

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450475

研究課題名(和文)世界最小サイズのミニブタであるマイクロミニピッグにおける体細胞核移植技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of somatic cell nuclear transfer techniques in Microminipigs, the smallest pigs in the world

研究代表者

三好 和睦 (MIYOSHI, KAZUCHIKA)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：70363611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：振動を与えながら成熟培養した卵子をレシピエント、胎児線維芽細胞をドナーとして使用することにより、マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生が改善された。また、活性化後のバルプロ酸処理は、マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の胚盤胞形成率を増加させた。そのような体細胞クローン胚から産子を得ることに成功した。さらに、 α -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子ノックアウト細胞に由来する胚の体外発生も、バルプロ酸処理によって改善した。以上の結果から、マイクロミニピッグにおける効率的な体細胞核移植技術が確立された。また、この技術を応用して遺伝子改変マイクロミニピッグを作出し得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The use of oocytes matured with mechanical vibration and fetal fibroblasts as recipients and donors, respectively, enhanced the in vitro development of Microminipig somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. In addition, treatment with valproic acid (VPA) after activation increased the blastocyst formation rate of Microminipig SCNT embryos. These SCNT embryos had the ability to develop into viable piglets. The in vitro development of α -1,3-galactosyltransferase gene knockout cell-derived embryos was also enhanced by VPA treatment. Based on these results, an efficient SCNT protocol for the production of cloned Microminipigs has been established. In addition, it was suggested that this protocol can be used to create genetically modified Microminipigs.

研究分野：発生工学

キーワード：体細胞クローニング 核移植 ミニブタ

1. 研究開始当初の背景

ミニブタは、解剖学的・生理学的にヒトとの類似点が多いことから、医薬品の開発や病気の治療法の確立における実験動物として有用であると考えられている。しかし、これらの分野で有効活用するためには、ミニブタの遺伝子を目的に応じて改変する技術が不可欠となる。現時点で遺伝子改変ミニブタを得る最も現実的な方法は、遺伝子改変した体細胞の核を除核未受精卵に移植してクローン動物を作出することである。

そこで研究代表者らは、鹿児島大学で開発・維持されているクラウン系ミニブタにおいて体細胞核移植技術の確立を試みた。その結果、定期的な振動を与えながら成熟培養した卵子をレシピエントとして用いることにより、クローン胚の体外発生を改善し得ることを見出した。また、クローン胚における体細胞核のリプログラミング状態を非侵襲的に評価する系を開発し、これを用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸が体細胞核のリプログラミングを正常化し得ることを明らかにした。最終的に、これらの知見をもとに、クラウン系ミニブタの体細胞クローンを作出することに成功した。さらに、確立された体細胞核移植技術を応用することにより、ヒト動脈硬化症の疾患モデル動物となり得るヒトアポリポプロテイン (a) 遺伝子導入ミニブタを世界で初めて作出した。

これらの成果は、クラウン系ミニブタの遺伝子を目的に応じて改変し、実験動物として利用し得ることを示している。しかし、クラウン系ミニブタは、比較的小型のミニブタではあるものの成体重は 50~80kg に達する。そのため、飼育管理に広いスペースや多大な労力・コストが必要となり、利用できる施設が限られてしまうという欠点があった。

2. 研究の目的

近年、富士マイクラ社によって、成体重が 10kg 以下の世界最小サイズのミニブタ (商標: マイクロミニピッグ) が開発された。このサイズであれば、マウスやラット用の飼育室で飼うことも可能である。連携研究者らはマイクロミニピッグの実験動物としての可能性に注目し、鹿児島大学が長年培ってきた国内屈指の畜産 (養豚) 技術をもとに、マイクロミニピッグに最適な飼育管理法を確立した。このような背景から、もしマイクロミニピッグにおける体細胞核移植技術を確立することに成功すれば、遺伝子改変した個体を作出できるようになることから、実験動物としてのマイクロミニピッグの利用範囲は大きく広がると予想される。

そこで本研究では、これまでにクラウン系ミニブタを用いて得られた知見を応用することにより、マイクロミニピッグにおける効率的な体細胞核移植技術の確立を試みた。

3. 研究の方法

食肉センター由来のブタ卵巢から卵丘卵子複合体を吸引採取し、40~41 時間成熟培養した。成熟培養後、ヒアルロニダーゼにより卵丘細胞を除去し、第 1 極体が確認できた卵子のみを選抜した。卵子を除核後、卵胞腔内にドナー細胞を挿入し、電気刺激による融合処理を行った。1~1.5 時間後に、レシピエント卵子とドナー細胞の融合状況を確認した。融合処理 2 時間後に、ソルビトール液を満たしたチャンバー内の電極間に融合胚を並べ、直流パルスを印加することにより活性化処理を行った。活性化処理後のクローン胚を各処理区の培地中に移して培養した。いずれの区においても、最初の 2 時間は 2.2 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシン B を添加することにより、第 2 極体様構造物の放出を抑制した。培養 2 日後に卵割状況、7 日後に胚盤胞形成状況を観察した。

(実験 1) レシピエント卵子の成熟培養中における振動の有無が、マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響について検討した。一部の卵丘卵子複合体を振動 (X 軸方向に $\pm 0.33\text{G}$ 、Y 軸方向に $\pm 0.11\text{G}$ の加速度および 20Hz の周波数、60 分毎に 10 秒間) を与えながら成熟培養し、それらを用いて作出したクローン胚の発生を静置下で培養した場合と比較した。なお、ドナーとしてマイクロミニピッグ胎児 (個体番号) に由来する細胞 (胎児線維芽細胞 1) を用い、活性化処理後のクローン胚を修正 porcine zygote medium-3 (mPZM-3) 中に移して培養した。

(実験 2) バルプロ酸がマイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響について検討した。活性化処理後のクローン胚を 0 および 8mM のバルプロ酸を添加した mPZM-3 中で 24 時間培養後、バルプロ酸無添加の同培地中へ移して培養を継続した。なお、レシピエントとして振動を与えながら成熟培養した卵子、ドナーとして胎児線維芽細胞 1 を用いた。

(実験 3) ドナー細胞の種類がマイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響について検討した。ドナーとして、マイクロミニピッグ成体 (個体番号 および) の腎臓に由来する細胞、マイクロミニピッグ新生児 (個体番号 、 、 および) の耳介に由来する細胞およびマイクロミニピッグ胎児 (個体番号 、 、 および) に由来する細胞を用いた。なお、レシピエントとして振動を与えながら成熟培養した卵子を用いた。また、活性化処理後のクローン胚を 8mM のバルプロ酸を添加した mPZM-3 中で 24 時間培養後、バルプロ酸無添加の同培地中へ移して培養を継続した。

(実験 4) マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体内発生について検討するために、活性化処理後のクローン胚を 8mM のバルプロ酸を添加した mPZM-3 で 24 時間培養後、発情を同期化したマイクロミニピッグ仮親の卵管に移植した。一部のクローン胚は、サイトカラシン B による処理を行った後、バルプロ酸処理を行わずに移植した。移植後、定期的に超音波画像診断を行うことにより妊娠状況を確認し、妊娠の継続が認められた仮親に対しては移植 113 日後に帝王切開を実施した。なお、レシピエントとして振動を与えながら成熟培養した卵子、ドナーとしてマイクロミニピッグ胎児(個体番号、および)に由来する細胞(胎児線維芽細胞 1、3 および 4)を用いた。

(実験 5) 異種移植抗原 -Gal エピトープを合成する酵素である -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ(-GalT) 遺伝子をノックアウトしたマイクロミニピッグ体細胞に由来するクローン胚を作製し、それらの体外発生に及ぼすバルプロ酸の影響について検討した。ドナーとして胎児線維芽細胞 4 を用い、CRISPR/Cas9 系の DNA を導入することによってノックアウトを行った。これらの遺伝子改変細胞および振動を与えながら成熟培養したレシピエント卵子からクローン胚を作製し、0 および 8mM のバルプロ酸を添加した mPZM-3 中で 24 時間培養した。その後、バルプロ酸無添加の同培地中に移して培養を継続した。得られた胚盤胞の一部を 4% のパラホルムアルデヒドで固定後、-Gal エピトープに特異的に結合する赤色蛍光標識植物性レクチン(AF594-IB4)で染色することにより、-GalT 遺伝子のノックアウト状況を確認した。

4. 研究成果

(実験 1) 振動の有無は、成熟率(73.7~74.1%)、融合率(67.0~69.0%)、卵割率(62.2~62.5%) および胚盤胞細胞数(41.3~43.3 個)に影響を及ぼさなかった。しかし、胚盤胞形成率は静置下で培養した区(9.5%)と比較して振動を与えながら培養した区(17.0%)で有意に高くなった($P < 0.05$)。以上の結果から、レシピエント卵子の成熟培養中における振動は、マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生を改善し得ることが示された。

(実験 2) バルプロ酸処理の有無は、卵割率(69.9~73.0%) および胚盤胞細胞数(41.5~42.6 個)に影響を及ぼさなかった。しかし、胚盤胞形成率は無処理区(15.2%)と比較して処理区(24.8%)で有意に高くなった($P < 0.05$)。以上の結果から、活性化処理後に 8mM のバルプロ酸で 24 時間処理することにより、マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生を改善し得ることが示された。

(実験 3) 成体腎臓由来細胞および胎児由来細胞を用いた場合には、融合率(63.6~70.8% および 72.7~78.7%)、卵割率(68.2~79.1% および 66.7~85.5%)、胚盤胞形成率(12.8~19.0% および 19.0~23.1%) および胚盤胞細胞数(41.1~44.9 個 および 38.1~49.8 個)のいずれにおいてもドナー細胞を採取した個体による違いは見られなかった。しかし、新生児耳介由来細胞を用いた場合には、融合率(61.0~78.6%) および胚盤胞細胞数(36.5~57.5 個)が個体間で有意に異なった($P < 0.05$ あるいは $P < 0.01$)。一方、ドナー細胞の種類間で比較した場合、融合率(67.2~74.7%)、卵割率(73.5~74.9%) および胚盤胞細胞数(42.5~44.9 個)には異なる細胞間で有意な差は見られなかった。しかし、胎児由来細胞を用いて作出したクローン胚の胚盤胞形成率(20.3%)は新生児耳介由来細胞における値(14.2%)と比較して有意に高くなった($P < 0.05$)。以上の結果から、ドナー細胞の種類および採取した個体の違いはマイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生に影響を及ぼし、胎児由来細胞を用いることにより効率的に胚盤胞を作出し得ることが示された。

(実験 4) 162 個のクローン胚(胎児線維芽細胞 1 由来: 55 個、3 由来: 56 個および 4 由来: 51 個)を作出後、バルプロ酸処理をしないで移植した場合には、仮親の妊娠は認められなかった。一方、152 個のクローン胚(胎児線維芽細胞 1 由来: 50 個、3 由来: 55 個および 4 由来: 47 個)をバルプロ酸処理後に移植した仮親は妊娠し、帝王切開によって 5 頭の産子が得られた。そのうち 2 頭は死産で奇形が認められたが、3 頭は生存しており形態的な異常は見られなかった。産子、ドナー細胞および仮親のゲノム DNA における 12 のマイクロサテライトマーカーを解析した結果、死亡産子 2 頭および生存産子 2 頭は、胎児線維芽細胞 3 とすべてのマーカーにおいて両アリルのサイズが一致した。また、生存産子 1 頭は、胎児線維芽細胞 1 とすべてのマーカーにおいて両アリルのサイズが一致した。産子と仮親の間には、両アリルともサイズが異なるマーカーが存在した。よって、死亡産子 2 頭および生存産子 2 頭は胎児線維芽細胞 3、生存産子 1 頭は胎児線維芽細胞 1 に由来するクローンであることが示された。以上の結果から、活性化後にバルプロ酸処理をしたマイクロミニピッグ体細胞クローン胚は、産子にまで発生し得ることが明らかとなった。

(実験 5) バルプロ酸処理の有無は、卵割率(75.1%) および胚盤胞細胞数(37.8~42.5 個)に影響を及ぼさなかった。しかし、胚盤胞形成率は無処理区(13.4%)と比較して処理区(22.5%)で有意に増加した($P < 0.01$)。AF594-IB4 染色陰性胚盤胞(-GalT 遺伝子

がロックアウトされた胚盤胞)の割合(62.4~80.2%)は、バルプロ酸処理の影響を受けなかった。現在、これらの胚盤胞のゲノムDNAにおける -GalT 遺伝子の変異状況について解析を進めている。以上の結果から、 -GalT 遺伝子をロックアウトしたマイクロミニピッグ体細胞に由来するクローン胚の体外発生も、バルプロ酸処理によって改善し得ることが示された。

本研究の結果から、マイクロミニピッグにおける効率的な体細胞核移植技術が確立された。また、この技術を応用して遺伝子改変マイクロミニピッグを作出し得る可能性が示された。

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7件)

Kitaji H, Ookutsu S, Sato M, Miyoshi K. Preincubation with green tea polyphenol extract is beneficial for attenuating sperm injury caused by freezing-thawing in swine. *Animal Science Journal*. 査読有. 86 巻. 2015 年. 922-928 ページ
doi: 10.1111/asj.12379

Sato M, Koriyama M, Watanabe S, Ohtsuka M, Sakurai T, Inada E, Saitoh I, Nakamura S, Miyoshi K. Direct injection of CRISPR/Cas9-related mRNA into cytoplasm of parthenogenetically activated porcine oocytes causes frequent mosaicism for indel mutations. *International Journal of Molecular Sciences*. 査読有. 16 巻. 2015 年. 17838-17856 ページ
doi: 10.3390/ijms160817838

Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Generation of - 1,3- galactosyltransferase-deficient porcine embryonic fibroblasts by CRISPR/Cas9-mediated knock-in of a small mutated sequence and a targeted toxin-based selection system. *Reproduction in Domestic Animals*. 査読有. 50 巻. 2015 年. 872-880 ページ
doi: 10.1111/rda.12565

Ozawa M, Himaki T, Ookutsu S, Mizobe Y, Ogawa J, Miyoshi K, Yabuki A, Fan J, Yoshida M. Production of cloned miniature pigs expressing high levels of human apolipoprotein(a) in plasma. *PLoS ONE*. 査読有. 10 巻. 2015 年. e0132155
doi: 10.1371/journal.pone.0132155

Kitaji H, Ookutsu S, Sato M, Miyoshi K. A new rolling culture-based in vitro fertilization system capable of reducing polyspermy in porcine oocytes. *Animal Science Journal*. 査読有. 86 巻. 2015 年. 494-498 ページ
doi: 10.1111/asj.12327

Miyoshi K, Mizobe Y. Osmolarity- and stage-dependent effects of glycine on parthenogenetic development of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有. 60 巻. 2014 年. 349-354 ページ
http://doi.org/10.1262/jrd.2013-135

Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, Nishi Y, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. *Xenotransplantation*. 査読有. 21 巻. 2014 年. 291-300 ページ
doi: 10.1111/xen.12089

[学会発表](計10件)

前田昂亮. バルプロ酸処理を用いた体細胞クローンマイクロミニピッグの作出. 第8回日本暖地畜産学会. 2015年10月24~25日. 東海大学(熊本県・熊本市)

佐藤正宏. ブタ単為発生卵細胞質へのCRISPR/Cas9系mRNAの直接顕微注入によるゲノム編集は多様な標的遺伝子変異を持つ細胞を生む. 第108回日本繁殖生物学会. 2015年9月17~19日. 宮崎大学(宮崎県・宮崎市)

三好和睦. ミニブタにおける体細胞クローニング技術の確立およびそれを用いた新規商品の評価・開発. 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト第3回公開シンポジウム~ブタの医用動物への展開~. 2015年3月24日. 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

佐藤正宏. 次世代型 KO システム CRISPR/Cas9 ゲノム編集法による遺伝子改変ブタ作成への可能性. 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト第3回公開シンポジウム~ブタの医用動物への展開~. 2015年3月24日. 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

佐藤正宏. ブタにおけるCRISPR/Cas9, targeted toxin 法を用いた multiple constructsの標的遺伝子導入システムの開発. 第107回日本繁殖生物学会. 2014年8月21~23日. 帯広畜産大学(北海道・帯広市)

前田昂亮. トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩がブタ卵子および

マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響. 第107回日本繁殖生物学会. 2014年8月21~23日. 帯広畜産大学(北海道・帯広市)
長尾洋三. 種々のマイクロミニピッグ体細胞を用いて作出したクローン胚の体外発生. 第107回日本繁殖生物学会. 2014年8月21~23日. 帯広畜産大学(北海道・帯広市)
佐藤正宏. CRISPR/Cas9による遺伝子編集と標的毒素法との組み合わせは、-1,3-galactosyltransferase遺伝子を完全にKOしたブタ胎仔性線維芽細胞の効率の作製に有効である. 第36回日本分子生物学会. 2013年12月3~6日. 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)
溝部大和. 振動培養装置がヒト体外受精に及ぼす影響. 第58回日本生殖医学会. 2013年11月15~16日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
郡山実優. トランスポゾン PiggyBac システムによる複数遺伝子のブタ細胞への同時導入. 第106回日本繁殖生物学会. 2013年9月12~14日. 東京農工大学(東京都・府中市)

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: ヒトアポリポプロテイン(a)発現ミニブタの作出
発明者: 吉田光敏, 小澤政之, 三好和睦
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許
番号: 特許第5803036号
取得年月日: 2015年9月11日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0015/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 和睦 (MIYOSHI KAZUCHIKA)
鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授
研究者番号: 70363611

(2) 研究分担者

窪田 力 (KUBOTA CHIKARA)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授
研究者番号: 80420652

(3) 連携研究者

川口 博明 (KAWAGUCHI HIROAKI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 60325777