

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23248048

研究課題名(和文) 絶滅動物の細胞再生および有用遺伝子回収方法の確立

研究課題名(英文) Feasibility Study for the generation of live cell from extinct or endangered animal

研究代表者

若山 照彦 (WAKAYAMA, Teruhiko)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：40360672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,200,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅あるいは絶滅危惧種を復活させることができれば、失われた遺伝子の機能解析や産物利用が可能となる。研究代表者らはそのための基礎研究として、核移植技術を根本から見直し改善すると同時に、クローン個体の大量生産の方法や、凍結死体、毛皮、糞や尿に含まれる細胞からクローン個体の作出を目指した。その結果、最新の技術を用いればクローン動物からクローン動物を作りだすことで無限生産の可能性を示し、また、尿に含まれている細胞からクローンを作りだすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：One interesting application of nuclear transfer (NT) techniques is the resurrection of extinct species and the rescue of endangered species. However, current success rate for producing live animals by cloning is very low. Therefore, we tried to improve nuclear transfer procedure one by one, and applied this techniques to generate cloned mice from frozen cadaver or fur, or cells collected from excrement or urine. By using most recent nuclear transfer techniques, we could succeeded to generate cloned mice from somatic cells of cloned mice, and probably this process can repeat unlimitedly because we could not find any accumulation of abnormality in those re-cloned mice. On the other hand, we also succeeded to generate cloned mice from urine-derived cells. This suggest that cells derived from urine, which can be collected noninvasively, may be used in the rescue of endangered mammalian species by using nuclear transfer without causing injury to the animal.

研究分野：発生工学 生殖生物学

キーワード：クローン 核移植 絶滅動物 絶滅危惧種 発生工学

1. 研究開始当初の背景

すでに絶滅してしまった動物を復活させることは昔から夢物語として語られているが、もし本当に復活させることに成功すれば、その遺伝子の機能や産物など太古のサンプルが新鮮な状態で大量に利用可能となり、その動物種についての研究を大きく発展させるだろう。また野生動物の家畜化にともなって失われてしまった耐病性や耐寒性、繁殖能など、農産業にとって重要な遺伝子資源を手に入れることもできるだろう。しかしこれまで絶滅動物の未知遺伝子の探索およびその実際の機能の確認ということを実格的に目指した研究はない。一方、研究代表者はこれまでの研究で、永久凍土から発掘される凍結死体や毛皮などから回収した核であっても、DNAダメージが少なければ技術的な改良によって個体をクローンとして復活させられる可能を示してきた。

2. 研究の目的

これまでに行ってきた予備実験によって、凍結死体や毛皮の核から個体を復活させるためには、さらなるブレイクスルーが多数必要であることが分かってきた。そこで本研究では様々な方向から可能性を探ることにした。

(1) 体細胞核移植の基本技術をブラッシュアップし、出産率を改善する。核移植には様々な薬品を用いるが、それぞれの薬品の毒性や最適使用方法を再度確認し、もっとも効率の良い方法をみつけだす。

(2) 凍結死体、毛皮、はく製、および糞や尿(絶滅危惧種を想定)から回収した細胞核からクローン胚盤胞を作出する。これらの実験では、最も重要なのが核の回収方法であることが分かっている。核を染色無しで識別する方法や、回収した核の保存方法を確立する。

(3) クローンES細胞を樹立する。核移植によって得られたクローン胚からクローン個体の作製は依然として難しく、本研究のようにさらに成功率が低いと予想される実験の場合は、いきなり個体の作製を目指すのではなく、より成功率の高いクローン胚からクローンES細胞の樹立を目指す方が確実である。

3. 研究の方法

(1) 基本的な核移植技術の改善。凍結死体をドナー個体として用いる場合、マウスでは脳細胞、ラットでは血液細胞(未発表)が適していることから、動物種によって最適な臓器が異なることが分かってきた。そこで核移植に最適な細胞種の探索を行う。また、これまで物理的なホモジナイズでのみ核の取り出しに成功しているが、この方法には量的な限界があり、化学処理方法(酵素やデタージェント)を見つけ出さなければならない。一方、クローンマウスの成功率が低い原因として、核移植の各工程で使われる薬品が悪影響

