

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19333

研究課題名(和文) 新生子性腺に存在する未発育生殖細胞を用いた体外生産胚の作出システムの開発

研究課題名(英文) Production of porcine blastocysts using sperm and oocytes retrieved from immature gonadal tissues grafted into nude mice

研究代表者

金子 浩之 (KANEKO, Hiroyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・ユニット長

研究者番号：60343993

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)：幼若期のブタ卵巢には、雌の最も未発育な生殖細胞である原始卵胞卵が多数存在しているが、個体へと発生する能力は有していない。本研究ではこのような未発育な原始卵胞卵を人為的に発育させ、核移植によって初期胚を作製することを試みた。まず、原始卵胞卵のみを含む幼若ブタの卵巢をヌードマウスに移植し、原始卵胞卵を人為的に発育させた。マウス体内で発育させたブタ卵は体外受精後に胚へと発生する能力を持たないため、マウスから回収したブタ卵の核あるいは極体を、別途ブタから採取し予め核を除いた卵(胚発生能あり)の細胞質に注入し再構築卵を作製した。次いで再構築卵を体外授精した結果、初期胚を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブタは重要な産肉資源である。地域固有のブタ品種(在来ブタ)は、現在の優占種であるランドレース等の西洋品種に比べて発育は劣るが、気候環境の変化に対する抵抗性など独特な形質を持つため、ブタの持続的な品種改良には必須のパーツである。しかしながら、西洋品種の導入によって、各国で在来ブタは急減しつつある。卵巢には利用されることのない原始卵胞卵が多数存在しており、もし原始卵胞卵を人為的に発育させて初期胚を作製できれば、生殖活動期にない幼若期のブタからも、胚移植によって個体の生産が可能となる。本研究の成果によって、幼若ブタの卵巢に含まれる原始卵胞卵を人為的に発育させ初期胚にまで到達させる新手法が開発された。

研究成果の概要(英文)：The neonatal ovary contains a large pool of primordial oocytes and could be a potential genetic resource if these oocytes could be given developmental competence. In this study, we established a pig model for production of blastocysts from primordial oocytes. Small pieces of neonatal ovaries were grafted into nude mice to accelerate the growth of primordial follicles. Fully-grown oocytes were then recovered from xenografts and matured in vitro (donor oocytes). Metaphase II (MII) chromosomes or the first polar bodies (Pbs) from donor oocytes were transferred into cytoplasm of enucleated oocytes that had been obtained from neonatal gilts and matured in vitro to make reconstructed oocytes. After in vitro fertilization, reconstructed oocytes generated from MII chromosomes as well as those from the first Pbs reached the blastocyst stage. The results show that blastocysts can be obtained from porcine primordial oocytes.

研究分野：家畜繁殖

キーワード：原始卵胞卵 異種間移植 核移植 胚発生 ブタ

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎子期および幼若期の動物の性腺には、雌の最も未発育な生殖細胞である原始卵胞卵および雄の最も未発育な生殖細胞である前精祖細胞が存在しているが、個体へと発生する能力は有していない。しかしながら、このような未発育な生殖細胞を人為的に発育させて初期胚（胚盤胞）を作製することができれば、生殖活動期にない胎子あるいは幼若期の動物からも遺伝情報を引き出し、さらに胚移植によって個体の生産が可能となる。

ブタは食料生産上の重要な資源であるとともに、ヒトとの生理・解剖学的な類似性から、ヒトの疾患モデル動物としての有用性が高い。近年、遺伝子組換え技術と生殖工学技術によって、種々のヒト疾患の組換えモデルブタが開発されている。しかし、原因となる遺伝子によっては、初代の組換えモデルブタが成体に到達することなく幼若期で死亡してしまう。そのため、成体から採取した生殖細胞を用いる従来法では後代を得ることができず、開発したモデルブタを研究機関に配布できない事態に陥っている。この問題の解決法の一つは、生後早期の卵巣および精巣に含まれる生殖細胞から後代を生産し、系統を維持することである。

