

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700443

研究課題名(和文) マーモセット未成長卵子への遺伝子導入・卵巣注入によるトランスジェニック卵子の作出

研究課題名(英文) Production of transgenic oocytes in marmoset monkeys

研究代表者

本橋 秀之 (Motohashi, Hideyuki)

岡山大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：20554380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)： マーモセット卵巣組織から未成長卵子を分離し、in vitro遺伝子導入卵子の作出が可能か検討するとともに、卵巣組織のガラス化保存の検討を行った。卵巣解離細胞の体外培養において最大で3週間の生存が認められた。その間、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入によりGFP蛍光を示す未成長卵子が観察された。卵巣組織凍結保存においては、融解後は凍結前の形態を保持し、卵子の生存性も認められた。コメットアッセイならびに組織学的検査においては有意差は認められなかった。電顕観察においては、初期卵胞において非凍結組織の卵胞卵子に匹敵する像が観察された。本研究は非ヒト霊長類の新しい発生工学の展開の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： In this study, the gene transfer to non-growing oocytes in vitro and the ovarian tissue cryopreservation were carried out in ovaries of common Marmoset (*Callithrix jacchus*) that is a non-human primate. The non-growing oocytes survived for 3 weeks at most. During the time, the non-growing oocytes expressed the GFP fluorescence were found following gene transfer using a lentivirus vector. In ovarian tissue cryopreservation, the tissue after warming maintained the morphology before cryodamage parameters. The TEM analysis revealed the morphology equivalent to fresh ovaries in the vitrified/warmed ovaries. This study showed novel possibility of developmental biotechnology in a non-human primate.

研究分野：生殖工学

キーワード：マーモセット

1. 研究開始当初の背景

コモン・マーモセットは小型(350g 前後)でサル類実験動物の中では比較的繁殖効率が高く(Mansfield et al., Comp Med, 2003),近年では受精卵への遺伝子導入による GFP トランスジェニック個体の作出が報告されている(Sasaki et al., Nature, 2009). しかしながら, サル類における受精卵経由法は, 報告があるマーモセットであってもその効率から計算すると, 採卵用・採精用, レシピエント用およびそれらにあてがうペア個体をはじめとする多数の個体群(母集団)を維持し続けなければならず, 疾患モデル等の遺伝子改変動物を作出するためには効率が悪かった. 実際, 受精卵経由の疾患モデル作製のために常時 100 頭以上の個体を維持しなければならない.

2. 研究の目的

哺乳類の卵巣内には大量の未成長卵子が原始卵胞の形で存在するが, 生涯の内に排卵まで至る卵子の総数はその一部に過ぎず, 大半は成長することなく終わる. したがって, バイオプシーした卵巣組織から多数の未成長卵子を分離し, 非分裂細胞への遺伝子導入が可能であるレンチウイルスベクターにて遺伝子導入を行ったのち(Pfeifer et al., Methods Enzymol, 2010; Nakagawa and Hoogenraad, Methods Mol Biol, 2011), 原始卵胞を枯渇させた卵巣内に注入して戻し, *in vivo* 発育にて最終的にトランスジェニック卵子を作出できれば, 簡便な疾患モデル作出法として強力なツールとなり得る.

また, 本システムの確立のためには, 未成長卵子保存の目的からバイオプシーした卵巣組織の安定的な凍結保存法の確立が必須である. しかしながら, コモン・マーモセット卵巣における凍結保存法は確立されていないかった.

そこで本研究では, マーモセット卵巣組

織から未成長卵子を分離し, *in vitro* 遺伝子導入卵子の作出が可能か検討するとともに, 卵巣組織のガラス化保存の検討を行った.

3. 研究の方法

(1) マーモセット成熟雌卵巣組織を採取後, two-step enzymatic digestion (Nagano et al., Tissue Cell, 1998)により細胞を解離した. 未成長卵子の培養は予備検討から確定した培養法を採用した. 具体的には, 10%ES-Qualified FBS, LIF, GDNF, bFGF, 2-ME, NEAA(Zou et al., Nat Cell Biol, 2009)および SCF(Packer et al., Dev Biol, 1994; Klinger and De Felici, Dev Biol, 2002), Y-27632 (Watanabe et al., Nat Biotechnol, 2007)添加 MEM 中, 37 °C, 5-5-90gas の温度・気相下で 遺伝子導入のための 2-30 日間の体外培養を行った.

遺伝子導入は緑色蛍光マーカー遺伝子である GFP 発現カセットを組み込んだレンチウイルスベクター (LV-CMV-CopGFP または, LV-CMV-Venus)により行い, 遺伝子導入および蛍光の発現を確認した.

(2) 採取したマーモセット卵巣組織片を前平衡後, 15%EG, 15%DMSO, 0.5M Sucrose を含むガラス化液に浸漬し, Cryotop を用いて保存を行った. 融解後の組織は, 組織学的観察, Comet Assay によるゲノム DNA 損傷度の調査, 一部は透過型電顕 (TEM) 観察を行って, 本ガラス化保存法の有効性を評価した.

4. 研究成果

(1) 未成長卵子を含む解離卵巣細胞の体外培養において, 未成長卵子は最大 3 週間前後の培養維持が可能であった. 培養期間の延長と共に未成長卵子の数は減少した. CMV-Venus 発現カセットを組み込んだレンチウイルスベクターにより遺伝子導入を

行ったところ, 導入後5-7日で緑色蛍光の発現が認められ, ゲノムへのインテグレーションが確認された (Fig.1). 以上のことから, コモンマーモセット由来の未成熟卵子は, 少なくとも一定期間の培養維持が可能なこと, そしてその間に遺伝子導入が可能であることが明らかとなった.

