

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580390

研究課題名(和文) マウス体細胞核移植胚の新規発生促進技術の開発とその促進機構の解明

研究課題名(英文) Improved technology of mouse somatic cell nuclear transfer that greatly increases cloning efficiency

研究代表者

山田 雅保 (Yamada, Masayasu)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10243073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マウス体細胞核移植(SCNT)胚の産仔への発生は、そのエピジェネティクス調節の異常やX染色体の不活化(XCI)異常などの多くの異常によって著しく抑制されている。本研究では、そのような問題を解決する方法として、1) SCNT胚を1 mM パルプロ酸で4細胞期から24時間処理する方法、2) SCNT直後にd-BSAを注入する方法、そして3) SCNT直後からのトリコスタチンA(TSA)とビタミンCの併用処理する方法を開発し、特にTSAとVCの併用処理は、非常に簡便かつ高効率にクローン産仔が得られる前例のない方法である。

研究成果の概要(英文)：Production rate of cloned mice still is very low, which is thought to be attributed to abnormal epigenetic modifications and X-chromosomal inactivation (XCI) status in somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. Here, we developed novel mouse SCNT technologies as follows; 1) treatment with valproic acid for 24 h from the 4-cell stage of SCNT embryos, which improved expression of Oct4 and trimethylated histone H3 lysine 27, a marker of the XCI status in SCNT blastocysts, 2) intracytoplasmic injection of deionized BSA after SCNT, which promoted expression of acetylated histone H3 lysine 9 and acetylated histone H4 lysine 12 at the pronuclear stage and production of cloned offspring, and 3) treatments with tricostatin A for 8 h from the beginning of activation of SCNT oocytes followed by vitamin C for 7 h, which promoted the oxidation of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in pronuclear DNA of SCNT embryos and led to greatly increased production of cloned offspring.

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：体細胞核移植 クローンマウス ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 脱イオン化BSA ビタミンC エピジェネティクス X染色体不活化異常

1. 研究開始当初の背景

体細胞核移植(SCNT)によるクローン動物の作出は、優良家畜の生産及び育種改良の促進、希少動物の保全、再生医療など様々な分野への応用が期待される有用な技術である。しかし、長年に渡る研究にも関わらずその産仔への発生率(クローン効率)の低さが克服されずにいる。近年、ブタの体細胞クローン効率、体細胞の多能性獲得を促進するビタミンC(VC)によって促進されることが報告され、また、マウスの体細胞クローンに関する研究では、Class IIbに属するヒストンの脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)であるトリコスタチンA(TSA)などによりSCNT胚で生じるエピジェネティクス異常が改善されることでクローン効率が増加することが示されたが、いずれにおいてもその効率は10%以下と依然低い値であった。ところが、X染色体不活化(XCI)異常が、SCNT胚の大きな欠陥の一つであることが明らかとなり、その不活化に関わるノンコーディングRNAである*Xist* 遺伝子のノックアウト、もしくはRNAiによるノックダウンによる不活化異常の抑制によって、クローン効率が最高で20%(平均14%)へと劇的に改善されることが報告された。しかし、RNAiによるノックダウンは、雄にしか用いることができないなどの問題があることから、より簡便な雌雄を問わずに利用できる体細胞クローンの作出法の開発が今後必要と考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、SCNT胚の発生を制御するエピジェネティクス調節異常やXCI異常の改善およびSCNT胚の作出過程で生じる胚の損傷の軽減という2つの観点から、クローンマウス作出効率の向上に繋がる新たな方法の開発を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) B6D2F1 (C57BL/6J X DBA/2)系雌マウス(7-10週齢)を日本エスエルシーから購入し、卵母細胞およびドナー体細胞(卵丘細胞)の調製に使用した。すべての実験は、京都大学動物実験委員会の定める「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に基づいて適正な動物実験を行った。

(2) SCNT胚の作製: 過剰排卵処置マウスの卵管から採取したMII期卵母細胞を5 µg/ml サイトカラシン B (CB, Sigma-Aldrich) 添加 CZB-Hepes 培地で処理した後、ピエゾドライブを装着したマイクロマニピュレーター

(Prime Tech, Tokyo)を用いてMII期紡錘体を除去し、除核卵を調整した。次いで、同様のマイクロマニピュレーターを用いて卵丘細胞核(ドナー体細胞核)を除核卵内に顕微注入するか、あるいはHVJ-E (GenomeONE-CF, Ishihara Sangyo, Osaka) による融合法によって再構築卵(SCNT卵)を作製した。SCNT卵を5 mM 塩化ストロンチウム (Wako Pure Chemical Industries, Osaka)、2 mM EGTA (Sigma-Aldrich)そして5 µg/ml CBを添加したmKSOM 培地(活性化培地)中で6時間培養することで単為発生的に活性化し、SCNT胚を作製した。