また、家畜の改良には多様性の維持が基盤となる。成体を飼育し精液等を採取し超低温保存する現行の多様性保存法は、飼育スペースおよび経費等の制約があるため、多くの個体には適用できない。幼若期の性腺は、子ブタのうち生産に回さないブタから採取できるため、比較的容易に収集可能で、多くの個体の遺伝情報を保存できるものと考えられる。しかし、この資源（性腺）の活用には、新生子性腺から個体を再生させる手法の開発が必須である。

(2) 未成熟なブタの性腺組織をヌードマウスに移植すること（異種間移植）で、原始卵胞卵および精祖細胞を発育させることが可能である。マウス体内で発育させたブタ精子は受精し個体へと発生する能力を有しているが[1-3]、マウス体内で発育させたブタ卵は受精しても胚盤胞には到達できない（胚盤胞発生率1%以下）[4, 5]。しかし、マウスから回収したブタ卵の透明帯を除去し、ブタ体内で発育した卵（胚発生能あり）の細胞質の薄片を融合させると、胚発生率が10%にまで上昇した[6]。これらの知見から、マウス体内で発育したブタ卵の細胞質は胚発生に必要な因子を欠いている：いわゆる細胞質成熟が不十分である、と推察される。融合卵の問題点は、融合卵由来の胚は透明帯を欠くため、産子生産を目的として成雌ブタ（仮親）の卵管に移植する場合、移植操作にともなう物理的な刺激に耐えられないことである。

(3) 卵の発生能を改善するもうひとつの方法は、ヌードマウスから回収したブタ卵の核または染色体を、ブタ体内で発育した卵に移植し、発生能を持った卵を再構成する（再構築卵）ことである。卵核胞期（GV期）あるいは第二減数分裂中期（MII期）で、胚発生能の低い卵の核または中期核板を、発生能を持った卵の細胞質に移植することで、胚発生率が回復することがマウス[7]およびウシ[8]等で報告されている。また、卵の第一減数分裂では、核が二つに分裂しても、それを囲む細胞質は均等に分割されず、大量の細胞質を持つ細胞（卵）と少量の細胞質を持つ細胞（第一極体）が形成される。マウスでは、核を除いた卵に第一極体を移植することで後代が得られていることから[9]、第一極体は卵と等しいゲノムを有していると考えられる。したがって、GV期の核およびMII期の中期核板に加えて、第一極体も核移植の候補となり得る。再構築卵では透明帯が残っているので、仮親の卵管等への移植にともなう物理的な刺激に耐えられるものと予想される。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに例のない幼若ブタの原始卵胞卵からの次世代作出を実現するために、その必須の前段階として、人為的に発育させたブタ卵を用いた体外生産胚の作出系を開発することを旨とした。具体的には、まず原始卵胞のみを含む幼若期ブタ卵巣をヌードマウスに移植し原始卵胞卵を発育させ、その核あるいは第一極体をブタ体内で発育した卵（胚盤胞への発生能を有する）の細胞質に注入し再構築卵を作製した。次いで、再構築卵に体外受精を行い体外培養系で胚盤胞まで発生させることを試みた。

3. 研究の方法

(1) ブタ体内発育卵を用いた核移植手法の検討

核移植の主な手法として、GV期の核およびMII期の核染色体（中期核板）を移植する二つの手法がある。幼若ブタの卵を用いる前に、屠場で収集したブタ卵巣から採取した卵を用いてブタ卵にどちらの手法が適しているか、を検討した。

卵丘細胞・卵複合体を豚卵巣から採取し、直ちに卵丘細胞を除去しGV期卵とした。一方、卵丘細胞・卵複合体を体外成熟培養に供し、MII期にまで成熟させた卵をMII期卵とした。次いでGV期卵の核（GV期核）あるいはMII期卵の中期核板と第一極体をピエゾマイクロマニピュレーターに取り付けたガラスピペットで吸引・除去し[10]、レシピエント卵とした（図1）。これらの卵の細胞質に、別のGV期またはMII期の卵（ドナー卵）から採取したGV核または中期核板をそれぞれ顕微注入し[10]、GV期またはMII期の再構築卵を作製した（図1）。3時間あたりの再構築卵の作製数を記録した。二種の再構築卵を2時間培養し、形態的に正常な再構築卵を生存卵としてカウントした。それぞれの移植実験は3回ずつ繰り返し行った。