を与えている可能性が考えられることから、各工程で使われている薬品について代替品や使用方法の検討を行い、初期化が促進されるか検討した。

(2) 凍結死体、毛皮あるいは糞や尿から細胞の回収及び核移植技術の確立。凍結死体の場合、様々な臓器の細胞で成功率を比較する。核の取り出しやすさも検討する。毛皮は当研究室で作ったもので、デシケーター内で数年間保存していたものを用いる。予備実験から、毛皮の核は固化しており、核の発見方法と扱い方法を確立する必要がある。糞から採取する細胞は、現時点で全く初期化できないため、回収後に何らかの前処理が必要である。尿からはどんな細胞が回収できるか確かめ、核移植に利用可能か調べる。全身でGFPを発現するマウスを用いることで、糞や尿からは細胞の回収が容易になると思われる。

(3) クローンES細胞の樹立。凍結死体や毛皮、糞尿から回収した核で作製したクローン胚からES細胞の樹立を試みる。最初にドナー核のダメージを調べ、次に臓器、細胞種間でのES細胞の樹立成績を比較し、それぞれのES細胞の正常性を検討する。核のダメージについては、さまざまなドナー核で作った初期胚に対して免疫組織染色(ヒストンやDNAのエピジェネティックな変化、および γ H2AXなどによりDNAの修復を観察)やアクリジンオレンジ染色(クロマチン構造について)、あるいはコメットアッセイ(DNA断片化)などで検出する。ES細胞の正常性についてはキメラマウスの作成、体外分化能、およびDNAマイクロアレイなどを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 再クローン技術を確立し、25回繰り返すことに成功。哺乳動物のクローン作出は、優良家畜の大規模な生産や絶滅危惧種の保全を可能にする新しい技術として期待されている。しかし、1度に作り出せるクローン動物の数は限られているうえ、これらクローン動物が死ぬとその遺伝情報は、せっかく絶滅動物をよみがえらせたとしても、1世代で途切れてしまう。そのため、永続的に貴重な動物を維持し続けるには、クローン動物の体細胞から再びクローン動物を作り出す連続核移植(再クローニング)技術が必要となる。しかし、従来の再クローニングでは、核移植を繰り返すごとに出産率は低下し、マウスで6世代、ウシやネコで2世代までが限界だった。この原因は、クローン技術特有の「初期化異常」が、核移植を行うたびに蓄積するためと考えられていた。

研究代表者らは1998年に初めてクローンマウスを作出して以来、核移植技術の改良を行っており、今回、最新の技術で1匹の雌のドナーマウスから連続核移植を行った。その結果、再クローニングで生まれるクローンマウス(再クローンマウス)の数は25世

代で 581 匹に達し、現在は 34 世代目、700 匹以上が誕生している。核移植の出産率は 1 世代目の 7%から上昇傾向を示し、最高で

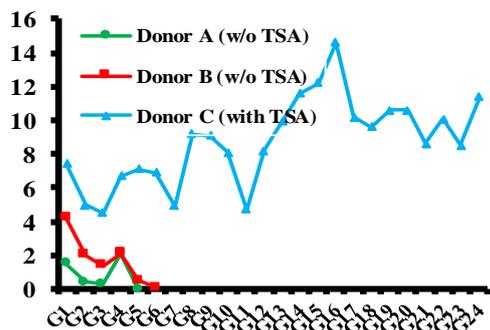


図 1.再クローンマウスの出産率

15%を記録した (図 1)。

生まれたクローンマウスについては繁殖能力、寿命、細胞年齢の指標となる染色体末端のテロメアの長さなどを調べ異常がないことを確認した。また 1 世代目と 20 世代目のクローンマウスについて遺伝子の発現を網羅的に調べた結果、核移植を繰り返しても初期化異常は蓄積しないことが明らかになった。本研究成果は、米国の科学雑誌 *Cell Stem Cell* (IF : 23)の表紙に選ばれ、国内外の新聞やテレビで紹介された (Wakayama et al., 2013)。

