

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580321
 研究課題名(和文) リプログラミング状態の非侵襲的評価系を用いたミニブタ体細胞核移植技術の高度化
 研究課題名(英文) Improvement of somatic cell nuclear transfer techniques in miniature pigs using a noninvasive evaluation system for reprogramming status
 研究代表者
 三好 和睦(MIYOSHI KAZUCHIKA)
 鹿児島大学・農学部・准教授
 研究者番号：70363611

研究成果の概要(和文)：Oct-3/4 遺伝子の発現を指標として体細胞クローン胚のリプログラミング状態を非侵襲的に評価する系を用いて、種々のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（バルプロ酸、スベロイルビスヒドロキサム酸およびスクリプタイド）による処理がミニブタ体細胞クローン胚の効率的生産に有効であることを明らかにした。さらに、スクリプタイド処理を用いて、動脈硬化症の原因遺伝子であるヒトアポリポプロテイン(a) 遺伝子を導入したミニブタ生存産子を作成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：It was indicated that treatment with some histone deacetylase inhibitors, such as valproic acid, suberoyl bishydroxamic acid and scriptaid, is beneficial for the efficient production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos using a noninvasive evaluation system for the reprogramming status of donor nuclei on the basis of Oct-3/4 expression. In addition, an alive transgenic miniature pig expressing human apolipoprotein(a), a risk factor for the development of atherosclerosis, was successfully obtained using treatment with scriptaid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：体細胞クローニング・核移植・リプログラミング・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、医薬品開発における実験動物、病気治療法の確立における疾患モデル動物あるいは移植医療における代替臓器提供動物として有用である。特に鹿児島

大学で開発・維持されているクラウン系ミニブタは、我が国唯一の近交系であることから、これらを上記の分野で活用できるようにすることは、極めて意義深いと考えられる。実験動物、疾患モデル動物あるいは代替臓器提供動物として活用するには、クラウン系ミニ

ブタの遺伝子を改変する必要がある。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。そのためには、クラウン系ミニブタにおける効率的な体細胞核移植技術を確立することが不可欠となる。このような背景から研究代表者らは、超音波による新規の卵子活性化法を開発し、これを用いてクラウン系ミニブタの体細胞クローン動物を作出することに成功したが、その作出効率はわずか1.4%であった。体細胞クローン動物に発生するには、移植されたドナー核の遺伝子発現が、本来の胚発生に沿った発現パターンにリプログラミングされなければならない。よって、このような低い作出効率の原因としては、移植後のドナー核が正しくリプログラミングされていないという可能性が考えられる。

このことから、効率的な体細胞核移植技術を確立するには、ドナー核のリプログラミング状態を判定する方法の開発が必須であるとの結論に達した。最も確実な方法は、クローン胚を仮親に移植して産子への発生能力を調べることであるが、妊娠期間が約4ヶ月のミニブタにおいては結果が出るまでに時間がかかりすぎる。クローン胚を各ステージでサンプリングし、遺伝子発現パターンを分子生物学的に解析することによって判定する試みもなされてきた。しかし、時間と労力がかかるうえに、正しくリプログラミングされていると判定されても、胚自体をサンプリングしてしまうので、判定後にそれらからクローン動物を得ることはできなくなる。そこで研究代表者らは、移植後のドナー核が正しくリプログラミングされていることを迅速、簡便かつ非侵襲的に判定できる系を開発した。その鍵となるのが、Oct-3/4 遺伝子および発光遺伝子である。Oct-3/4 蛋白は転写因子であり、マウス胚ではその発現は発生初期の幹細胞にのみ観察される。また、Oct-3/4 遺伝子のゲノム構造は、種を超えて高度に保存されており、ブタでも初期胚における発現が報告されている。Oct-3/4 は、遺伝子カスケードにおける下流側の幾つかの形態形成関連遺伝子群を支配しているので、クローン胚でのOct-3/4 の異常な発現は、胚発生異常を誘発する。そこで、Oct-3/4 プロモーターに非侵襲的な発光遺伝子である enhanced green fluorescent protein (EGFP) を結合し (pOEIN transgene)、クラウン系ミニブタの体細胞に遺伝子導入した。これらの体細胞をドナーとして核移植に用いた結果、クローン胚における Oct-3/4 プロモーターの機能を EGFP の緑色蛍光によって確認し得ることを明らかにした。また、この EGFP 発現は、内在性 Oct-3/4 遺伝子の発現を反映していることが確認された。よって、この系を用いる

ことにより、ドナー核におけるリプログラミングの成否を早い段階で判定することが可能になると考えられた。

2. 研究の目的

pOEIN transgene 導入クラウン系ミニブタ体細胞を用いて作出したクローン胚のほとんどが、培養5日後の桑実期～初期胚盤胞期にEGFPを発現したが、培養7日後の胚盤胞においてはその発現が失われた。通常の体内発生胚では、後期の胚盤胞期においてもOct-3/4 遺伝子の発現が認められるので、クローン胚のほとんどにおいてドナー核のリプログラミングが不十分であることが示唆された。最近、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸が、マウス体細胞における多能性幹細胞へのリプログラミング効率を100倍以上改善することが報告された。研究代表者らは、バルプロ酸がクラウン系ミニブタ体細胞クローン胚におけるドナー核のリプログラミングを促進するのではないかと考え、バルプロ酸による処理がクローン胚の体外発生およびEGFP発現に及ぼす影響について調べた。その結果、活性化処理後のクローン胚を4mMのバルプロ酸で48時間処理した場合には、胚盤胞形成率が改善されるだけでなく、培養7日後の胚盤胞においてもEGFPの発現が維持されることが示された。このことは、バルプロ酸処理によりドナー核のリプログラミングが正常化されることを示唆し、そのようなクローン胚は仮親に移植後も良好な発生を示すことが期待される。しかしながら、4mMのバルプロ酸で48時間処理した場合においても培養7日後にEGFPを発現している胚盤胞の割合は40.4-58.5%であったので、バルプロ酸処理条件のさらなる最適化が必要であると考えられた。

そこで本研究では、1) 研究代表者らが開発したリプログラミング状態の非侵襲的評価系を用いて、バルプロ酸処理の条件を最適化した。2) バルプロ酸のようなリプログラミング促進効果を示す薬剤を探索し、処理条件を最適化した。3) 最適条件下で薬剤処理したクローン胚を仮親に移植し、産子への発生状況を調べた。

3. 研究の方法

(1) ミニブタ体細胞クローン胚に対するバルプロ酸処理の最適化

クラウン系ミニブタ腎臓細胞に、pOEIN transgene および CAG プロモーターに接続した tdTomato 遺伝子を導入した。これらの遺伝子改変体細胞を用いて作出したクローン胚では、ドナー核が正常にリプログラミングされると未分化細胞特異的な Oct-3/4 プロモーターが作動し、その下流側に位置するEGFPが発現する。また、CAG プロモーターは

ほとんどの細胞で作動するので、得られた胚が単為発生卵ではなく体細胞クローン胚であることを tdTomato の赤色蛍光によって確認できる。

上述したように、研究代表者らが以前に行った研究における最適なバルプロ酸処理の濃度および時間はそれぞれ 4mM および 48 時間であったが、48 時間処理を行えばクローン胚を仮親に戻すタイミングが遅れ、産子への発生が阻害される可能性がある。そこで、得られた遺伝子改変体細胞由来クローン胚を種々の濃度のバルプロ酸で 24 時間処理した後、体外発生状況および培養 7 日後の胚盤胞における EGFP と tdTomato の発現状況を観察した。

(2) ミニブタ体細胞クローン胚のリプログラミング状態を改善し得る薬剤の探索

作出したミニブタ体細胞クローン胚をバルプロ酸と同様のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（スベロイルビスヒドロキサム酸およびスクリプタイド）、リバーシンあるいは 6-プロモインディルビン-3'-オキシムで処理した後に、胚盤胞への体外発生状況を観察した。リバーシンおよび 6-プロモインディルビン-3'-オキシムは、体細胞から幹細胞への脱分化を誘導し得ることが報告されているので、体細胞核のリプログラミングを促進することが期待される。体外発生促進作用が認められた薬剤に関しては、処理濃度および処理時間の最適化を行った。

(3) 最適条件下で薬剤処理したミニブタ体細胞クローン胚の体内発生状況

上記の実験において確立された方法で薬剤処理したミニブタ体細胞クローン胚を発情同期化した仮親の卵管に移植し、産子への発生能について検討した。

4. 研究成果

(1) 活性化処理後のミニブタ体細胞クローン胚を 4~12mM のバルプロ酸で 24 時間処理することにより、無処理区と比較して胚盤胞形成率が有意に高くなった。いずれの濃度のバルプロ酸で処理した場合でも、得られた胚盤胞すべてにおいて tdTomato の発現が見られたことから、これらが体細胞クローン胚であることが確認された。一方、EGFP の発現は、無処理区の胚盤胞においては観察されなかったが、8mM 区ではほとんど (93.3%) の胚盤胞において認められた。このことから、8mM のバルプロ酸で 24 時間処理することにより、クローン胚のリプログラミング状態を改善し得ることが示唆された。研究代表者らが以前に行った研究における最適なバルプロ酸処理の濃度および時間はそれぞれ 4mM および 48 時間であったが、その条件下においても

EGFP を発現している胚盤胞の割合は 40.4-58.5% という低い値にとどまった。よって、より高濃度のバルプロ酸で短時間処理することが、体細胞クローンミニブタの効率的生産につながると考えられた。

(2) 活性化処理後のミニブタ体細胞クローン胚を 50 μ M のスベロイルビスヒドロキサム酸で 16 時間処理した場合にも、胚盤胞形成率の有意な増加が見られた。スクリプタイドを用いた場合には、500nM の濃度で 16 時間処理することにより、胚盤胞形成率を改善し得ることが示された。また、クローン胚を 5 μ M のリバーシンで 12 時間処理することによっても、胚盤胞形成率が改善された。1 μ M の 6-プロモインディルビン-3'-オキシムで 24 時間処理した場合には、クローン胚の胚盤胞形成率には影響が見られなかったものの、胚盤胞の細胞数が有意に増加した。以上の結果から、スベロイルビスヒドロキサム酸、スクリプタイドおよびリバーシンがミニブタ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。また、6-プロモインディルビン-3'-オキシムで処理することにより、多数の細胞を含む質の高い胚盤胞を作出できると示唆された。

(3) スクリプタイドによる処理を行った場合に比較的高い胚盤胞形成率が得られたので、動脈硬化症の原因遺伝子（ヒトアポリポプロテイン (a) 遺伝子）を導入したミニブタ体細胞に由来するクローン胚を 500nM のスクリプタイドで 16 時間処理した後に仮親に移植し、体内発生状況について調べた。3,074 個のクローン胚を 13 頭の仮親に移植した結果、2 頭から 1 頭ずつ産子が得られた。そのうち 1 頭は死産であったが、もう 1 頭は正常に発育している。発育中の産子の遺伝子を解析した結果、ヒトアポリポプロテイン (a) 遺伝子の導入が確認された。以前に研究代表者らがスクリプタイド処理を用いずにヒトアポリポプロテイン (a) 遺伝子導入ミニブタの作出を試みた場合には、得られた産子はいずれも死産あるいは産後直死であった。よって、スクリプタイドはミニブタ体細胞クローン胚の正常な産子への発生を支持し得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

- ① Himaki T, Mizobe Y, Tsuda K, Suetomo M, Yamakuchi H, Miyoshi K, Takao S, Yoshida M. Effect of postactivation treatment with latrunculin A on in vitro and in vivo development of cloned embryos derived from kidney

- fibroblasts of an aged Clawn miniature boar. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有. 58 巻. 2012 年. 398-403 ページ
<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.11-083A>
- ② Himaki T, Watanabe S, Chi H, Yoshida M, Miyoshi K, Sato M. Production of genetically modified porcine blastocysts by somatic cell nuclear transfer: Preliminary results toward production of xenograft-competent miniature pigs. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有. 56 巻. 2010 年. 630-638 ページ
<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.09-227A>
- ③ Himaki T, Yokomine T, Sato M, Takao S, Miyoshi K, Yoshida M. Effects of trichostatin A on in vitro development and transgene function in somatic cell nuclear transfer embryos derived from transgenic Clawn miniature pig cells. *Animal Science Journal*. 査読有. 81 巻. 2010 年. 558-563 ページ
 DOI:10.1111/j.1740-0929.2010.00772.x
- ④ Mizobe Y, Kurino S, Sata Y, Mori H, Yoshida M, Miyoshi K. Stage-specific effects of osmolarity of a culture medium on development of pig oocytes and miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos activated by ultrasound treatment. *Animal Science Journal*. 査読有. 81 巻. 2010 年. 453-460 ページ
 DOI:10.1111/j.1740-0929.2010.00758.x
- ⑤ Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Himaki T, Yoshida M, Sato M. Beneficial effects of reversine on in vitro development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有. 56 巻. 2010 年. 291-296 ページ
<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.09-149A>
- ⑥ Mizobe Y, Yoshida M, Miyoshi K. Enhancement of cytoplasmic maturation of in vitro-matured pig oocytes by mechanical vibration. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有. 56 巻. 2010 年. 285-290 ページ
<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.09-142A>
- ⑦ Himaki T, Mori H, Mizobe Y, Miyoshi K, Sato M, Takao S, Yoshida M. Latrunculin A dramatically improves the developmental capacity of nuclear transfer embryos derived from gene-modified Clawn miniature pig cells. *Cellular Reprogramming*. 査読有. 12 巻. 2010 年. 127-131 ページ
 DOI:10.1089/cell.2009.0066
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 長尾洋三. 成熟培養中の種々の期間における振動がブタ卵丘卵子複合体の膨化および卵子の単為発生に及ぼす影響. 第 116 回日本畜産学会. 2013 年 3 月 30 日. 安田女子大学
- ② 岩田一紘. 可溶性ヒトネクチン-1 発現クラウン系ミニブタクローン作出に関する研究. 第 116 回日本畜産学会. 2013 年 3 月 30 日. 安田女子大学
- ③ 日巻武裕. 電気活性化後のオキサムフラチン添加が遺伝子改変ミニブタ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響. 第 116 回日本畜産学会. 2013 年 3 月 30 日. 安田女子大学
- ④ 児島輝仁. 成熟および発生培養中の振動が電気刺激により活性化したブタ卵子の単為発生に及ぼす影響. 第 115 回日本畜産学会. 2012 年 3 月 28 日. 名古屋大学
- ⑤ 三好和睦. ミニブタ体細胞クローン胚作出技術の高度化. 先進医用ブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト第 2 回公開シンポジウム～ブタの医用動物への展開～. 2012 年 3 月 22 日. 鹿児島大学
- ⑥ 小川純輝. 活性化後のスクリプタイドまたはスベロイルビスヒドロキサム酸処理がミニブタ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響. 第 104 回日本繁殖生物学会. 2011 年 9 月 15 日. いわて県民情報交流センター・アイーナ
- [図書] (計 1 件)
- ① Sato M, Chi H, Miyoshi K. In Tech. Xenotransplantation. Targeted toxin as a useful reagent for enrichment of α -Gal epitope-negative cells used for somatic cell nuclear transfer in pigs. 2012 年. 67-74 ページ
- [産業財産権]
 ○取得状況 (計 1 件)
- 名称: 超音波による卵子またはクローン胚の活性化方法ならびに該方法により活性化したクローン胚からのクローン動物の作出
 発明者: 三好和睦, 吉田光敏
 権利者: 鹿児島大学

種類：特許
番号：特許第 4774514 号
取得年月日：2011 年 7 月 8 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://lms.agri.kagoshima-u.ac.jp/~animal/reproduction/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 和睦 (MIYOSHI KAZUCHIKA)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：70363611

(2) 研究分担者

佐藤 正宏 (SATO MASAHIRO)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発

研究センター・教授

研究者番号：30287099

(3) 連携研究者

吉田 光敏 (YOSHIDA MITSUTOSHI)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：00174954