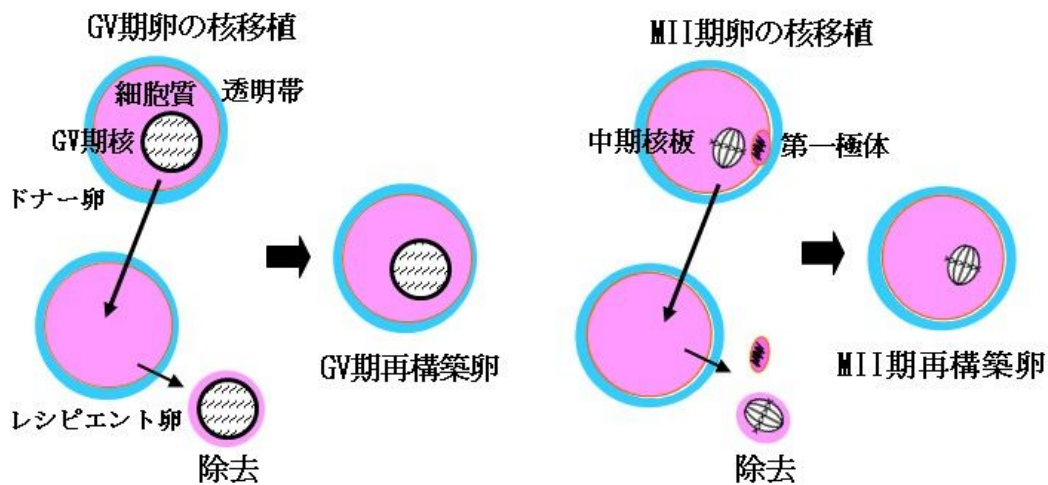


図1. 屠場卵（ブタ体内発育卵）を用いたGV期およびMII期の核移植

(2) 異種間移植と核移植を併用した原始卵胞卵からの胚盤胞発生

前述の(1)の結果から、ブタ卵ではGV期の再構築卵の生存性は、MII期の再構築卵に比較して著しく低いことが明らかとなった(4-(1)参照)。そこで、マウスから回収したブタ発育卵には、中期核板の移植を選択した。加えて、第一極体の移植もあわせて検討した。

まず、原始卵胞（直径約30 μm）のみを含む新生子期のブタ卵巢を細切し、卵巢を摘出したヌードマウスの腎皮膜下にそれぞれ10個ずつ移植した。卵巢移植後120日前後に、マウスに卵胞刺激ホルモン（62.5 U）または妊馬血清性腺刺激ホルモン（4 IU）を投与して移植卵巢内の胞状卵胞の発育を促した[4-6]。移植卵巢を回収し胞状卵胞を切開しブタ卵（胚発生能なし）を採取した。直径が115 μm以上の卵を含んだ卵丘細胞・卵複合体を体外成熟培養に供し、卵をMII期にまで成熟させた。これらの卵をドナー卵として、中期核板および第一極体をピエゾマイクロマニピュレータに取り付けたガラスピペットで吸引した（図2）。一方、屠場で収集したブタ卵巢から卵（ブタ体内発育卵：胚発生能あり）を採取し、体外成熟後に中期核板と第一極体をガラスピペットで除去し、レシピエント卵とした（図2）。レシピエント卵からの中期核板除去の確認については、除去した小片をHoechst 33342でDNAを染色した後、紫外光下で観察し、除去小片がHoechst染色陽性的の場合（DNAが含まれている場合）を除去成功と判定した。次いで、中期核板の除去を確認したレシピエント卵の細胞質に、ドナーである中期核板または第一極体をガラスピペットで注入し、中期核板または第一極体由来の再構築卵を作製した（図2）。理論上は、1つのドナー卵の中期核板と第一極体から2つの再構築卵が作製される。

