への発生率は、~43%であった。即ち、クローン胚の発生率は、2 倍ほど改善されたことになる。また、クローン胚の EGFP 蛍光を観察した。その結果、親株をドナーとする SCNT では、発生した胚盤胞全体（内部細胞塊も含む）を通じ、緑蛍光を微弱ながら発したが、ゲノム編集された m4 細胞をドナーとする SCNT では、胚盤胞全体がやや強い蛍光を発していた。これらの点は、DNMT1 遺伝子の破壊の結果、クローン胚での遺伝子発現状況が幼弱状態のそれにリセットされた可能性を示唆する。

以上から、DNMT1 阻害により、細胞は高度に初期化され、SCNT 胚作成における DNMT1 遺伝子破壊は有効という点が確認された。現在、蛍光観察後の胚盤胞を single embryos として採取し、そこから mRNA を単離。RT-seq.による遺伝子の網羅的解析を行っている。更に、DNMT1 遺伝子破壊株が iPS 細胞に近いポテンシャルを示す可能性があるため、これを数個単為発生胚（4-cell stage）の囲卵腔に顕微注入し、それらが内部細胞塊形成に寄与するかどうか（キメラ形成能の有無）を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計32件（うち査読付論文 32件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 32件）

1. 著者名 Soda Miki, Saitoh Issei, Murakami Tomoya, Inada Emi, Iwase Yoko, Noguchi Hirofumi, Shibasaki Shinji, Kurosawa Mie, Sawami Tadashi, Terunuma Miho, Kubota Naoko, Terao Yutaka, Ohshima Hayato, Hayasaki Haruaki, Sato Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Repeated human deciduous tooth-derived dental pulp cell reprogramming factor transfection yields multipotent intermediate cells with enhanced iPS cell formation capability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37291-2	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 Nakamura Shingo, Ishihara Masayuki, Ando Naoko, Watanabe Satoshi, Sakurai Takayuki, Sato Masahiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Transplacental delivery of genome editing components causes mutations in embryonic cardiomyocytes of mid-gestational murine fetuses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUBMB Life	6. 最初と最後の頁 835 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iub.2004	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 Sato Masahiro, Nakamura Shingo	4. 巻 -
2. 論文標題 Possible Production of Genome-Edited Animals Using Gene-Engineered Sperm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene Editing - Technologies and Applications (Edited by: Yuan-Chuan Chen and Shiu-Jau)(InTechOpen)	6. 最初と最後の頁 1 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.84859	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 Inada Emi, Saitoh Issei, Kubota Naoko, Iwase Yoko, Murakami Tomoya, Sawami Tadashi, Yamasaki Youichi, Sato Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Increased Expression of Cell Surface SSEA-1 is Closely Associated with Na ⁺ -Like Conversion from Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells-Derived iPS Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1651 ~ 1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20071651	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 Sato Masahiro, Saitoh Issei, Inada Emi, Nakamura Shingo, Watanabe Satoshi	4. 巻 2019
2. 論文標題 Potential for Isolation of Immortalized Hepatocyte Cell Lines by Liver-Directed In Vivo Gene Delivery of Transposons in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/5129526	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 Sato Masahiro, Miyoshi Kazuchika, Kawaguchi Hiroaki, Inada Emi, Saitoh Issei, Tanimoto Akihide	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent Advance in Genome Editing-Based Gene Modification in Pigs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Technology in Animals (Edited by: Juan Carlos Garon Poggi and Katy Satue Ambrojo) (InTechOpen)	6. 最初と最後の頁 1~35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.88022	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 Ohtsuka Masato, Sato Masahiro	4. 巻 61
2. 論文標題 i GONAD : A method for generating genome edited animals without ex vivo handling of embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 306~315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12620	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 Sato Masahiro, Inada Emi, Saitoh Issei, Nakamura Shingo, Watanabe Satoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 In Vivo Piggybac-Based Gene Delivery towards Murine Pancreatic Parenchyma Confers Sustained Expression of Gene of Interest	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3116~3116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133116	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 Sakurai Takayuki, Kamiyoshi Akiko, Takei Norio, Watanabe Satoshi, Sato Masahiro, Shindo Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Bindel-PCR: a novel and convenient method for identifying CRISPR/Cas9-induced biallelic mutants through modified PCR using Thermus aquaticus DNA polymerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46357-8	