(3) 免疫蛍光染色法: 前核期あるいは胚盤胞期の胚を3.7% パラホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich)で固定した後、0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)を含むPBSで細胞膜透過処理し、0.02% Tween-20 (Sigma-Aldrich)、1.5% BSA、0.2% アジ化ナトリウム (Sigma-Aldrich) を含むPBS(ブロッキング液)でブロッキング処理した。次いで、1次抗体を含むブロッキング液で胚を4で一晩処理した。1次抗体として、抗OCT3/4抗体(1:100; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)、抗CDX2抗体(1:100; BioGenex, San Ramon, CA)、抗トリメチル化ヒストンH3リジン27 (H3K27me3)抗体(1:100; Millipore, Ann Arbor, MI)、抗アセチル化ヒストンH3リジン9(AcH3K9)抗体(1:100; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、抗アセチル化ヒストンH4リジン12(AcH4K12)抗体(1:100; Upstate Biotechnology)、抗5メチル化シトシン(5mC)抗体(Active Motif #39649; 1:2000)そして抗5ヒドロキシメチル化シトシン(5hmC)抗体(Active Motif #39769; 1:2000)を用いた。ブロッキング液で洗浄後、2次抗体としてAlexa Fluor 488 標識抗ウサギIgG(1:500, Molecular Probes, Eugene, OR)もしくはAlexa Fluor 594 標識抗マウスIgG(1:500, Molecular Probes)を含むブロッキング液で処理した。細胞数を計測する場合には、胚を10 mg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)で処理した。最後に、50% グリセロールを含むPBSで胚をマウントした後、蛍光顕微鏡(FSX100, Olympus, Tokyo)あるいは共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, Inc., Germany)によって観察し、蛍光画像を、同じコントラスト、輝度、露光条件下で撮影した。AcH3K9、AcH4K12、5mCそして5hmCの蛍光シグナル強度は既報に従って、ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009)を用いて半定量的に測定した。

(4) 胚移植: 2細胞期まで発生した SCNT 胚を、あらかじめ ICR 系精管結紮雄マウスとの交配で作製した偽妊娠同系雌マウス(交配後 0.5 日)の卵管に移植した。そして、交配後 19.5 日に帝王切開により子宮を切開し、産仔および着床痕の有無を観察した。移植胚あたりの着床痕および産仔の割合を求めることで、着床率および産仔率を求めた。また、得られた産仔および胎盤の重さを計測した。

4. 研究成果

(1) バルプロ酸 (VPA) 処理の効果

SCNT 胚の胚盤胞期への発生および胚盤胞期での OCT4 の発現に及ぼす異なる発生時期からの VPA 処理の影響を検討した。SCNT 胚を活性化直後(VPA-1C)、活性化開始 24 時間後(VPA-2C)あるいは 48 時間後(VPA-4C)のそれぞれの時期から 24 時間 1 mM VPA で処理した。胚盤胞期への発生率はいずれの処理区においても 33%~37%であり、無処理対照区 (NTC 区、36%) と変わらなかった。胚盤胞の ICM マーカーである OCT4 の発現を免疫蛍光染色によって観察し、OCT4 の蛍光シグナル強度の強弱および OCT4 陽性細胞数によって分類した。OCT4 の蛍光シグナル強度が強く、OCT4 陽性細胞数が 10 以上の胚盤胞の割合は、NTC 区ではそれぞれ 34.3%、34.7%と低値であったが、いずれの VPA 処理区でも OCT4 の蛍光シグナル強度の強い胚盤胞の割合と OCT4 陽性細胞数が 10 以上の胚盤胞の割合は NTC 区と比べて高く、VPA-4C 区(それぞれ 82.25 と 76.7%)で最も高い値を示した。以上の結果から、1 mM の VPA で 4 細胞期から 24 時間 SCNT 胚を処理することによって、胚盤胞への発生には影響はないが、胚盤胞における OCT4 の発現が促進されることが明らかとなった。次に、SCNT 胚盤胞における XCI の状態が VPA 処理によって改善されるのかについて検討した。XCI の状態が H3K27me3 の核内での局在から評価されることから、本実験では、VPA-4C 区と NTC 区での SCNT 胚盤胞における H3K27me3 の核内での局在を免疫蛍光染色によって調べた。NTC 区の胚盤胞では、1 個の胚盤胞あたり平均 12.4%の割球において 1 つのシグナル focus が観察され、残りの割球では、シグナルは観察されないか、もしくは 2 個以上のシグナル focus が観察された。一方、VPA-4C 区の胚盤胞では、1 つのシグナル focus が観察される割球の割合が 36.6%と NTC 区と比較して有意に増加した。卵丘細胞をドナー核とした SCNT 胚盤胞の性は雌であることから、H3K27me3 のシグナル focus が 1 個観察される割球が正常な XCI の状態にあると判定される。従って、4 細胞期から 24 時間 1 mM VPA で SCNT 胚を処理す