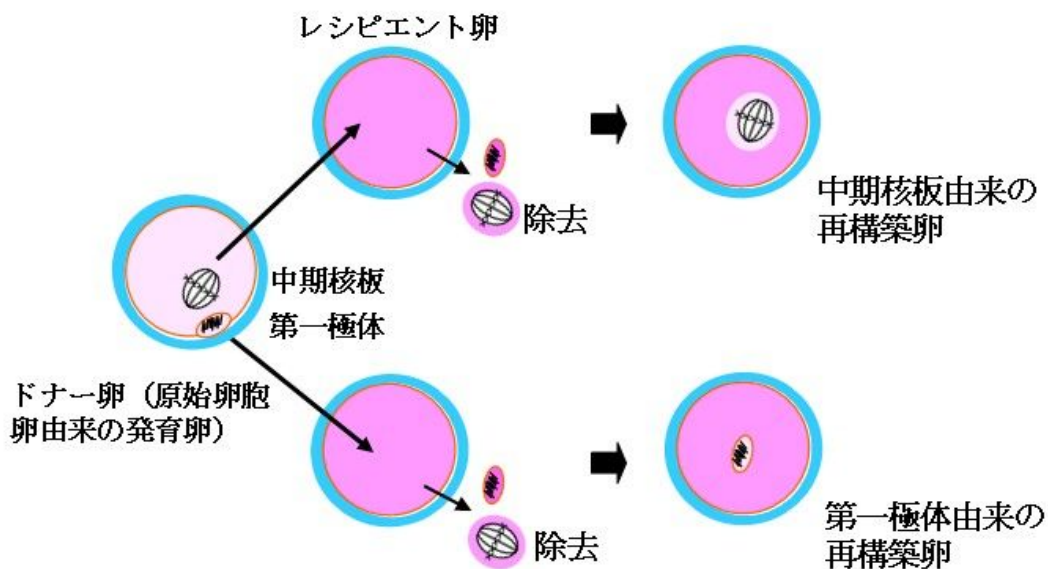


図2. 原始卵胞卵由来の発育卵を用いた中期核板および第一極体の移植

2時間の培養後、正常な形態を示す再構築卵を生存再構築卵として選び、体外受精を行い6日間の体外培養を行い、胚盤胞への発生率および胚の品質（構成細胞数）を調べた。構成細胞数が10個以上で明瞭な胚盤胞腔をもつ胚を胚盤胞とし、細胞数が2~8個で胚盤胞腔の形成までに至っていないものを分割胚と定義した。それぞれの移植実験は3回ずつ繰り返し行った。

4. 研究成果

(1) ブタ体内発育卵を用いた核移植手法の検討

3回の実験の結果、3時間あたりの再構築卵の作製数は、GV期ではMII期の1/3であった(表1)。作製したGV期の再構築卵57個のうち31個が正常な形態を示したことから、生存していると判断した(生存率54%)。一方、MII期再構築卵では、172個のうち152個が生存していると判断された(生存率88%)。これらの結果から、ブタ卵では、GV期に比べてMII期の核移植が容易であり、また作製された再構築卵の生存率も高いことが明らかとなった。このような両期の違いに關与する要因の一つとして、GV期核の体積が大きいため、吸引・注入操作の際にレシピエント卵により大きな物理的なダメージが与えられることが推察される。

表1. GV期およびMII期の再構築卵の作製

核移植の時期	繰り返し	再構築卵の作製数	再構築卵の生存数(%) ^a
GV期	1	15	15
	2	9	9
	3	33	7
	計	57	31 (54)
MII期	1	51	51
	2	61	50
	3	60	51
	計	172	152 (88)

^a 正常な形態の再構築卵の数 / 再構築卵の作成数

(2) 異種間移植と核移植を併用した原始卵胞卵からの胚盤胞発生

1) ヌードマウスからのブタ発育卵の回収

3回の実験を合わせて、ヌードマウスから388個の直径115μm以上のブタ卵が回収され、そのうち体外成熟培養後163個がMII期に移行した(成熟率41%)。これらをドナー卵とした。