(2) 尿からクローンマウスの作出に成功。絶滅危惧種や野生動物にクローン技術を応用する場合、ヒトに慣れていないため、捕まえて体を押さえつけるだけでも死んでしまう危険性がある。そこで動物にストレスを与えずに簡便に体細胞を回収する方法として、尿の中に存在する細胞から直接クローンマウスを作出することを試みた。これまでも毛や唾液など個体を全く傷つけずに DNA を採取する方法はいくつか報告されていた。しかしそれらに含まれる細胞は角質化しており、親子鑑定のための DNA 抽出には使えてもクローン動物の作出には使えなかった。一方、尿の中に体細胞が含まれていることは古くから知られており、それらの細胞を無菌状態で回収できれば実験室で増殖させることも可能だった。しかし絶滅危惧種など野生動物から尿を無菌的に採取することは難しく、またげっ歯類など小型動物からはわずかな尿しか回収できないため、実際に尿が本目的に利用可能かわかっていなかった。

研究代表者らは非無菌状態で尿を採取し、尿中にあった細胞を直接核移植に使用したところ、オスでもメスでも、あるいは老齢個体でも、その尿細胞からクローンマウスを作出することに成功した (図 2)。また得られたオスとメスのクローンマウスを交配したところ、正常な繁殖能力を有することが確認された。さらに、クローン胚からクローン ES 細胞の樹立にも成功した。樹立成績は高く、



図 2.尿の細胞由来のクローンマウス

尿細胞が 15 個あれば 1 株できる計算となる。

これらの成果から、本方法は絶滅危惧種など貴重な動物において、体をいっさい傷つけずにクローン個体を作成する重要な手段になり得ること、野生動物など尿を無菌状態で採取することが困難な動物や、小型で回収できる尿の量が少ない動物であっても、直接核移植であればクローン個体やクローン ES 細胞を作るために十分な細胞数が得られることが明らかとなった。本研究成果は、イギリスの科学雑誌 *Scientific Reports* に掲載され、国内外の新聞やテレビおよび *Nature Japan* のお勧めコンテンツでも紹介された (Mizutani et al., 2016)。

(3) 核移植における基本技術の改善。哺乳類の核移植実験が始まった 1980 年代初頭から、卵子の核の除去および活性化時の染色体損失を防ぐため、細胞骨格であるアクチンの重合を阻害する薬品としてサイトカラシン B が用いられてきた。また、可視光では認識が難しい核は蛍光顕微鏡で観察されてきた。しかしこれらは細胞に対して明らかな毒性があるにもかかわらず、不可欠な処理として代替法は検討されてこなかった。そこで研究代表者らは原点に帰り、核移植の常法とされている各工程の処理方法について検討しなおすことにした。

細胞骨格阻害剤について研究代表者らは、サイトカラシン B と同様にアクチンの重合を阻害するラトランクリン A (ラット A) の効果を検討した。最初に薬品処理後のアクチンの状態を調べたところ、サイトカラシン処理卵子はアクチンの分布が正常に戻るまで 1 時間かかるのに対して、ラット A は処理終了後直ちに正常な状態に戻っていた。この結果は、これまで毒性はないと思われていたサイトカラシンにも毒性があり、ラット A はその毒性を大きく低下させることを示している。次に実際にクローン胚の発生率を比較したところ、ラット A 処理は、従来のサイトカラシン処理にくらべ 2 倍近くまでクローン胚の出産率を改善できることが明らかとなった。また、従来法ではサイトカラシンの毒性のため、活性化処理 (6 時間) と初期化促進

処理（4時間）の間にサイトカラシンを取り除く作業が必要だった。しかしラットAには細胞毒性が低いことから、初期化および活性化処理の工程において、途中で洗浄することなく10時間連続で培養しても高い産仔率が得られることが確認できた（表1）。（Terashita et al., BOR. 2012）

表1. ラットA処理によるクローン産仔率

実験区	処理時間	核移植数	クローン
CB	6h	290	13 (6%)
CB	10h	104	0
LatA	10h	157	19 (16%)

CB:サイトカラシン B: LatA: ラットA

ラットA処理による出産率改善理由について調べたところ、ラットA処理したクローン胚は、サイトカラシン処理に比べ初期発生時における染色体分配異常が大きく低下することが分かった。サイトカラシンによるアクチン重合阻害効果が初期発生にまで影響を与えていたのだと考えられる。一方、これまで報告されているクローン胚のエピジェネティック修飾異常は、ラットA処理したクローン胚でも改善されていないことが確認された（図3）。

