

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592398

研究課題名(和文)体細胞核移植技術の臨床応用の実現へ向けた系統的・基礎的研究

研究課題名(英文)The systemic and basic study on the clinical application of the nuclear transfer method.

研究代表者

平田 修司(HIRATA, Shuji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：00228785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、将来的な体細胞核移植技術(クローン技術)の臨床応用を展望したものであり、「未熟卵子を体外成熟させ、それを除核し冷凍保存し、必要時に解凍してクローン胚を作出する」という方法論を確立するための系統的・基礎的検討を行うものである。本研究の開始後に研究の推進のためには、体細胞移植胚の初期発生を劇的に改善する必要があることが判明した。そこで、マウスのクローン胚の初期発生に關与する因子を解析したところ、クローン胚の細胞質の動態が重要であり、とくに、ミトコンドリアの動的な分布の変化が key factor であった。本研究の結果、クローン胚の初期発生を改善するための研究戦略を策定することができた。

研究成果の概要(英文)：The final destination of the present study is clinical application of the nuclear transferred embryonal stem (ntES) cells. The systemic and basic study on the "nt" was carried out to establish the methodology; "1) in vitro maturation (IVM) of the immature oocyte, 2) cryopreservation of the enucleated IVM oocyte, and 3) reconstruction of the cloned embryo using the enucleated IVM oocyte and donor nucleus. However, it was indicated that the early development rate of the cloned embryo was very low, and the rate should be improved for further investigation. Therefore, we study the factors related to the development thoroughly. As a result, the dynamics of the cytoplasm of the cloned embryo was important for the development. Further study revealed that the changes in the distribution of the mitochondria were a key factor.

From the present study, the strategy that improve the early development of the cloned embryo was established.

研究分野：生殖生物学

キーワード：体細胞核移植 ドナー体細胞 卵細胞質 ミトコンドリア 初期発生 IVM 凍結保存

1. 研究開始当初の背景

我が国の山中伸弥教授が induced pluripotent cell (iPS 細胞) の樹立して以来、世界的に再生医学の臨床応用への期待が高まっている。現在のところ、再生医療においてソースとして用いることが想定されている細胞は、iPS 細胞ならびに体細胞核移植胚 (体細胞クローン胚) 由来の胚性幹細胞 (nuclear transfer-derived embryonic stem cell; ntES 細胞、クローン ES 細胞) である。このうち、iPS 細胞においては、現段階ではその作成に外来遺伝子の導入が不可欠であるため、導入遺伝子が子孫に伝搬してしまう生殖細胞等の再生のソースには用いることができない。一方、ntES 細胞は、患者自身の体細胞から樹立する ES 細胞であり、作成段階で遺伝子導入を要しないので、生殖細胞等の再生にも用いることが可能である。

しかしながら、ntES 細胞による再生医療を臨床応用しようとする場合、ヒト ntES 細胞の樹立までの過程には様々な問題が存在する。第一に、ヒト ntES 細胞の樹立のために必要な未受精卵ならびに体細胞の準備である。現状では、実験動物における体細胞核移植胚の発生率は受精卵に比して低く、ntES 細胞の樹立率もかなり低いため、ヒトにおいても多数の未受精卵を必要とする。また、核のドナーに用いる体細胞は、非侵襲的に採取でき、かつ、体細胞核移植胚としたときに高い発生率が得られる細胞が望ましいが、どの細胞が適当であるかの検討は行われていない。第二は、ヒトの体細胞核移植胚の発生率は極めて低いため、将来的な臨床応用を展望すれば、体細胞核移植胚の発生率をはるかに改善する必要がある。第三には、倫理的問題ならびに社会的問題の解決である。ヒト ntES 細胞を樹立のために体細胞核移植胚由来の胚盤胞の破壊をせざるを得ないことについて、ひろく社会的な理解を得る努力を継続的に行う必要がある。

以上のような背景が研究当初にあったが、この背景については現段階でも基本的に変化はない。

2. 研究の目的

本研究は、ntES 細胞を将来的にヒトの再生医療に応用することを展望し、そのために必要な技術的諸問題を系統的かつ基礎的に検討しようとするものである。

本研究での将来的に展望は以下のとおりである。(1) 卵子のソースとして手術時に得られる卵巣から採取する未熟卵子を用いる。この未熟卵子を体外成熟 (in vitro maturation; IVM) させて、MII 卵とする。(2) IVM により得られた MII 卵から紡錘体

を除去(「除核」)した後に、液体窒素中で凍結保存する。(3) 必要時にこの除核 MII 卵を解凍し、体細胞核移植に供する。

この各段階についての技術開発を目的として、マウスを被検動物として、(1) 未熟卵子の体外成熟 (IVM) による体細胞核移植用の未受精卵の作出に関する研究、(2) 除核未受精卵の凍結保存に関する研究、ならびに、(3) 体細胞核移植胚の初期発生の飛躍的改善に関する研究、を行う。

3. 研究の方法

(1) 未熟卵子の体外成熟 (IVM)に関する研究

マウス卵巣より卵核胞期 (GV 期) 卵を単離し、成熟培養を行って第二減数分裂中期 (MII 期) まで成熟させる。培養条件 (培養液、添加生理活性物質、培養時間) を詳細に検討し、体外成熟 MII 期卵が、体内で成熟した MII 期卵と遜色のない細胞質機能を有するような条件を見出す。

(2) 除核未受精卵の凍結保存に関する研究

将来的にヒトの ntES 細胞を研究や臨床に 応用しようとするとき、多数の未受精卵が必要となる。除核した未受精卵の凍結保存は、半永久的に未受精卵の保存が可能であり、また、核を除去して保存するため、卵子提供者の抱く遺伝情報の不正利用への危惧を払拭できる。この項の研究では、凍結ならびに解凍の条件を詳細に検討し、凍結-保存-解凍した除核未受精卵を用いた体細胞核移植胚において、非凍結卵子を用いた場合と同等の初期発生率・産仔獲得率が得られるような条件を確定する。

