

令和元年6月6日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15026

研究課題名(和文) 卵核胞期卵母細胞を用いた新しい異種間体細胞核移植法の開発

研究課題名(英文) Novel Interspecies Nuclear Transfer Using Germinal Vesicle Stage Oocytes.

研究代表者

細井 美彦 (Hosoi, Yoshihiko)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：70192739

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)：現在のところ、異種間体細胞核移植による個体作製はほとんど成功しない。そこで本研究では、卵核胞期卵母細胞に異種の体細胞を移植して成熟させることで異種間核移植成熟卵子を獲得し、それを用いて異種間核移植の成功率を向上させることが可能かどうかを検討した。モルモット線維芽細胞をマウスおよびブタ卵核胞期卵母細胞に移植して体外成熟させ、第一極体を放出させることには成功したが、通常の成熟卵子でみられるような紡錘体はみられなかった。また、これらを活性化させて単為発生させた場合においても、これらの染色体を通常の成熟卵子に核移植した場合においても、2細胞期以降へ発生することはほとんどなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の研究期間内において、われわれの試みた新規異種間核移植法が異種間核移植胚の発生能を向上させるといった結果を得ることはできなかったが、異種間核移植卵母細胞の転写活性がドナー細胞の細胞周期に依存すること、および異種間核移植成熟卵子において正常な紡錘体が形成されなかったことは本研究課題において新たに得られた知見である。今後進むべき方向は異種間核移植卵母細胞に紡錘体を形成させることであると示したことは学術的意義があったと考える。発生工学によって絶滅危惧種の増殖や絶滅種の再生が可能になれば社会的なインパクトは非常に大きく、本研究成果はそこへ至るまでのステップのひとつとして意味をなすものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Successful production on animals by interspecies nuclear transfer (iNT) is extremely rare. In this study, we attempted to improve iNT by using germinal vesicle (GV) stage oocytes. Guinea pig fibroblasts were transferred into mouse and porcine GV oocytes, and those iNT oocytes extruded the first polar body after in vitro maturation. However, those iNT oocytes didn't have the normal-shaped spindle, indicating that they were not "true" matured oocytes. The iNT oocytes failed to develop beyond 2-cell stage after parthenogenetic activation, and the chromosomes of iNT oocytes didn't show the developmental potential beyond 2-cell stage after transfer into normal matured oocytes. In conclusion, our novel iNT method using GV oocytes didn't improve the development of iNT embryos.

研究分野：発生工学

キーワード：発生工学 卵核胞期卵母細胞 異種間核移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体細胞クローン動物は、体細胞核を成熟卵子に移植する体細胞核移植により作製される。この技術は絶滅危惧種の増殖や絶滅種の再生への最もダイレクトな方法であるが、絶滅危惧種や絶滅種の成熟卵子を獲得することは困難あるいは不可能であるという問題がある。これまでに偶蹄目で数例、家畜卵子を用いた異種間核移植が報告されているが、これらは近縁種同士の核移植である。近縁種の卵子が入手不可能な場合、2通りの解決策が考えられる。ひとつは、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立して配偶子・受精卵を作製する方法であり、もうひとつは、可能な限り近い種の卵子を用いて、体細胞と卵子の双方を互いに適するように操作・改変して核移植を行う方法である。後者の最大の利点は、ゲノムが正常であれば死んだ体細胞の利用が可能であることである。すなわち、適切に保存された組織がない絶滅種を再生させる唯一の方法が異種間核移植である。そこで本研究では、卵細胞期 (GV 期) 卵母細胞を用いることにより、異種間核移植に適した体細胞核およびレシピエント卵子を作製する方法の開発を試みる。

2. 研究の目的

異種間核移植では、異種の体細胞を受け入れることができるレシピエント卵子、および異種のレシピエント卵子内で生存可能な体細胞核の双方が不可欠である。そこで本研究では、卵細胞期卵母細胞を用いることにより、異種間核移植の効率を向上させる方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

マウスおよびブタの GV 期卵母細胞にモルモット線維芽細胞を融合させて核移植卵を作製し、体外成熟させて転写活性および紡錘体形成を調べた。さらに、成熟した核移植卵の染色体の発生能を単為発生または MII 期卵子への核移植により調べた。

本研究においては、極体放出により倍数性が変化するため、体外成熟時・活性化時のサイトカラシン D 処理によって極体放出を抑制するかどうか、接触阻害によって増殖が低下した細胞 (G1/G0 期、倍数性 2n) またはノコダゾール処理によって M 期に同期化した細胞 (M 期、倍数性 4n) のどちらをドナー細胞として用いるかを組み合わせ、正常な倍数性の維持を試みている。