ることによって、SCNT 胚盤胞での XCI 状態が部分的に改善されることが示唆された。

(2) 脱イオン化 BSA 注入の効果

ドナー細胞核注入用の培養液として、ポリビニールピロリドン (PVP) 含有 CZB-Hepes 培地が一般的に用いられている。しかし、PVP が細胞内で分解される機構は知られていないことから、SCNT 胚に対する細胞毒性が懸念される。そこで、生体内物質であり PVP と同様の効果を持つことが期待される BSA、特にイオン交換樹脂で脱イオン化処理した BSA (d-BSA) を PVP の代替としてドナー細胞核注入用の培養液に用いたところ、PVP の場合(23.5%)と比較し、SCNT 胚の胚盤胞形成率が有意に増加した(43.1%)。このことから、PVP の代替として d-BSA を用いることができるばかりでなく、それは SCNT 胚の胚盤胞への発生を促進することが示された。そこで、HVJ-E を用いた細胞融合法によって卵丘細胞を導入した SCNT 卵を作製し、その細胞質に一定量(10 μ l)の 0%(注入対照区)あるいは 6% d-BSA 溶液を顕微注入し、活性化処理後、SCNT 胚を mKSOM 培地中で 96 時間培養した。6%の d-BSA を顕微注入したところ、胚盤胞形成率は注入対照区(0% d-BSA、32.4%)に比べて有意に増加した(65.1%)。d-BSA の顕微注入がクローン産仔の作出効率に及ぼす影響を明らかにするために、2 細胞期へ発生した SCNT 胚を、偽妊娠雌マウスの卵管に移植し、移植後 18 日目の着床痕数および産仔数を調べた。注入対照区では、130 個の 2 細胞期胚を移植したところ、1 個の着床痕が認められたが産仔は得られず、着床率および産仔率はそれぞれ 0.7%および 0%であった。既報と同様に、この割合は注入対照区胚を TSA 処理することによって大幅に改善され、138 個の 2 細胞期胚を移植したところ、36 個の着床痕と 4 匹の生存産仔が得られ、その着床率および産仔率はそれぞれ 26.1%および 2.9%であった。一方、110 個の d-BSA 注入 SCNT 2 細胞期胚を移植したところ、28 個の着床痕と 3 匹の生存産仔が得られ、その着床率および産仔率はそれぞれ 25.4%および 2.7%と、TSA 処理区と同程度であった。以上の結果から、d-BSA の SCNT 卵への顕微注入によって、TSA 処理と同程度にまで着床率およびクローン産仔の作出効率が改善されることが示された。マウス SCNT 胚の前核期(活性化開始後 10 h)での AcH3K9 および AcH4K12 レベルが TSA 処理によって顕微授精卵と同程度にまで上昇することが明らかになっている。そこで、SCNT 卵の細胞質に 6% d-BSA を顕微注入することによって、前核期(活性化開始後 10 h)SCNT 胚における AcH3K9 および AcH4K12 の発現レベルについて免疫蛍光染

色によって検討した。d-BSA 注入によって、注入対照区と比較して AcH3K9 および AcH4K12 の蛍光シグナル強度が有意に増加した。以上の結果から、d-BSA の注入による SCNT 胚の発生促進効果は、前核期におけるヒストン H3K9 および H4K12 のアセチル化の促進を介したエピジェネティクス調節によって発揮されることが示唆された。

(3) ビタミン C (VC) 処理の効果

最近、VC が TET 酵素による DNA のメチル化シトシン (5mC) のヒドロキシ化によって体細胞のリプログラミングを促進すること、そしてブタ体細胞クローン効率の改善にも有効であることが報告された。そこで、マウス SCNT 胚の発生に及ぼす VC の効果について検討した。マウス SCNT 卵を VC (10、25、50 μ g/ml) で活性化開始後 24 時間処理した結果、その胚盤胞形成率はいずれの濃度においても約 70%と、無処理対照区 (37%) と比較し有意に増加した。SCNT 胚盤胞の細胞数を比較したところ、総細胞数及び ICM 細胞数はいずれの濃度の VC 処理でも対照区より有意に増加し、10 μ g/ml では TE 細胞数についても有意に増加した。VC の処理時期について検討した結果、活性化開始 0-24 時あるいは 8-15 時の処理では対照区 (36%) と比較し、胚盤胞形成率が有意に上昇した (69%, 71%) が、0-8 時の処理では 52%と有意差はなかった。活性化開始 10 時間後の前核期 SCNT 胚における DNA メチル化状態については、活性化開始 8-15 時の VC 処理または 0-8 時の TSA 処理を行った場合に、対照区と比べて 5mC が高度にヒドロキシメチル化しており、また、VC (8-15 時) と TSA (0-8 時) を併用処理することでヒドロキシメチル化がさらに促進された。このことから、VC と TSA は、それぞれ異なるメカニズムによって初期胚の DNA のヒドロキシメチル化を促進することが初めて示唆され、DNA の脱メチル化による遺伝子発現の調節を介して、VC 及び TSA は胚発生を促進している可能性が示唆された。最後に、SCNT 胚の VC と TSA の単独または併用処理による産仔率への影響を検討した。産仔は、対照区胚からは得られなかったのに対し、VC 処理 (0-24 時) 胚から 1.8%、TSA 処理胚から 2.5%の割合で得られた。さらに、VC と TSA を併用することで 18%と、極めて高い割合で産仔が得られることが明らかとなった。

