

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592466

研究課題名(和文)凍結保存した除核IVM卵を用いた体細胞核移植胚由来ES細胞の作出

研究課題名(英文)Creation of ES cell established from somatic cell nuclear transfer with frozen in-vitro maturation oocyte which enucleated

研究代表者

深澤 宏子(FUKASAWA, Hiroko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：60362068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：将来的に卵子バンクでは、未成熟卵子を体外成熟培養し、その核を除核し凍結保存を行い体細胞核移植に供することを想定している。まず、体外成熟培養卵を用いて体細胞核移植胚由来のES細胞(ntES)を作出したがその発生率は悪かった。また、凍結保存した卵からntES細胞は作出できるものの、こちらも発生率は悪く、その改善法を検討したが発生率の目覚ましい改善は困難であった。体外成熟培養や凍結の影響は未だに不明であり、その検討目的で、採卵後1日経過した1-day-old卵を用いて発生率の低下が何に起因するものかの解析を行った。その結果、発生率の悪さは紡錘体よりも細胞質に原因があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Immature oocytes retrieved from the ovaries can be matured in vitro (IVM). If the IVM MII oocytes are enucleated and cryopreserved in liquid nitrogen, they can be used as a source of the SCNT as well as be used to establish the ntES cells. Developmental rate of the cloned embryo generated with IVM oocytes was significantly lower than that of the cloned embryo generated with fresh oocytes. In aged oocyte, low developmental rate was reported to be associated with mitochondrial abnormal distribution. Thus using the metaphase II spindle injection (MESI) method, we investigate the relationship between the spindle and mitochondrial distribution in the murine MII oocyte. The MII spindle might be a determination factor of the mitochondrial distribution in the fresh MII ooplasm, but mitochondria were no longer redistributed in the 1-d-o ooplasm, implying that the redistribution potential of mitochondria might be related to the function of the MII oocyte.

研究分野：産婦人科腫瘍学

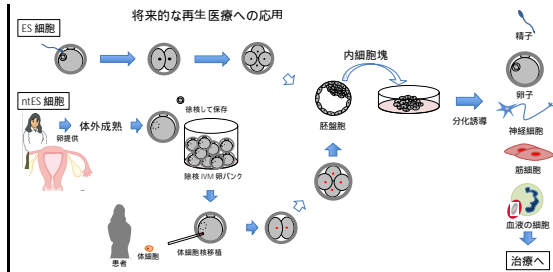
キーワード：体細胞核移植 未成熟卵 体外成熟培養 ミトコンドリア 再生医療

1. 研究開始当初の背景

様々な難治性疾患の新たな治療法として「再生医療」が世界的に注目され、技術開発が進んでいる。胚性幹細胞(embryonic stem cell; ES 細胞)や誘導多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS 細胞)など、治療に使用する細胞ソースの開発が再生医療への期待をさらに高いものとしている。しかしながら、ES 細胞の作成には発生途中の胚の破壊が不可避である点、良性奇形腫の発生の可能性がある点、ならびに、すでに樹立されている ES 細胞から得られる組織は患者本人の細胞ではないため免疫拒絶の問題が生じる点が臨床応用に向けた課題となっている。一方 iPS 細胞は、培養細胞に特定の遺伝子を導入して得られる多分化能を持つ細胞として開発され、ES 細胞での最大の障壁であった倫理的問題や患者自身の体細胞への遺伝子導入で患者自身の iPS 細胞が得られるため、免疫学的問題も回避可能である。しかし iPS 細胞はその誘導のために外来遺伝子を導入しなければならず、その遺伝子のゲノムへの組み込みの問題と、悪性腫瘍発生の可能性が臨床応用に向けた課題となっている。我々は将来、無精子症や早発閉経などの配偶子が採取不可能な不妊症患者に対する治療として、患者の体細胞から精子ならびに卵子を誘導することを展望している。この目的において、現状では外来遺伝子のゲノムへの取り込みの観点から、iPS 細胞を用いることができない。そこで、iPS 細胞と同様に、患者本人の細胞を用いて再生医療を行うことを可能にする方法として、体細胞核移植(somatic cell-nuclear transfer; SCNT)技術を用いる方法を検討している。SCNT 技術を用いて作出したこの ntES 細胞は受精卵由来の ES 細胞と同様の多分化能を有していることから、将来的には、患者自身の体細胞を用いて ntES 細胞を樹立し、そこから失われた組織や臓器を再生することで免疫拒絶のない再生医療への応用が期待される。

2. 研究の目的

ヒト ntES 細胞を樹立しようとするときに最大の障壁となるのは、ヒト ntES 細胞の樹立のために必要な未受精卵の確保である。現状では、実験動物における体細胞核移植胚の発生率は受精卵に比して極めて低く、したがって ntES 細胞の樹立率もかなり低いため、ヒトにおいても多数の未受精卵を準備する必要がある。これは倫理的に問題である上に、ヒトから未受精卵を採卵する際に排卵誘発を行えば、女性に対して多大な肉体的・精神的苦痛を与えることとなるため、核移植のためだけに多量に採卵をすることは許されない。また、核移植時にその必要に応じて採卵を行うことは不可能である。したがって健康女性からの提供や不妊治療における余剰卵の提供では、将来の研究ならびに臨



床応用に必要な数の卵子を必要時に準備することは事実上不可能である。そこで、研究代表者らは、手術時に摘出せざるを得なかった卵巣より未熟な卵子を単離し、体外にて成熟 (*in vitro* maturation; IVM) させて、除核ののち凍結・保存し、必要時に必要な数の卵子を準備するシステム (除核 IVM 卵バンク) の開発を着想した。この方法によれば、除核してから凍結・保存することで、自分の遺伝情報 (未受精卵) が将来的に無断で使用される不安など、ドナーの心理的負担をも軽減できると考える。

3. 研究の方法

(1) 体外成熟培養 (IVM) 卵を用いた体細胞核移植胚由来 ES 細胞の作出の試み

ヒトでは排卵誘発を行わないことを想定し、排卵誘発を行っていないマウスの卵巣より卵細胞期 (GV 期) 卵と卵丘細胞の複合体の状態で実体顕微鏡下に単離し、体外成熟培養に供した。卵丘細胞の増殖を促進する羊膜成分抽出物をコーティングしたディッシュを用い、組織培養液内で 17 時間体外成熟培養を行って、第二減数分裂中期 (MII 期) まで成熟させたのち、ヒアルロニダーゼ処理して卵丘細胞を除去し、成熟卵を選別した。さらに、マイクロマニピュレータを用いて、得られた MII 卵の除核を行い、体細胞核 (卵丘細胞核) を移植して、得られた再構築胚を 5 日間程度培養し、胚盤胞への発生率を検討した。

(2) 除核未受精卵の凍結保存に関する検討

BDF1 マウスに過排卵処理を行って未受精卵を採卵し、除核して卵丘細胞を核移植するコントロール (Cont) 群と、まず除核した後、凍結融解してから核移植する (E-F) 群に分け、核移植後の初期発生率を比較検討した。

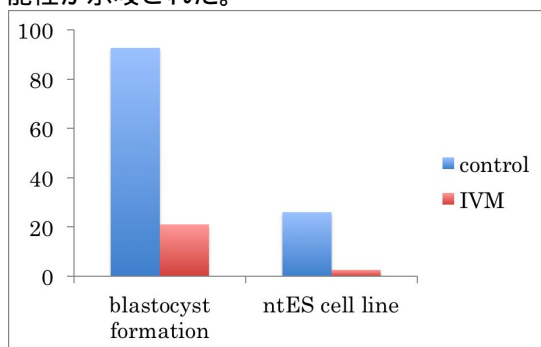
(3) 採卵した MII 卵、採卵後 1 日経過した卵を 1-day-old 卵、採卵した MII 卵を vitrification 法を用いて凍結した凍結未受精卵において、マイクロマニピュレータを用いて紡錘体の置換を行い (MII 卵紡錘体移植法) その後の発生率を比較検討した。

(4) 採卵した MII 卵、採卵後 1 日経過した卵を 1-day-old 卵とし、それぞれのミトコンドリアを蛍光色素 (Mitotracker Green FM, Molecular Probe) にて染色して経時的に観察した。染色した MII 卵から除核用ガラスピペットを用いて核体 (紡錘体と周囲の細胞質) と細胞質体都に分離し、得られた核体をマイクロインジェクション用ガラスピペットで細胞質体にインジェクションして

再構築卵を得て同様に観察した。

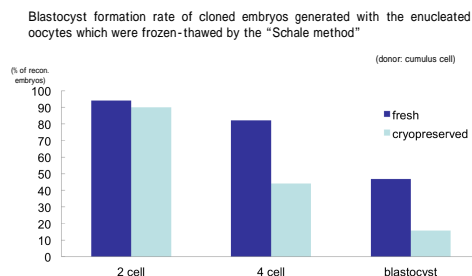
4. 研究成果

(1) 体外成熟卵を用いて、体細胞核移植を行った。発生率は低いものの、胚盤胞まで到達することが明らかとなった。また、キメラマウスの作出が可能であった。さらに、一部のキメラマウスではこの細胞の生殖系列への移行も確認できた。このことから、未熟卵を体外成熟させて得られた体外成熟卵の細胞質が、再生医療の細胞ソースとなりえる可能性が示唆された。