2) ブタ体内発育卵(屠場卵)からの中期核板の除去(レシピエント卵の作製)

屠場で採取した卵から体外成熟培養後に中期核板を除去した。除去小片をHoechst 33342で染色した結果(図3)、レシピエント卵からの中期核板の除去は279個中215個で確認された(中期核板の除去率76%)。これらの卵をレシピエント卵として使用した。

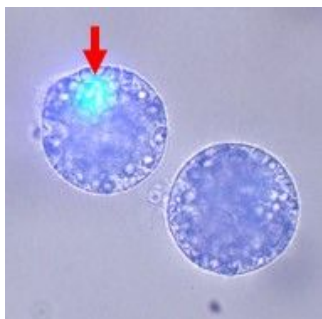


図3. 除去小片のHoechst染色像

左: Hoechst陽性部分を含む(矢印)小片、

右: Hoechst陰性の小片

紫外光落射および可視光で撮影。

3) 中期核板の移植による再構築卵の作製と胚発生能

表2には、中期核板由来の再構築卵の生存率および胚発生能を示した。作製した再構築卵のうち77%が生存していると判断された。生存しているとみなされた再構築卵に体外受精を行った結果、分割胚および胚盤胞の発生率はそれぞれ5%であった。胚盤胞の細胞数は13~56個(図4)(平均29個)であった。以上の結果から、中期核板由来の再構築卵は胚盤胞へ発生する能力を有していることが明らかとなった。

表2. 中期核板由来の再構築卵の発生能

繰り返し	再構築卵の作製数	生存数(%) ^a	体外受精後の発生状況		
			分割胚(%) ^b	胚盤胞(%) ^c	変性卵
1	31	23	0	1	22
2	38	26	1	3	22
3	40	35	3	0	32
計	109	84 (77)	4 (5)	4 (5)	76

^a 正常な形態の再構築卵の数 / 再構築卵の作成数

^b 分割胚の数 / 体外受精を行った再構築卵の数

^c 胚盤胞の数 / 体外受精を行った再構築卵の数

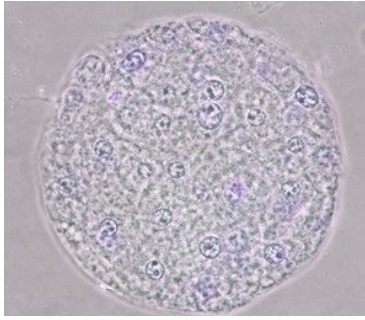


図 4. 中期核板由来の再構築卵から発生した胚盤胞

細胞数: 56。

4) 第一極体の移植による再構築卵の作製と胚発生能

レシピエント卵に第一極体を移植して作成した再構築卵の生存率は96%であった(表3)。体外受精の結果、分割胚および胚盤胞の発生率はそれぞれ11%および8%であった。胚盤胞の細胞数13~36個(図5)(平均26個)であった。このように、第一極体由来の再構築卵は胚盤胞への発生能を有していることが明らかとなった。

表3. 第一極体由来の再構築卵の発生能

繰り返し	再構築卵の 作製数	生存数(%) ^a	体外受精後の発生状況		
			分割胚(%) ^b	胚盤胞(%) ^c	変性卵
1	30	29	3	2	24
2	37	35	4	4	27
3	39	38	4	2	32
計	106	102 (96)	11 (11)	8 (8)	83