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 Nakamura Shingo, Sato Masahiro, Sato Yoko, Ando Naoko, Takayama Tomohiro, Fujita Masanori, Ishihara Masayuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Synthesis and Application of Silver Nanoparticles (Ag NPs) for the Prevention of Infection in Healthcare Workers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3620 ~ 3620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20153620	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 Gurumurthy Channabasavaiah B., Sato Masahiro, Nakamura Ayaka, Inui Masafumi, Kawano Natsuko, Islam Md Atiqul, Ogiwara Sanae, Takabayashi Shuji, Matsuyama Makoto, Nakagawa Shinichi, Miura Hiromi, Ohtsuka Masato	4. 巻 14
2. 論文標題 Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 2452 ~ 2482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-019-0187-x	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 Inada Emi, Saitoh Issei, Kubota Naoko, Iwase Yoko, Kiyokawa Yuki, Shibasaki Shinji, Noguchi Hirofumi, Yamasaki Youichi, Sato Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 piggyBac Transposon-Based immortalization of Human Deciduous Tooth Dental Pulp Cells with Multipotency and Non-Tumorigenic Potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4904 ~ 4904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194904	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 Nakamura S, Watanabe S, Ando N, Ishihara M, Sato M	4. 巻 20
2. 論文標題 Transplacental Gene Delivery (TPGD) as a Noninvasive Tool for Fetal Gene Manipulation in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5926 ~ 5926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20235926	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 Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Watanabe S, Sato M, Shindo T	4. 巻 10
2. 論文標題 Production of genetically engineered mice with higher efficiency, lower mosaicism, and multiplexing capability using maternally expressed Cas9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57996-7	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 Tamura S, Yasuoka Y, Miura H, Takahashi G, Sato M, Ohtsuka M	4. 巻 69
2. 論文標題 Thy1 promoter activity in the Rosa26 locus in mice: lessons from Dre-rox conditional expression system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 287-294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.20-0002	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 Sato M, Miyagasako M, Takabayashi S, Ohtsuka M, Hatada I, Horii T	4. 巻 9
2. 論文標題 Sequential i-GONAD: an improved in vivo technique for CRISPR/Cas9-based genetic manipulations in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9030546	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 Sato M, Inada E, Saitoh I, Watanabe S, Nakamura S	4. 巻 12
2. 論文標題 piggyBac-based non-viral in vivo gene delivery useful for production of genetically modified animals and organs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12030277	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 Sato M, Takabayashi S, Akasaka E, Nakamura S	4. 巻 9
2. 論文標題 Recent advances and future perspectives of in vivo targeted delivery of genome-editing reagents to germ cells, embryos, and fetuses in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9040799	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 Kobayashi Y, Aoshima T, Ito R, Shinmura R, Ohtsuka M, Akasaka E, Sato M, Takabayashi S	4. 巻 9
2. 論文標題 Modification of i-GONAD suitable for production of genome-edited C57BL/6 inbred mouse strain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9040957	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 Nakamura S, Ando N, Sato M, Ishihara M	4. 巻 21
2. 論文標題 Ultraviolet irradiation enhances the microbicidal activity of silver nanoparticles by hydroxyl radicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21093204	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 Nakamura S, Ando N, Watanabe S, Akasaka E, Ishihara M, Sato M	4. 巻 9
2. 論文標題 Hydrodynamics-based transplacental delivery as a useful noninvasive tool for manipulating fetal genome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9071744	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 Nakamura S, Ando N, Ishihara M, Sato M	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of novel heparin/protamine nanoparticles useful for delivery of exogenous proteins in vitro and in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano10081584	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 Kiyokawa Y, Sato M, Noguchi H, Inada E, Iwase Y, Kubota N, Sawami T, Terunuma M, Maeda T, Hayasaki H, Saitoh I	4. 巻 9