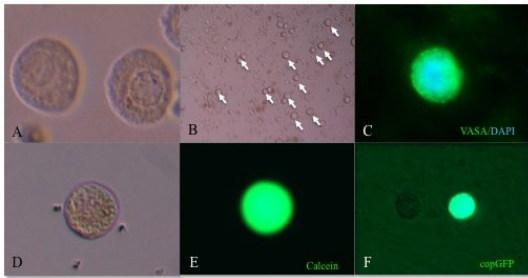


Fig. 1 . Ovarian cell culture and gene transduction of primordial oocytes in marmoset. (A) Primordial oocytes isolated from ovaries. (B) Cultured ovarian cells on day 4. Arrows: primordial oocytes. (C) Merged image of VASA immunofluorescence and DAPI staining. (D, E) Calcein-staining on 14day of culture. Transmitted light (D) and fluorescence (E) image. (F) On day 24 of culture. The oocyte (right) shows the copGFP fluorescence.

(2)凍結融解後の卵巣組織は凍結前の形態を保持し, 融解後に分離した卵母細胞の生存性が認められた.

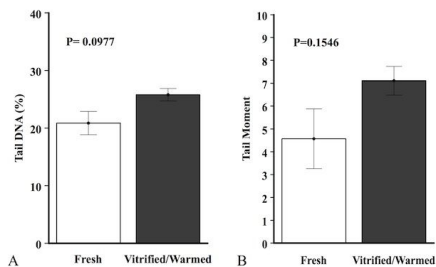


Fig. 2. The effect of vitrification/warming on comet assay parameters of ovarian cells. (A)

The percentages of tail DNA. (B) The tail moment parameter.

Comet Parameter である %Tail DNA は非凍結組織において上昇傾向が見られたが有意差は認められなかった (20.9±2.0% vs 25.8±1.1%, P=0.0977). また, Tail moment のパラメータも同様に差は認められなかった (Fig.2). さらに, 単位面積当たりの正常形態卵子数においても有意な差は認められなかった.

電顕観察の結果, 非凍結組織の卵胞卵子に匹敵する像が観察された. 一方, 胞状卵胞内卵子では凍結融解による影響と推察される膨張した ER が認められ, 胞状卵胞内卵子の凍結保存には不向きであること, さらに保存に有効なステージは原始卵胞から 2次卵胞程度までであることが明らかとなった (Fig.3).

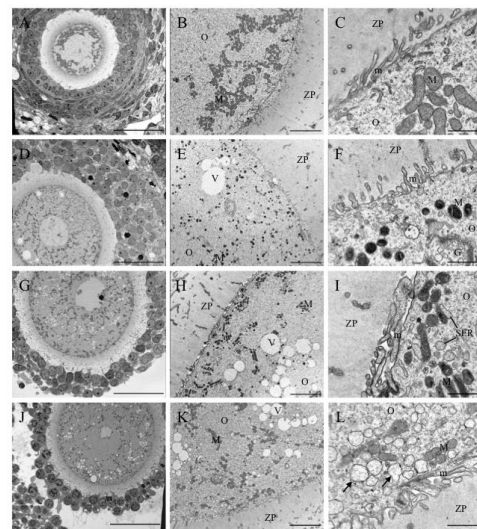


Fig.3. Transmission electron microscopy of nonvitrified and vitrified/warmed ovarian tissue in pubertal marmoset. Preantral follicles and their

corresponding oocytes in nonvitrified (A-C) and vitrified/warmed (D-F) ovarian tissue. Antral follicles and their corresponding oocytes in nonvitrified (G-I) and vitrified/warmed (J-L) ovarian tissue. Arrows in (L): membrane-coated electron-transparent vesicles (Ghetler et al., Fertil Steril, 2006). O: ooplasm, ZP: zona pellucida, M: mitochondria, m: microvilli, V: large vacuoles, G: golgi complex, SER: smooth endoplasmic reticulum. Scale bars: (A,D,G) 50mm, (B, E, H) 5mm, (C, F, I) 1mm.

以上の結果から，本研究は非ヒト霊長類の新しい発生工学の展開の可能性を示した．さらに研究を進めることにより，遺伝子改変による疾患モデル作出の新しい手法となりうると考えられる．なお，本研究の成果により，3件の学会発表を行うことが出来た．さらに学術論文については，2015年5月現在投稿中である．

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

本橋秀之，岡田浩典，岡田尚巳，石橋英俊：非ヒト霊長類における卵巣ガラス化保存および未成長卵母細胞の体外培養，第57回日本生殖医学会，P-329，2012年11月8-9日，長崎ブリックホール(長崎県)。

本橋秀之，岡田浩典，岡田尚巳，石橋英俊：マーモセット卵巣組織凍結保存および未成長卵母細胞への遺伝子導入．第105回日本繁殖生物学会，P-136，2012年9月7日，筑波大学(茨城県)。

本橋秀之，石橋英俊：非ヒト霊長類をモデ

ルとした卵巣組織凍結保存：第29回日本ヒト細胞学会，O4-3，2011年8月21日，パレブラン高志会館(富山県)。

6．研究組織

(1)研究代表者

本橋 秀之 (MOTOHASHI HIDEYUKI)

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・研究員 (H24 H25)

岡山大学生殖補助医療技術教育研究センター・助教 (H25 H26)

研究者番号：20554380