(3) 体細胞核移植胚の初期発生の飛躍的改善に関する研究

現状の体細胞核移植胚の初期発生率は未だ低く、前述の (1) ~ (2) 項の研究目標が達成されたとしても、体細胞核移植技術のヒトへの応用は極めて困難である。研究代表者らの予備的研究で、histone deacetylase inhibitor (HDACi) の一つである Sirinol がマウス体細胞核移植胚の初期発生を改善することを確認しており、その他の HDACi ならびに様々なエピジェネーシス調節・修飾因子について、同胚の初期発生を飛躍的に改善する条件を検索するとともに、前述の様々な薬物を胚発生の初期に作用させることの安全性について徹底的な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 未熟卵子の体外成熟 (IVM)に関する研究

成熟培養の諸条件を検討した結果、培養体外成熟 MII 期卵を用いてクローン胚を作出し、さらに、それから ntES 細胞を単離することに成功した。ただし、体外成熟 MII 期卵を用いた場合のクローン胚の樹立率は、体内で成熟した MII 期卵に比して極めて低率であった。

(2) 除核未受精卵子の凍結保存に関する研究

凍結ならびに解凍の条件を詳細に検討し、除核未受精卵子を「シャーレ法」と命名した方法によって凍結-保存-解凍したところ、これを用いた体細胞核移植胚において、初期発生が可能であることを明らかにした。また、さらに、それから産仔を獲得することにも成功した。ただし、凍結-保存-解凍した除核未受精卵子を用いた場合、MII 期卵に比して産仔獲得率は 1/10 程度であり、この率の改善は困難であった。

(3) 体細胞核移植胚の初期発生の飛躍的改善に関する研究

体細胞核移植胚の培養段階で、histone deacetylase inhibitor (HDACi) である TSA (既報) を加えたところ、発生率が 2-3 倍に改善した。他の HDACi についても検討を行ったが、sirinol でやや改善を認めただけ以外に有意に改善をきたす薬物は同定できなかった。

4) 以上の成績に基づいて、本研究の当初の目的に肉薄するためには、体細胞核移植胚の初期発生を阻害している因子を同定し、それを除去することが今後の研究の展開にとって必須であると考えた。

そこで、まず、凍結融解卵子ならびに in vitro aged 卵子について紡錘体移植法 (metaphase II spindle injection; MESI) によって核の機能ならびに細胞質の機能それぞれを独立に検討した。その結果、凍結融解卵子ならびに in vitro aged 卵子の双方とも、核の機能に比して細胞質機能が著しく低下していることが明らかになった。

さらに、この細胞質機能の調節因子を同定する目的で、ミトコンドリアの動態の研究を行った。その結果、通常の MII 期卵においては、紡錘体周囲にミトコンドリアが分布し、それが発生と共に分布が変化するので、凍結融解卵子ならびに in vitro aged 卵子においてはこの動的な変化が認められなかった。

5) これらの本研究の成績から、将来的に、

「手術時に得られる卵巣から採取した未熟卵子を体外成熟させ、得られた IVM-MII 期を除核した後に凍結保存し、必要時にこの除核 MII 卵を解凍し、体細胞核移植に供する」という筋書きは、技術的に実行可能であることが明らかになった。しかしながら、現状の体細胞核移植胚の初期発生の状況では、相当数の卵子が必要になり、現段階ではヒトに応用する技術水準であると到底いえないことも明らかになった。

この点、細胞質機能、とくにミトコンドリアの細胞質内の動的な分布の変化を調節する因子が同定できれば、体細胞核移植胚の初期発生を劇的に改善し得る可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) 深澤 宏子, 岡本 遼太, 平田 修司: MII 卵紡錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンドリア分布についての検討. 日産婦誌 67 (2): 728, 2015. (査読有)

2) 小川 達之, 深澤 宏子, 平田 修司: Metaphase II spindle injection (MESI) による 1-day-old 卵の発生能改善の試み. 日産婦誌 66 (2): 449, 2014. (査読有)

3) 深澤 宏子, 正田 朋子, 平田 修司: MII 卵紡錘体移植における細胞質持ち込み量の検討. 日産婦誌 66 (2): 858, 2014. (査読有)

4) 深澤 宏子, 平田 修司: 体外成熟卵を用いて作出した体細胞核移植胚由来の ES 様細胞の特性解析. 日産婦誌 65 (2): 519, 2013. (査読有)

5) 深澤 宏子, 下地 彩乃, 平田 修司: 体外成熟卵を用いた ntES 細胞の作出. 日産婦誌 64 (2): 508, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 深澤 宏子: MII 卵紡錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンドリア分布についての検討. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2015 年 4 月, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.

2) 小川 達之: Metaphase II spindle injection (MESI) による 1-day-old 卵の発生能改善の試み. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2014 年 4 月, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区.

3) 深澤 宏子: MII 卵紡錘体移植における細胞質持ち込み量の検討. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2014 年 4 月, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区.

4) 深澤 宏子: 体外成熟卵を用いて作出した体細胞核移植胚由来の ES 様細胞の特性解析. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2013 年 5 月, ロイトン札幌, 北海道札幌市.

5) 深澤 宏子: 体外成熟卵を用いた ntES 細胞の作出. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2013 年 5 月, ロイトン札幌, 北海道札幌市.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平田 修司 (HIRATA Shuji)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号 : 00228785

(2)研究分担者

深澤 宏子 (FUKASAWA Hiroko)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号 : 60362068

正田 朋子 (SHODA Tomoko)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号 : 50345716