^a 正常な形態の再構築卵の数 / 再構築卵の作成数

^b 分割胚の数 / 体外受精を行った再構築卵の数

^c 胚盤胞の数 / 体外受精を行った再構築卵の数



図 5. 第一極体由来の再構築卵から発生した胚盤胞

細胞数: 36。

(3) まとめ

ブタのような大型哺乳動物の原始卵胞卵を遺伝資源として利用する上で最大のネックは、原始卵胞卵に個体発生能を付与する手法が未だに確立されていないことである。大型哺乳動物の卵の発育には数十日間要するため、卵の体外培養系の成功例はない。一方、原始卵胞卵をヌードマウスに移植し適切なホルモン処理を加えることによって、原始卵胞卵を発育させ、受精する能力を付与することは可能である[4, 5]。しかしながら、マウス体内で発育させたブタ卵は、細胞質の成熟が不十分のため胚盤胞へとは発生できない[6]。本研究では、マウスから回収したブタ卵の核あるいは第一極体を、ブタ体内で発育した卵(胚盤胞への発生能を有する)に移植し再構築卵を作製することで、卵細胞質の交換を行った。体外受精の結果、ブタ体内発育卵の細胞質と、マウスから回収したブタ卵の中期核板あるいは第一極体から構成された再構築卵は、いずれも胚盤胞への発生能を有していた。胚盤胞への発生能獲得は個体発生を強く示唆する非常に重要な知見である。今後は、再構築卵を仮親の卵管へ移植して、再構築卵の産子発生能の実証が必要となる。

<引用文献>

Nakai M, Kaneko H, Somfai T, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kikuchi K. Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction* 2010, 139, 331 - 335.

Kaneko H, Kikuchi K, Nakai, M, Somfai, T, Noguchi J, Tanihara F, Kashiwazaki N. Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *PLoS ONE* 2013, 8, e70989.

Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Fuchimoto D, Suzuki S, Sembon S, Onishi A. Establishment of a strain of haemophilia-A pigs by xenografting of foetal testicular tissue from

neonataly moribund cloned pigs. Scientific Reports 2017, 7, 17026.
Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Hosoe M, Akita T. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and in vitro culture. Biology of Reproduction 2003, 69, 1488 - 1493.
Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Maedomari N, Kashiwazaki, N. Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following xenografting to nude mice. Reproduction 2006, 131, 279 - 288.
Kaneko H, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J, Kikuchi K. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. Theriogenology 2013, 80, 887 - 892.
Bai ZD, Liu K, Wang XY. Developmental potential of aged oocyte rescued by nuclear transfer following parthenogenetic activation and in vitro fertilization. Molecular Reproduction and Development 2006, 73, 1448 - 53.
Bao S, Ushijima H, Hirose A, Aono F, Ono Y, Kono T. Development of bovine oocytes reconstructed with a nucleus from growing stage oocytes after fertilization in vitro. Theriogenology 2003, 59, 1231 - 1239.
Wakayama T, Yanagimachi R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. Biology of Reproduction 1998, 59, 100 - 104.
Suzuki S, Iwamoto M, Hashimoto M, Suzuki M, Nakai M, Fuchimoto D, Sembon S, Eguchi-Ogawa T, Uenishi H, Onishi A. Generation and characterization of RAG2 knockout pigs as animal model for severe combined immunodeficiency. Veterinary Immunology and Immunopathology 2016, 178, 37 - 49.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kaneko Hiroyuki, Kikuchi Kazuhiro, Thi Men Nguyen, Noguchi Junko. Developmental ability of oocytes retrieved from Meishan neonatal ovarian tissue grafted into nude mice. Animal Science Journal 査読有 2019, 90, 344 - 352. DOI: 10.1111/asj.13160
Kaneko Hiroyuki, Kikuchi Kazuhiro, Thi Men Nguyen, Noguchi Junko. Embryo production by intracytoplasmic injection of sperm retrieved from Meishan neonatal testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. Animal Science Journal 査読有 2018, 90, 158 - 166. DOI: 10.1111/asj.13138

〔学会発表〕(計1件)

岩元正樹、菊地和弘、矢崎智子、Nguyen Thi Men、金子浩之、ブタ卵子における核置換技術の検討 日本繁殖生物学会 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 菊地 和弘

ローマ字氏名： KIKUCHI Kazuhiro

所属研究機関名： 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名： 生物機能利用研究部門

職名： 主席研究員

研究者番号(8桁)： 20360456

研究分担者氏名： 岩元 正樹

ローマ字氏名： IWAMOTO Masaki

所属研究機関名： プライムテック株式会社

部局名： 先進技術開発チーム

職名： チーム長

研究者番号(8桁)： 20500101

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。