しかし、この体外成熟培養において、卵丘細胞の増殖を促進する羊膜成分抽出物をコーティングしたディッシュを用いたり、培養液の組成を改良してより多くの成熟卵を得る条件を検討したが、培養液や成熟環境以上に、もとの未熟卵の状態が大きく影響することが明らかとなり、未熟卵の状態が一定しないと培養液などの条件を検討することができないことが明らかとなった。今後、いかに効率的に一定した状態の未熟卵を採卵するかの検討が必要と考える。

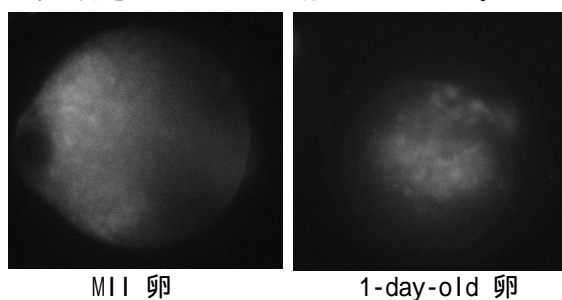
(2) 凍結未受精卵から同様に ntES 細胞も樹立可能であるが、発生率は同様に低かった。凍結融解の方法を検討して、発生率の改善を試みたが、顕著な改善は得られず、発生率の改善には発生率が低下する根本的な原因を追及しそこから改善の方法を導き出すことが必要と考えられた。



(3) 上記の結果から、新鮮未受精卵を使用した場合と比べて、発生率が低い原因を追及し、そこから改善策を検討することが必要と判断した。実臨床において、加齢卵の発生率が悪いことは周知の事実である。もちろん、加齢卵では、遺伝子異常が存在することも多いが、それ以外の要因は明らかではない。そのモデルとして採卵後 1 日経過した卵を用

いた。この採卵後 1 日経過した卵を 1-day-old 卵として、MII 卵紡錘体移植法 (MESI) を用いて、発生率の比較検討を行った。その結果、1-day-old 卵、凍結未受精卵ともにその紡錘体を新鮮未受精卵の細胞質体に移植した場合は胚盤胞まで発生したが、逆に新鮮未受精卵の紡錘体を、1-day-old 卵、凍結未受精卵の細胞質体に移植した場合は、胚盤胞まで発生しなかった。よって、発生率の悪さは紡錘体よりも細胞質に原因があることが明らかとなった。

(4) ミトコンドリア分布の異常な卵細胞由来の胚の初期発生が傷害されることが明らかとなっているため、細胞質内の特にミトコンドリアに着目し、その分布と動態の経時変化を観察したところ、新鮮未受精卵と比較して、1-day-old 卵ではミトコンドリアの分布と動態が悪いことが明らかとなった。



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 5 件)

- 1) 深澤宏子, 岡本遼太, 平田修司: MII 卵紡錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンドリア分布についての検討. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 67 (2): 728, 2015.
- 2) 小川達之, 深澤宏子, 平田修司: Metaphase II spindle injection (MESI) による 1-day-old 卵の発生能改善の試み. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 66 (2): 449, 2014.
- 3) 深澤宏子, 正田朋子, 平田修司: MII 卵紡錘体移植における細胞質持ち込み量の検討. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 66 (2): 858, 2014.
- 4) 深澤宏子, 下地彩乃, 平田修司: 体外成熟卵を用いた作出した体細胞核移植胚由来の ES 様細胞の特性解析. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 65 (2): 519, 2013.
- 5) 深澤宏子, 下地彩乃, 平田修司: 体外成熟卵を用いた ntES 細胞の作出. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 64 (2): 508, 2012.

[学会発表](計 5 件)

- 1) 深澤宏子, 岡本遼太, 平田修司: MII 卵紡錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンドリア分布についての検討. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 2015 年 4 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川・横浜市)

2) 小川達之, 深澤宏子, 平田修司: Metaphase II spindle injection (MESI) による 1-day-old 卵の発生能改善の試み. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014 年 4 月 19 日 東京国際フォーラム(東京・千代田区)

3) 深澤宏子, 正田朋子, 平田修司: MII 卵紡錘体移植における細胞質持ち込み量の検討. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014 年 4 月 20 日 東京国際フォーラム(東京・千代田区)

4) 深澤宏子, 下地彩乃, 平田修司: 体外成熟卵を用いた作出した体細胞核移植胚由来の ES 様細胞の特性解析. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 10 日 札幌プリンスホテル(北海道・札幌市)

5) 深澤宏子, 下地彩乃, 平田修司: 体外成熟卵を用いた ntES 細胞の作出. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 14 日 神戸国際展示場(兵庫・神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 宏子 (FUKASAWA, Hiroko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 60362608

(2) 研究分担者

平田 修司 (HIRATA, Shuji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 00228785