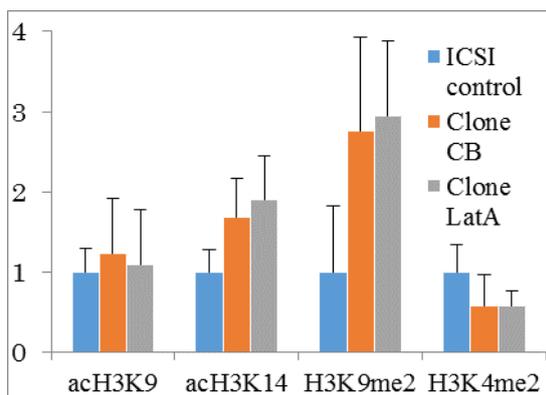


図3. ラットA処理クローン胚のエピジェネティック修飾異常

一般的にクローン胚の低出産率は初期化不全によるエピジェネティック異常によるものだと考えられているが、我々の結果はエピジェネティック修飾だけでなく核移植の技術面でもまだまだ改善の余地があることを示していた（Terashita et al., PLoS One 2013）。

（4）蛍光毒性回避方法の開発。

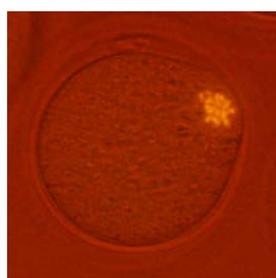
蛍光観察におけるUVランプの照射は細胞毒性を引き起こし、クローン胚の発生に影響を与えている可能性がある。そこでUVランプの照射が胚へどのような影響を引き起こすのか検討し、UVランプに代わる新たな方法を開発した。

マウス卵子へ様々な波長を照射した結果、341nmの波長ではわずか4秒で発生できなくなるが、539nmの波長では15分間照射しても発生可能なことが明らかとなった（Terashita

et al., JRD 2011）。

光毒性はUVランプを使う以上避けられないと考え、研究代表者らはUVランプを使用せず蛍光観察する方法を考案した。通常の顕微鏡では、明視野の観察にはハロゲンランプが用いられているが、このランプの光エネルギーはUVランプよりかなり低い。そのため、これまでハロゲンランプで蛍光色素を励起することが不可能だと考えられていた。今回研究代表者らは、ハロゲンランプに特注のアダプターを接続することで、UVランプを使わず蛍光観察することに成功した（図4）。本方法を用いると、蛍光色素の退色もなく、長期間の観察も可能となる。

また、本アダプターを取り付ければ安い顕



微鏡でも蛍光観察が可能となることから、中学や高校でも蛍光観察が可能になるだろう（Yamagata et al., PLoS One 2012）。

図4. ハロゲンランプで観察した蛍光画像

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33件、すべて査読あり）

① Mizutani E, Torikai K, Wakayama S, Nagatomo H, Ohinata Y, Kishigami S, Wakayama T. Generation of cloned mice and nuclear transfer embryonic stem cell lines from urine-derived cells. *Sci Rep*. 2016;6:23808. DOI: 10.1038/srep23808

② Ishiuchi T, Enriquez-Gasca R, Mizutani E, Bošković A, Ziegler-Birling C, Rodriguez-Terrones D, Wakayama T, Vaquerizas JM, Torres-Padilla ME. Early embryonic-like cells are induced by downregulating replication-dependent chromatin assembly. *Nature Struct Mol Biol*. 2015 Sep;22(9):662-671. DOI: 10.1038/nsmb.3066.

③ Terashita Y, Yamagata K, Tokoro M, Itoi F, Wakayama S, Li C, Sato E, Tanemura K, Wakayama T. Latrunculin A treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos *PLoS One*. 2013 Oct 24;8(10):e78380. DOI: 10.1371/journal.pone.0078380.

④ Wakayama S, Kohda T, Obokata H, Tokoro M, Li C, Terashita Y, Mizutani E, Nguyen VT, Kishigami S, Ishino F, Wakayama T

Successful Serial Recloning in the Mouse over Multiple Generations. *Cell Stem Cell* 2013 Mar 7;12(3):293-7. (Cover article of issue)
DOI: 10.1016/j.stem.2013.01.005.