SCNT 胚において生じる XCI 異常を抑制する *Xist* のノックアウト、または RNAi によるノックダウン法によって高いクローン効率を得られるが、ノックダウン法は雄の SCNT にのみ適用できることから、実用的に大きな問題がある。従って、本実験で示された VC と TSA の併用処理は、これまでの SCNT 法の中で

も最も高いクローン効率を得られる実用的な手法といえる。

以上のことから、本研究成果は SCNT による全能性獲得機構の解明などの基礎研究のみならず、動物生産などの実用上の両面で極めて意義深いものである。

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4件)

1. Isaji Y, Murata M, Takaguchi N, Mukai T, Tajima Y, Imai H, Yamada M. Valproic acid treatment from the 4-cell stage improves Oct4 expression and nuclear distribution of histone H3K27me3 in mouse cloned blastocysts. *J. Reprod. Dev.*, 59(2):196-204 2013
2. 伊佐治優希、村田萌子、田島陽介、今井裕、山田雅保、ノコダゾール処理除核卵母細胞由来マウス体細胞核移植胚の発生に及ぼすスクリプタイトの効果、*日本胚移植学雑誌*, 34: 117-127 2012
3. Tsukiyama T, Asano R, Kawaguchi T, Kim N, Yamada M, Minami N, Ohinata Y, Imai H. Simple and efficient method for generation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible factors and an EOS reporter system. *Genes Cells*, 16(7): 815-825 2011
4. Miyamoto K, Nagai K, Kitamura N, Nishikawa T, Ikegami H, Binh NT, Tsukamoto S, Matsumoto M, Tsukiyama T, Minami N, Yamada M, Ariga H, Miyake M, Kawarasaki T, Matsumoto K, Imai H. Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(17): 7040-7045 2011

[学会発表](計7件)

1. 田島陽介、伊佐治優希、後藤奈々、今井裕、山田雅保、マウス体細胞クローン胚の発生に及ぼすビタミン C の効果、第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013 年 9 月 12 日、府中
2. 田島陽介、伊佐治優希、今井裕、山田雅保、マウス体細胞核移植胚の着床前発生に及ぼすビタミン C の効果、第 105 回日本繁殖生物学会大会、2012 年 9 月 8 日、つくば

3. 伊佐治優希、田島陽介、今井裕、山田雅保、脱イオン化ウシ血清アルブミンのマウス体細胞核移植胚への注入はその胚盤胞への発生およびヒストンアセチル化を促進する、第 105 回日本繁殖生物学会大会、2012 年 9 月 8 日、つくば

4. 伊佐治優希、西川智章、今井裕、山田雅保、脱イオン化ウシ血清アルブミンのマウス体細胞核移植胚への注入はその胚盤胞への発生を促進する、日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月 28 日、名古屋

5. 伊佐治優希、村田萌子、高口尚也、今井裕、山田雅保、活性化後のバルブプロ酸処理がマウス体細胞核移植胚の胚盤胞への発生および Oct4 の発現に及ぼす影響、第 104 回日本繁殖生物学会大会、2011 年 9 月 15 日、盛岡

6. 村田萌子、伊佐治優希、田島陽介、今井裕、山田雅保、マウス体細胞核移植における化学的処理による除核方法の簡便化についての検討、第 61 回関西畜産学会大会、2011 年 9 月 13 日、岡山

7. 村田萌子、伊佐治優希、田島陽介、今井裕、山田雅保、マウス体細胞核移植における化学的処理による除核条件の検討、第 18 回日本胚移植研究会大会、2011 年 9 月 8 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.reprod.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 雅保 (Yamada Masayasu)

京都大学・農学研究科応用生物科学専攻生殖生物学分野・准教授

研究者番号：10243073

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし