

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560212

研究課題名(和文)体細胞クローン動物由来腎臓移植モデルによるマイナー組織適合性抗原の評価

研究課題名(英文)Evaluation of minor histocompatibility antigens by kidney transplant model derived from somatic cell cloned animals

研究代表者

音井 威重(Otoi, Takeshige)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・教授

研究者番号：30311814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：クローン動物を用いて体細胞を提供したドナーへの臓器移植を行うことにより、相違するミトコンドリアDNAの影響について検討した。本研究において、移植臓器の基となるクローン産子を得ることができなかったが、異種間クローン胚(ネコ体細胞と除核ブタもしくはウシ卵子を融合)の発育におけるトリコスタチンAの効果調べた結果、ウシとの異種間クローン胚作製には効果はあったが、ブタとのクローン胚作製には効果がなかったことから、ミトコンドリアDNAの相違がクローン胚の発育にも影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to examine the effect of different mitochondrial DNA (mtDNA) by the transplantation of organ to donors that provided somatic cells using cloned animals. However, we could not obtain cloned cats for transplantation of organs to somatic cell donor cats. Thus, the effect of trichostatin A (TSA) on the development of interspecies cloned embryos (cat somatic cells / porcine or bovine enucleated oocytes) was investigated. TSA treatment had beneficial effects on the development of Cat-Cow cloned embryos but not of Cat-Pig cloned embryos. These results indicate that the difference in mitochondrial DNA may affect the development of cloned embryos.

研究分野：生殖工学

キーワード：クローン 腎移植 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

現在、ブタ体内でのiPS細胞に由来した異種臓器再生の可能性が提唱され、不足しているヒト臓器の代替として期待されるようになった。しかし、ブタ体内で再生された臓器を移植する場合、臓器を構築する血管はブタ由来であるため、移植後も拒絶反応を抑制する必要がある。仮に、免疫反応抗原に関連する遺伝子をブタからノックアウトしたとしても、血管構成細胞のミトコンドリアDNA (mtDNA) はブタ由来であり、異種のmtDNAによる拒絶反応に関する問題は残る。

これまでにミトコンドリアは、細胞核とは異なる独自のDNAを持ち、加齢に伴って突然変異は発生するが、免疫には関与しないとみられていた。しかし、近年ミトコンドリアが持つDNAにわずかな突然変異があると、宿主の自然免疫系により選択的排除が起こることが報告された。一方、体細胞クローン産子においては、ドナー細胞由来のmtDNAは消失し、ほぼレシピエント卵子由来となる。すなわち、ドナーとクローン産子のmtDNA型が一致しないこととなる。これまでに、腎臓のような複雑な構造を持つ臓器を、体細胞クローン動物から体細胞を提供したドナーへ移植した報告はなく、ドナーと異なるmtDNAの影響は不明である。

本研究は、海外に先駆けてクローン動物を用いて体細胞を提供したドナーへの臓器移植を行うことにより、相違するミトコンドリアDNAの影響について検討することを目的とした。これら知見は、今後発展すると予想されるiPS細胞などの幹細胞を用いた再生医療に貢献すると期待され、さらに、再構築胚作成時のミトコンドリア構成比を評価することにより、mtDNA比の違いが移植臓器の拒絶反応に及ぼす影響について明らかにされると期待された。

2. 研究の目的

本研究は、体細胞クローンネコの片側腎臓を体細胞提供ネコであるドナーに移植し、移植臓器の細胞中に混在するミトコンドリアDNA (mtDNA) による影響 (拒絶反応) を評価することを目的とした。そのための手技として、腎移植の手技の確立と、(1) 作出した体細胞クローンネコから体細胞を提供したドナーへ腎臓を移植して、移植後の拒絶反応についての評価、さらに(2) 核移植を行う際にレシピエント細胞質へのドナー培養細胞由来ミトコンドリアの注入、もしくは異種の細胞質と融合した再構築胚を作製し、mtDNAの違いによる胚発育および腎移植後の拒絶反応について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 体細胞クローンネコからの腎臓移植

モデル作成のため必要な体細胞を4頭の雌ドナーから採取し、その体細胞を核に除核卵子に移植・融合後、2細胞期以上に発育した胚を含む融合胚を受卵雌の卵管に移植して(40個~50個/頭)、体細胞クローンネコの作製を試みた。なお、ネコは季節発情を示すため、1月~5月に亘り移植を行った。一方、腎移植手技の確立および腎移植モデルの対照として、一度遊離した腎臓を再移植する自家移植ネコを作製し、移植後の腎機能および組織学的評価を行った(3頭)。

(2) mtDNA比の違いによる胚発育の検討: レシピエント細胞質とドナー培養細胞由来のミトコンドリアが全く異なる異種間での再構築胚の発育について詳細な検討を行った。特に、ドナー細胞としてネコ由来繊維芽細胞を用い、除核ウシ/ブタ卵母細胞と融合後、50nM Trichostatin A (TSA) で24時間処理を行い、その後の異種間での体細胞クローン胚の発育能およびアセチル化状態について検討した。

4. 研究成果

(1) 体細胞クローンネコからの腎臓移植: 作出した体細胞クローンネコから体細胞を提供したドナーへ腎臓を移植する前に、手技的対照として同じ個体への腎摘出後の再移植による腎組織への影響を3頭の雌ネコを用いて調べた。その結果、再移植直後の腎機能は低下したが、1週間後には摘出再移植腎機能の回復を確認でき、移植技術を確立した。

一方、腎臓移植レシピエントとなるネコから採取した体細胞からクローンネコの作出を試みた。29頭の受胎雌ネコに体細胞クローン胚(40~50個/頭)を移植した結果、1頭の妊娠ネコを得たが、途中流産したため、ドナー腎臓を得ることができなかった。今回4頭のネコ(耳介)から体細胞を採取したが、いずれの体細胞からもクローンネコが作成できなかったことから、クローン胚作製に使用する体細胞の重要性が示唆された。

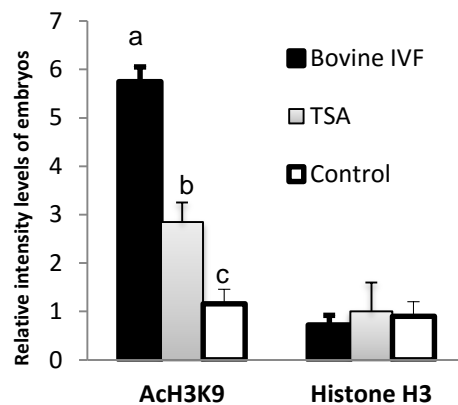


図1. ウシ/ネコ異種間クローン胚の2細胞期におけるH3k9とhistone H3の相対濃度の比較

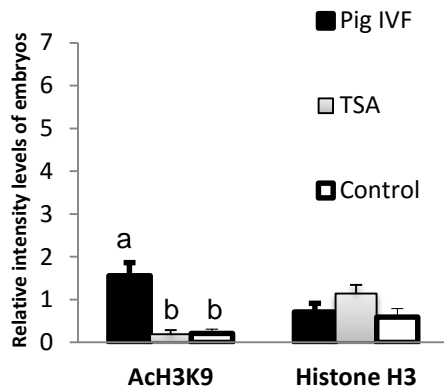


図2. ブタ/ネコ異種間クローン胚の2細胞期における H3k9 と histone H3 の相対濃度の比較

(2) mtDNA比の違いによる胚発育の検討：レシピエント細胞質とドナー培養細胞由来のミトコンドリアが全く異なる異種間での再構築胚の発育について検討した。特に再構築胚の作製時に細胞周期の同期化が重要であるが、異種間での再構築胚において化学的処置による同期化は効果のないことが示された。

次に、ドナー細胞としてネコ由来繊維芽細胞を用い、除核ウシ/ブタ卵母細胞と融合後、50nM TSA で 24 時間処理を行い、その後の異種間での体細胞クローン胚の発育能およびアセチル化状態について検討した。その結果、胚盤胞発生率は、除核ウシ卵母細胞との融合胚で TSA 処理区 (3.7%)、無処理区 (0%) となり、TSA 処理効果が認められたほか、アセチル化を示す H3k9 値は TSA 処理区が有意に高い値を示した (図1)。一方、除核ブタ卵母細胞との融合胚は、TSA 処理区 (0.7%)、無処理区 (8.0%) となり、アセチル化を示す H3K9 値にも差が認められなかった (図2)。このように、ウシ卵母細胞を用いた異種間での体細胞クローン胚に観察される TSA 処理の効果は、ブタにおいて認められず、TSA 処理効果はレシピエント卵子の品種間により異なることが示された。これら結果から、mtDNA の相違が胚発育に影響すると推察された。

さらに、ドナー細胞としてネコ由来繊維芽細胞を用い、除核ウシ卵母細胞と融合後のアセチル化について詳細な検討を行った。特にヒストン H3 の Lysine 9 (H3K9) および Lysine18 (H3K18) が遺伝子の転写活性化と関連していること、Lysine23 (H3K23) も遺伝子発現に関与していることから、融合後2時間目から分割胚までの異種間クローン胚における発現値を調査した。その結果、TSA 処理したクローン胚の前核期形成以降において、体外受精胚と同様に、TSA 処理していない対照クローン胚と比較していずれの Lysine も高い発現値を示した (図3)。このことから、TSA 処理により異種間クローン胚の

ヒストン発現を体外受精胚と同様の発現に改変することにより胚発育を向上していることが示唆された。

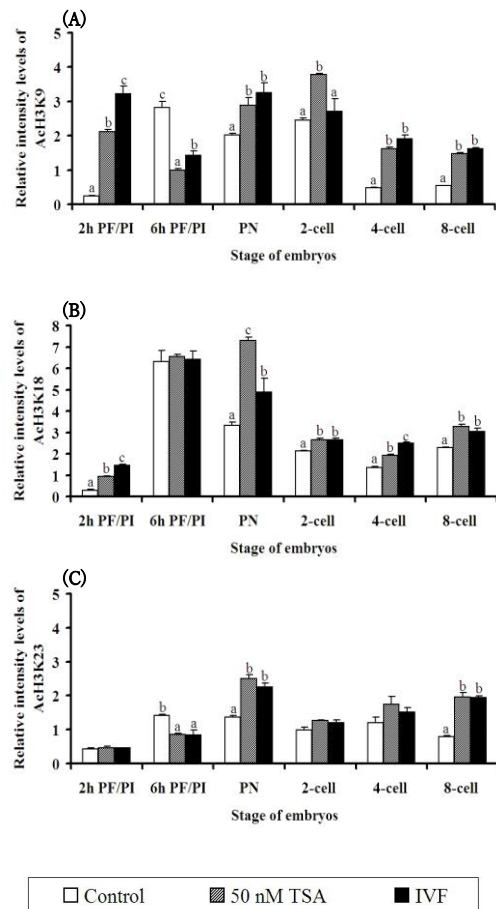


図3. ウシ/ネコ異種間クローン胚の融合2時間目 (2hPF/PI)、6時間目 (6hPF/PI)、前核期 (PN)、および2細胞から8細胞における H3K9 (H3K9ac) (A), H3K18 (H3K18ac) (B), H3K23 (H3K23ac) (C) H3k9 の相対濃度の比較。Control: TSA 処理なし

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Wittayarat, M., Sato, Y., Do, T.K.L., Chatdarong, K., Tharasanit, T., Techakumphu, M., Taniguchi, M. and Otoi, T. Epigenetic modulation on Cat-Cow interspecies somatic cell nuclear transfer embryos by treatment with Trichostatin A. *Anim. Sci. J.*, 88, 593-601, (2017). 査読有 doi: 10.1111/asj.12676
- ② Do, T.K.L., Wittayarat, M., Terazono, T., Sato, Y., Taniguchi, M., Tanihara, F., Takemoto, T., Kazuki, Y., Kazuki, K., Oshimura, M. and Otoi, T. Effects of duration of electric pulse on in vitro development of cloned cat embryos with human artificial chromosome vector. *Reprod. Dom. Anim.*, 51, 1039-1043,

(2016). 査読有
doi: 10.1111/rda.12766.

- ③ Wittayarat, M., Fujiwara, A., Chatdarong, K., Techakumphu, M., Sato, Y., Tanihara, F., Morita, Y., Taniguchi, M. and Otoi, T. Cell cycle analysis and interspecies nuclear transfer of cat cells treated with chemical inhibitors. Acta Vet. Hung. 62, 233-242, (2014). 査読有
doi: 10.1556/AVet.2013.050.

[学会発表] (計1件)

- ① Do, L.T.K., Sato, Y., Taniguchi, M. and Otoi, T. Trichostatin A treatment effects on *in vitro* development of interspecies nuclear transfer cat embryos depend on recipient cytoplasm species. Reprod. Fertil. Dev. 27: P113
2015年1月11日 Versailles (France)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

音井 威重 (OTOI, Takeshige)
徳島大学・大学院生物資源産業学研究所・
教授
研究者番号：30311814

(2) 研究分担者

原口 友也 (HARAGUCHI, Tomoya)
山口大学・共同獣医学部・助教
研究者番号：90634759

久保 正仁 (KUBO, Masahito)
山口大学・共同獣医学部・助教
研究者番号：40593439

(平成27年3月31日削除)