- ⑤ Terashita Y, Wakayama S, Yamagata K, Li C, Sato E, Wakayama T. Latrunculin A Can Improve the Birth Rate of Cloned Mice and Simplify the Nuclear Transfer Protocol by Gently Inhibiting Actin Polymerization. *Biol Reprod.* 2012 Jun 14;86(6):180 1-6
DOI: 10.1095/biolreprod.111.098764
- ⑥ Yamagata K, Iwamoto D, Terashita Y, Li C, Wakayama S, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Saeki K, Wakayama T. Fluorescence cell imaging and manipulation using conventional halogen lamp microscopy. *PLoS One.* 2012;7(2):e31638
DOI:10.1371/journal.pone.0031638
- ⑦ Mizutani E, Yamagata K, Ono T, Akagi S, Geshi M, Wakayama T. Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. *Dev Biol.* 2012 Apr 1;364(1):56-65
DOI:10.1016/j.ydbio.2012.01.001
- ⑧ Terashita Y, Li C, Yamagata K, Sato E, Wakayama T. Effect of Fluorescent Mercury Light Irradiation on In Vitro and In Vivo Development of Mouse Oocytes after Parthenogenetic Activation or Sperm Microinjection. *J Reprod Dev.* 2011 57: 564-571 (Cover article of issue).
DOI:10.1262/jrd.11-015H

[学会発表] (計 海外 8 件、国内 21 件)

- ① 若山照彦 無限クローンの可能性～絶滅動物の復活と無限クローニング～ 第 8 回日本エピジェネティクス研究会 2014 年 5 月 26 日 東京大学 (東京都・文京区)
- ② Wakayama T (2013) Genomic reprogramming error do not accumulate with serial re-cloning in the mouse. The 10th Annual Meeting of Asian Reproductive Biotechnology Society. August 20-23, 2013 August, Sea-Links Beach Resort, Mui Net, (Viet Nam)
- ③ Wakayama T (2013) Genomic reprogramming in mouse oocyte, Unlimited clone. Germinal Stem Cell Biology, Gordon Research Conference July 14-19, 2013 The Chinese University of Hong Kong. Hong Kong, (China)
- ④ 若山照彦 よみがえれ マンモス! ク

ローン最先端 エンジン 0 1 文化戦略会議 2013 年 11 月 30 日 山梨学院大学 (山梨県甲府市)

- ⑤ 若山照彦 マンモスは再生するか? 第 2 7 回日本生殖免疫学会総会 2012/12/8 大阪医科大学 (大阪府高槻市)

[図書] (計 10 件)

- ① Mizutani E, Wakayama S, Wakayama T. Treatment of donor cell/embryo with different approaches to improve development after nuclear transfer. *Methods Mol Biol.* 2015;1222:101-111.
DOI:10.1007/978-1-4939-1594-1_8
- ② 若山照彦 核移植 「哺乳動物の発生工学」佐藤英明・河野友宏・内藤邦彦・小倉淳郎 編著 朝倉書店 pp156-165 A5 / 212 ページ / 2014 年 04 月 10 日 ISBN978-4-254-45029-3 C3061
- ③ Kishigami S., Nguyen NV., Wakayama S. and Wakayama T. Enhancing SCNT with Chromatin Remodeling Agents. In “Principles of Cloning Second edition”. (Ed. Cibelli J. Gurdon J. Wilmut I. Jaenisch R. Lanza R. West MD. Campbell KHS), Academic press, San Diego, USA, 2013, p137-p148. ISBN: 978-0-12-386541-0
- ④ 若山照彦 その他の生殖工学・遺伝子工学 「繁殖生物学」日本繁殖生物学学会編 インターズー(東京) pp290-301. 2013 年 9 月 11 日。
ISBN-13: 978-4899957881
- ⑤ 若山清香、若山照彦 体細胞核移植クローン 「卵子学」(森崇英総編集) 京都大学学術出版会 pp63-66 2011 年 9 月 10 日 ISBN: 9784876989249
- [その他]
ホームページ等
- ① International Symposium on the Future of Nuclear Transfer and Nuclear Reprogramming を開催し、ノーベル医学生理学賞を受賞したジョン・ガードン博士に講演していただいた。2016 年 3 月 10 日 山梨大学
<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/NTHP/top%20page.html>
- ② 発生工学研究センターのホームページ
<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/index.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
若山 照彦 (WAKAYAMA Teruhiko)

山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：40360672

(2) 研究分担者

水谷 英二 (MIZUTANI Eiji)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：80443034

(3) 連携研究者

なし