2. 論文標題 Drug-induced naive iPS cells exhibit better performance than primed iPS cells with respect to the ability to differentiate into pancreatic -cell lineage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 E2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9092838	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 Nakamura S, Ando N, Ishihara M, Sato M	4. 巻 4
2. 論文標題 In vivo hepatocyte genome manipulation via intravenous injection of genome editing components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2004119	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 Takabayashi S, Aoshima T, Kobayashi Y, Takagi H, Akasaka E, Sato M	4. 巻 4
2. 論文標題 Successful i-GONAD in Brown Norway rats by modification of in vivo electroporation conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2004121	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 Sato M, Jin H, Akasaka E, Miyoshi M	4. 巻 5
2. 論文標題 In vitro electroporation in the presence of CRISPR/Cas9 reagents as a safe and useful method for producing biallelic knock out porcine embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2101123	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 H, Imafuku J, Kurosaki A, Sato M, Ma Y, Zhang G, Mizutani A, Kamimura K, Gurumurthy CB, Liu D, Ohtsuka M	4. 巻 24
2. 論文標題 Novel reporter mouse models useful for evaluating in vivo somatic cell gene editing and for optimization of methods of delivering genome editing tools	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy: Nucleic Acid	6. 最初と最後の頁 325-336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.03.003	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 Sato M, Saitoh I, Akasaka E, Inada E	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of a novel, pipette tip-aided cell cloning method for effective isolation of genome-edited porcine cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2101126	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 Inada E, Saitoh I, Kubota N, Iwase Y, Kiyokawa Y, Noguchi H, Yamasaki Y, Sato M	4. 巻 23
2. 論文標題 RNA analysis based on a small number of manually isolated fixed cells (RNA-snMIFxC) to profile stem cells from human deciduous tooth-derived dental pulp cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Procedure Online	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12575-021-00149-5	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 Aoshima T, Kobayashi Y, Takagi H, Iijima K, Sato M, Takabayashi S	4. 巻 21
2. 論文標題 Modification of improved-genome editing via oviductal nucleic acids delivery (i-GONAD)-mediated knock-in in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biotechnology	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12896-021-00723-5	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 Sato M, Kiyokawa Y, Inada E, Akasaka E, Watanabe S, Saitoh I	4. 巻 5
2. 論文標題 Adipose tissue as a useful material for the grafting of tumorigenic cells and juvenile tissues in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OBM Transplantation	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.transplant.2104155	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 Sato M, Saitoh I, Kiyokawa, Iwase Y, Kubota N, Ibano N, Noguchi H, Yamasaki Y, Inada E	4. 巻 10
2. 論文標題 Tissue-nonspecific alkaline phosphatase, a possible mediator of cell maturation: Towards a new paradigm.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123338	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青島 拓也、小林 由香利、佐藤 正宏、高林 秀次
2. 発表標題 i-GONAD法によるラットでのノックイン効率向上に向けた試み
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高林 秀次、青島 拓也、小林 由香利、佐藤 正宏
2. 発表標題 ラット i-GONAD 法におけるノックイン効率改善に向けた試み
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 伸吾、安藤 尚子、渡部 聡、石原 雅之、佐藤 正宏
2. 発表標題 CRISPR成分の母体静脈注射によって胎仔心臓でゲノム編集が生じる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部 聡、櫻井 敬之、中村 伸吾、平岩 秀樹、土居 考爾、安江 博、佐藤 正宏
2. 発表標題 ブタ脂肪前駆細胞PSPAにおいて細胞分化に伴い発現が変化する遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	三好 和睦 (Miyoshi Kazuchika) (70363611)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授 (17701)	

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0件

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
---------	---------