

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700455

研究課題名（和文） 効率的クローン胚作出に向けた基盤技術の確立

研究課題名（英文） Basic study for production of efficient somatic cell cloned embryos

研究代表者

下澤 律浩（SHIMOZAWA NOBUHIRO）

独立行政法人 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号：50300786

研究成果の概要（和文）：

サル-ウサギ異種間クローン胚の培養にはサル受精卵で使用される CMRL-1066 液が適していることを示した。また、分裂中期のサル体細胞を用いた核移植では、ウサギ未受精卵への移植後に体細胞核は分裂中期像を維持した。分裂中期にある体細胞を用いたとき、活性化法としてイオノマイシンとサイクロヘキシミドの複合処理が適していることを明らかにした。さらにプロテアソーム阻害剤である MG132 を用いることで異種間核移植胚の 8 細胞期への発生は改善されることを明らかにした。卵の採取が難しい動物種において、異種間核移植は基礎的な技術の検討に利用できることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Firstly, it was indicated that CMRL-1066 medium, generally using for macaque monkey embryos, were available as the culture medium of monkey-rabbit interspecies somatic cell nuclear transfer embryos. In addition, by nuclear transfer using cynomolgus monkey somatic cells arrested at metaphase of cell cycle by nocodazole, the metaphase stage was maintained in transferred rabbit oocyte. It was clarified that activation by a combination of ionomycin and cycloheximide was suitable for nuclear transfer using the somatic cells at metaphase. Development to 8-cell stage of the interspecies nuclear transfer embryos was improved by using MG132. In the animals that collection of many oocytes are difficult, these results showed that the interspecies nuclear transfer was available for examination of the basic techniques.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：クローン、核移植、体外培養、単為発生、活性化

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

体細胞クローン研究は、免疫拒絶のないクローン ES 細胞を再生医療などへ応用するだけでなく、クローン個体の作出にも応用できる。クローン ES 細胞を臨床応用する際に、安全性・効果を予め調べる必要があり、ヒトと同じ霊長類であるサル類でクローン ES 細胞を樹立する意義は大きい。一方、クローン個体では、同じゲノムを持つ個体を作り出せること、培養細胞への遺伝子操作により、遺伝子操作個体が従来法よりも確実に作り出せることにある。これは遺伝子操作された実験動物による医学研究だけでなく生物学的研究などにも応用できる。このため、クローン技術の基礎検討を重ねる必要がある。しかし、サル類では通常排卵が 1 個と、ホルモン投与などの外部刺激によりクローン胚作成に必要な「卵」の確保および個体数を確保することはマウスなどと異なり難しい。そこで異種ではあるが、卵の確保が比較的容易、かつ大きさなどサル卵に似たウサギ卵を利用した体細胞クローン胚作出(異種間核移植)の基礎を検討し、同種間核移植胚の発生をより効率化する技術の確立を図る。ウサギ卵を利用したヒト体細胞由来の ES 細胞が作出され、同様にサル類でも報告されたことから、本研究のアプローチは基礎検討として十分有効である。

2. 研究の目的

本申請は、実験動物としてのサル種だけでなく、卵子の確保が難しい他の動物種、例えば野生動物にも応用可能となるクローン作出技術の基盤技術を開発するものである。本研究を基礎としたクローン作出技術によってクローン ES 細胞ならびに個体の作製に結びつき、さらにそれらは個体保全あるいは遺伝子操作個体作出など実験動物として生物資源分野や再生医療などの医学分野などに大きく貢献することが期待で

きる。ウサギ卵へサル体細胞を核移植することで、同種間クローンによる作出研究の実施が困難な動物種における体細胞核移植研究の基盤技術の確立を目指し、低率なクローン胚の発生を改善することを目的とする。

3. 研究の方法

クローン胚の体外培養および活性化処理法を決めるために、ウサギ受精卵および未受精卵を使用して、次のような検討を行った。サルの核をウサギ卵細胞質中に導入するため、核移植によって作出された構築卵の培養に使用する培養液として、ウサギ受精卵およびサル受精卵で用いられている培養液の 2 種間 (RD および CMRL) でウサギ受精卵を培養して検討した。次に、体細胞核移植後に活性化処理を施し、発生を誘導する必要がある。これは、単為発生と同じ処理であることから、ウサギ未受精卵を採取し、イオノマイシンとジメチルアミノプリンあるいはサイクロヘキシミドの複合処理による二つの活性化法を検討した。

異種核移植胚の発生確認に先立ち、カニクイザル羊膜細胞が分裂中期に同調されているか否かを確認するために、ノコダゾール処理を4-6時間行って接着が弱くなった細胞を回収し、その中から直径 30 μ m 程度の細胞をヘキスト染色して、染色体像を調べた。次に、卵子染色体を確認しやすくするために、ノコダゾール処理を行い、染色体部の突出を誘導し、除去した。この除核卵子にノコダゾール処理後の羊膜細胞を核移植し、移植直後の染色体像について、ホルマウント標本を作製して調べた。この卵細胞質に羊膜細胞を導入し、活性化処理を行った。活性化処理については、単為発生で検討した処理法を応用した。さらに、ウサギ卵細胞質中に存在する M-phase promoting factor (MPF) を安定させた状態での核移植が有効か否かを確認する

ために、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加した核移植を実施した。

4. 研究成果

ウサギ受精卵およびサル受精卵で用いられている培養液の 2 種でウサギ受精卵を培養したところ、両者間に胚盤胞への発生に差は見られなかったが、その成長速度を考慮するとサル受精卵用培養液 (CMRL-1066) の使用が妥当であると考えられた。次に、分裂中期での体細胞核移植での活性化処理として、ウサギ未受精卵を用いた検討からイオノマイシンとサイクロヘキシミドの複合処理が適していることが判った。

サル体細胞である羊膜細胞はノコダゾール処理により接着の弱くなって回収された細胞中から分裂中期の細胞を回収できる (図1) ことが判った。ウサギ卵の核を顕微鏡下で視認することは難しい。そこで卵をノコダゾール処理することで染色体部分が突出し (図2)、その部位を除去することが可能であることを確認した。このような除核したウサギ卵との融合で分裂中期像を維持できる (図3) ことを示した。これは細胞周期の不一致による障害を避けるとともにサル体細胞核の初期化を誘導できる可能性を示唆する。

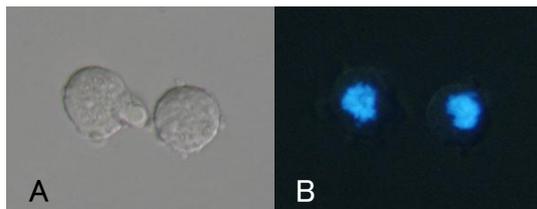


図1. ノコダゾール処理カニクイザル羊膜細胞
A:明視野、B:紫外線 (ヘキスト染色)



図2. ノコダゾール処理されたウサギ卵

ウサギ卵の染色体部分が卵細胞膜より突出した状態

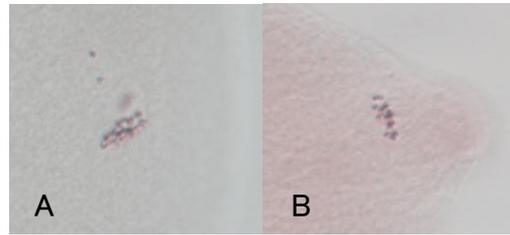


図3. ウサギ卵中へ導入直後のサル体細胞核
A:異種間核移植、B:ウサギ卵 (コントロール)

除核したウサギ卵にドナー細胞を融合し作製した構築卵に活性化処理 (イオノマイシンとサイクロヘキシミド) を行ったところ、その多くで正常な形態と考えられる1前核 1 極体を示した (図4)。しかしながら、8細胞期への発生は認められなかった。

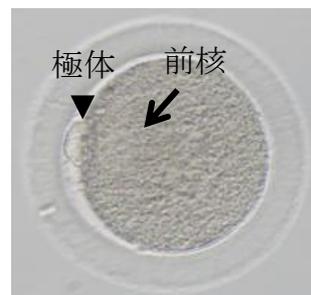


図4. 活性化後の異種核移植胚

体細胞核由来の偽極体を放出し、正常な 1 前核 1 極体の形態を示した異種核移植胚

次に、MPF の安定した状態での核移植を行うために、MG132 を含む溶液中で核移植を実施した。この場合も多くの構築卵で1前核 1 極体を示した。体外発生は改善され、8細胞期への発生が認められた。MG132 の添加による発生の改善は、MPF が安定して存在したことで卵細胞質が細胞周期の分裂中期の状態に維持されたため、体細胞との細胞周期同期が効果的であったためと推察される。しかし、胚盤胞への発生が

見られなかったことは、MG132 処理の毒性が影響されている可能性も考えられ、その処理の濃度や時間のさらなる検討が必要である。

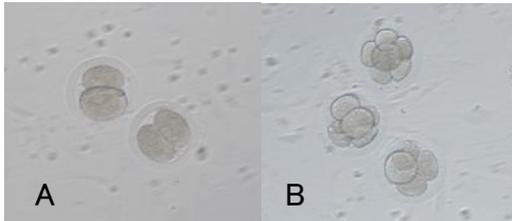


図5. 異種核移植胚の発生

A:2 細胞期胚、B:4-8 細胞期胚

多数のサル卵を用いた核移植法の検討は難しいため、本研究のようにウサギ卵を用いた異種間核移植は、核移植卵の構築方法や核の動態など基礎的な検討に利用できることを示した。

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1件)

Shimozawa N, Nakamura S, Takahashi I, Hatori M, Sankai T. Characterization of a novel embryonic stem cell line from an intracytoplasmic sperm injection-derived blastocyst in the African green monkey. 139. 565-573. 2010. 査読有り

[学会発表] (計2件)

羽鳥真功、Fowzia Sultana、下澤律造、八神健一、山海直. カニクイザル胚性幹細胞株の神経細胞分化誘導における FGF2 の影響. 第 56 回日本実験動物学会. 2009 年 5 月 14-15 日. 埼玉

下澤律造、高橋一郎、柴田宏昭、小埜良一、伊奈田宏康、野阪哲哉、保富康宏. カニクイザル体細胞に由来する人工多能性幹細胞の作製.

第 57 回日本実験動物学会. 2010 年 5 月 12-13 日. 京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

下澤 律浩 (SHIMOZAWA NOBUHIRO)

独立行政法人 医薬基盤研究所・霊長類医

科学研究センター・研究員

研究者番号: 50300786