(1) GV 期卵母細胞を用いた核移植および体外成熟

マウスおよびブタ GV 期卵母細胞を除核し、モルモット線維芽細胞と融合させることで核移植卵を作製した。マウス GV 期卵母細胞を用いた核移植卵は mTaM 培地 (47.5% MEM, 47.5% TYH, 5% FBS)、ブタ GV 期卵母細胞を用いた核移植卵は POM 培地 (機能性ペプチド研究所) で体外成熟させた。体外成熟後、第一極体の放出したものを成熟卵と判定した。

(2) 転写活性の検出

成熟培養中の 5-ethynyl uridine (EU) の取り込みを Click-iT RNA Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) で可視化することにより転写活性を検出した。減数分裂に入ると核膜が消失し、核内への EU の取り込みが観察できなくなるため、核膜崩壊を阻害するため成熟培地に cAMP を添加して成熟培養した。

(3) 紡錘体の観察

核移植卵の紡錘体形成は、抗チューブリン抗体を用いた免疫蛍光染色によって観察した。

(4) 異種間核移植卵の染色体の発生能の評価

成熟した異種間核移植卵の発生能を、単為発生および MII 期卵子への核移植によって調べた。マウス GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の単為発生については、成熟培養後の核移植卵を塩化ストロンチウムで単為発生させ、mKSOM で 3.5 日間体外培養した。

ブタ GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の単為発生については、成熟培養後の核移植卵に電気刺激を加え、シクロヘキシミド存在下で 6 時間培養後、PZM-5 (機能性ペプチド研究所) で 5 日間培養した。

II 期卵子への核移植については、マウス GV 期卵母細胞を用いた核移植卵を成熟培養後、その染色体を除核 MII 期卵子に核移植し、塩化ストロンチウムで活性化した後、mKSOM で 3.5 日間培養した。

4. 研究成果

(1) GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の体外成熟

モルモット細胞核を移植されたマウス GV 期卵母細胞の 62.9%、モルモット細胞核を移植されたブタ GV 期卵母細胞の 73.1%において、成熟培養後に第一極体の放出が観察された。このことから、異種の体細胞核を移植された GV 期卵母細胞を体外成熟させることが十分に可能であることが明らかとなった。

(2) GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の転写活性

これまでに、GV 期卵母細胞では転写活性が失われるという報告があったが、本研究においても

ほとんどのGV期卵母細胞において転写活性はみとめられなかった(図1A。まれに図1Bのような転写活性をもつ卵がみられた)。GV期卵母細胞に移植された体細胞核の転写活性を調べたところ、それが細胞周期に依存することが明らかになった。G1/G0期の細胞を用いた核移植卵では転写活性が認められた(図1C-E)が、M期の細胞を用いた核移植卵では転写活性が認められなかった(図1G-I)。間期の核は核膜によって細胞質と隔離されているためにGV期卵細胞質の影響を大きく受けずにそのまま転写を続け、核膜の存在しないM期の染色体はGV期卵細胞質の環境に直接曝されるため、その後形成される核における転写が抑制されると推察することができる。このことは、核膜が存在しない条件下で、GV期卵細胞質が体細胞核をリプログラムすることを示唆している。また、ブタGV期卵母細胞を用いた核移植卵においても同様にG1/G0期の細胞核は転写活性を有していた(図2)。

興味深いことに、G1/G0期の細胞を用いた核移植卵では、時間経過とともに核の膨化がみられたが、M期細胞を用いた核移植卵では、核は形成されるがその後の膨化がみられなかった(図1G-I)。従来のMII期卵子を用いる核移植では、移植された細胞核の核膜が崩壊して染色体が凝集し、その後核の膨化がみられるのが一般的である。また、本研究で用いたGV期卵母細胞はM期ではないため、そこへ移植された細胞核には核膜崩壊および染色体凝縮は起こらないはずである。核膜崩壊および染色体凝縮を経ないG1/G0期細胞由来の核が膨化し、もともと核膜をもたずに染色体凝縮を起こしているM期細胞由来の核が膨化を起こさないという結果は、従来の知見に基づく予想とは逆であり、GV期卵母細胞のもつ未知の能力の存在を示唆している。

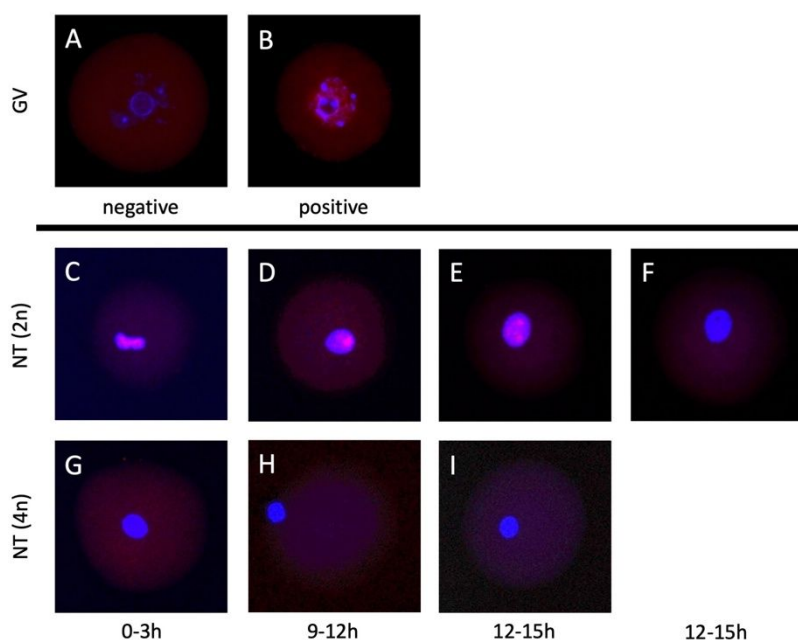


図1：マウスGV期卵母細胞を用いた核移植卵の転写活性

A: GV期卵母細胞。B: GV期卵母細胞(転写活性あり)。C-F: G1/G0期細胞核(2n)を用いた核移植卵(C-E: 転写活性あり、F: 転写活性なし)。G-I: M期細胞核(4n)を用いた核移植卵。核移植卵の下の数字はそれぞれ核移植後にEUを添加した時間帯(体外成熟培養開始を0hとする)。それぞれの実験区において3時間添加し、直後に固定・染色を行なった。C D E(C D F)では時間経過とともに核の膨化がみられる。青: DAPI、赤: EU。

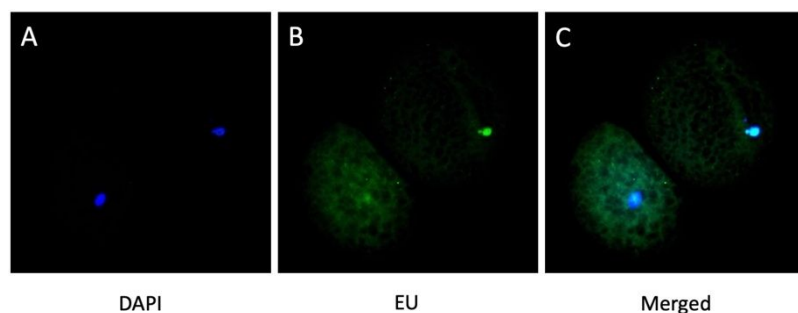


図2：ブタGV期卵母細胞を用いた核移植卵の転写活性

A: DAPI。B: EU。C: Merged。DAPIとEUのシグナルが重なっていることから、核において転写が行われていることがわかる。

(3) GV期卵母細胞を用いた核移植卵の紡錘体形成

マウスGV卵母細胞を用いた核移植卵では、染色体が卵細胞質の広い範囲に散在していることが多く、半数以上の卵で染色体周囲にチューブリンの集積がみられるものの、紡錘体を形成しているものはみとめられなかった(図3B-C)。この傾向は、サイトカラシンD存在下で体外成熟を行なった場合も同様であった(図3D)。

一方、ブタ GV 卵母細胞を用いた核移植卵では、染色体が散在せず、塊として存在した(図 4A)。この傾向は、サイトカラシン D 存在下で体外成熟を行なった場合も同様であった(図 4B)。

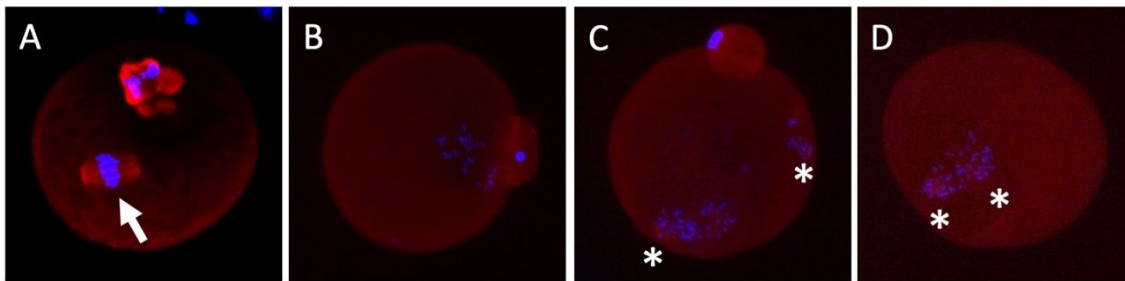


図 3 : マウス GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の紡錘体形成

A: MII 期卵子。B: 成熟した核移植卵。C: 成熟した核移植卵。D: サイトカラシン D 存在下で成熟した核移植卵。A では第二減数分裂中期の紡錘体(矢印)がみられる。B では染色体が散在し、染色体周囲へのチューブリンの集積がみられない。C および D では、チューブリンが染色体周辺に集積している(*)が、紡錘体形成はみられない。

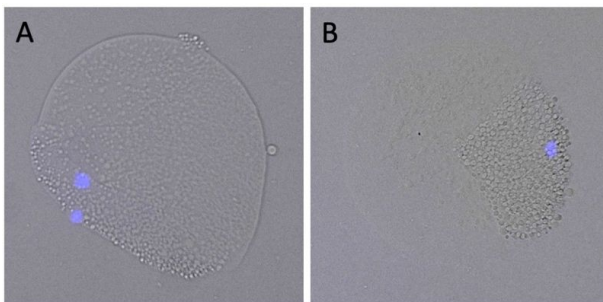


図 4: ブタ GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の染色体分布

A: 成熟した核移植卵。B: サイトカラシン D 存在下で成熟した核移植卵。A では極体が放出されるため、卵細胞質内と極体内にそれぞれひとつずつ DAPI のシグナルがみられる。B では極体が放出されないため、細胞質内にひとつ DAPI のシグナルがみられる。

(4) GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の発生能

マウスおよびブタ GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の体外成熟後の発生能を単為発生および核移植によって調べた。単為発生については、マウスにおいてもブタにおいても卵割したものはごく少数であった(図 5: マウスブタ単為発生、ブタ単為発生)。このことから、GV 期卵母細胞を用いた核移植卵自体は発生能を持たないことが明らかとなった。

GV 期卵母細胞を用いた核移植卵自体の発生能がなくても、その染色体を正常な MII 期卵子に核移植することで発生が可能となる可能性が考えられるため、核移植卵の染色体を除核 MII 期卵子に移植して、その発生を調べた。上記(3)において紡錘体形成に異常が認められたことから、極体放出によって倍数性異常が生じる可能性が高いと考えられるため、G1/G0 期(2n)のモルモット線維芽細胞を用いて、体外成熟時および活性化時にサイトカラシン D 処理により極体放出を抑制することで正常な倍数性を維持した。核移植の結果、93.5%の核移植卵において卵割がみられたが、2 細胞期以降へ発生したものはごく少数で、5 細胞期以降への発生はみられなかった(図 5: マウス核移植)。以上より、GV 期卵母細胞を用いる方法では異種間核移植の発生率を向上させることはできなかった。

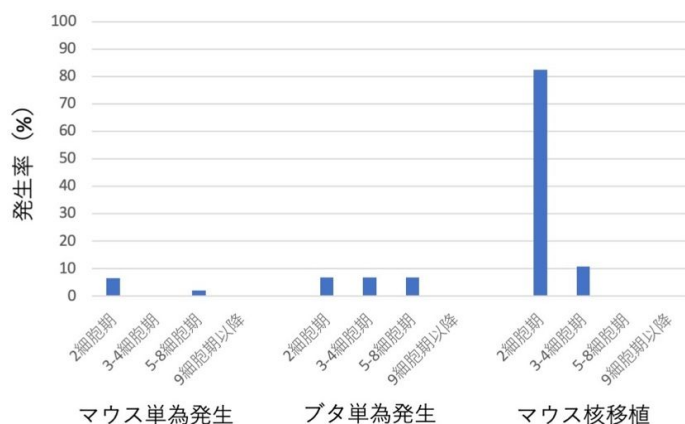


図 5: GV 期卵母細胞を用いた核移植卵の体外成熟後の発生能

マウス単為発生: モルモット細胞をマウス GV 期卵母細胞へ核移植し、体外成熟後に単為発生。ブタ単為発生: モルモット細胞をブタ GV 卵母細胞へ核移植し、体外成熟後に単為発生。マウス核移植: モルモット細胞をマウス GV 期卵母細胞へ核移植し、体外成熟後にその染色体をマウス除核 MII 期卵子へ核移植。

(5) まとめ

本研究では正常な紡錘体形成や高い発生率を達成することができなかった。成果が異種間核移植技術の向上に直接繋がるとはいいがたく、学会や論文の発表には至らなかった。しかし、紡錘体形成が大きなハードルであることが明らかになり、細胞周期に依存した転写活性や核の膨化についての知見が得られたことは重要な進歩である。転写や核の再構築についてのさらなる研究および正常な紡錘体を形成させる方法の探求が今後必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：黒坂 哲

ローマ字氏名：(KUROSAKA, Satoshi)

所属研究機関名：近畿大学

部局名：先端技術総合研究所

職名：講師

研究者番号(8桁)：30625356

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。