

マウス体細胞核移植胚における転写因子 Cdx2 ならびに Oct3/4 の発現解析

西 脇 恵¹、三 谷 匡²、安 齋 政 幸²、加 藤 博 己²、
松 本 和 也^{1,2}、佐 伯 和 弘^{1,2}、細 井 美 彦^{1,2}、入 谷 明^{1,2}

要 約

体細胞核移植 (somatic cell nuclear transfer: SCNT) 技術は、1997 年の Wakayama らによる報告以来、様々な動物種においてクローン個体の作出を実現してきたが、その作出効率は未だに低率である。マウスにおいては、核移植胚のおよそ半分は着床するが、出生まで至るものはきわめて少ない。着床の成立と維持における胚側の要素として、栄養外胚葉系譜への分化は必須の過程であるが、最近、マウス栄養芽細胞で転写因子、Caudal-related homeobox 2 (Cdx2) が発現し、栄養外胚葉系譜の誘導で重要な役割を果たしていることが報告された。さらに、Cdx2 は、初期胚発生過程で Oct3/4 と互いに制御関係にあることが示された。そこで本研究では、着床、胎盤形成の基点となる栄養外胚葉で発現する Cdx2 に着目し、Cdx2 とその制御関係にある Oct3/4 について、マウス SCNT 胚と顕微授精 (ICSI) 胚での発現解析を行った。その結果、SCNT 胚において、Cdx2 は発現しているものの、ICSI 胚に比べ転写量は約半分と低かった。このことから、Cdx2 の発現の低下が、その後の栄養外胚葉系譜での遺伝子発現に影響し、着床の成立と維持に障害をもたらしている可能性が示唆された。

緒 言

現在までに、ヒツジを初めとし様々な動物種の体細胞や幹細胞を用いたクローン動物の作出は多くの成功例が報告されている [1-10]。しかし、動物種、作製方法に係らず、その成功率は 2-10% と非常に低率であり、この根本的な原因は未だ解明されていない。さらに、体細胞クローン個体では、高率に様々な異常を伴うことが報告されている [11-14]。しかし、そうした異常を示す個体においても、通常の交配によって産仔を得ることができ、その異常が次世代では認められないことから、クローン個体でみられる異常の多くは、エピジェネティックな修飾に起因すると考えられている。

実際には、体細胞核移植 (SCNT) 胚のほとんどは発生初期に停止し、胚盤胞期胚にまで発生した胚でも、着床前後で急激に脱落し死滅する。この着床の成立と維持の開始においては、胚側の要素として栄養外胚葉系譜への分化が必須である。胎盤を構成する胚側の主な細胞は栄養膜細胞であり、栄養膜細胞は、胚盤胞期に形成される栄養外胚葉に由来し、体細胞を構成する内部細胞塊 (ICM) を取り囲む細胞として、発生の最も初期に分化する細胞である。着床後に胚盤胞では、ICM に接する部分の栄養外胚葉が増殖し、胚体外外胚葉、外胎盤錐・栄養膜巨細胞へと分化する。

これまでに、個体の作出率向上のために、Dimethylsulfoxide (DMSO) の添加 [15] や、クローン胚同士のアグリゲーションキメラ [16]、Trichostatin A (TSA) の添加 [17] など様々な方法が試みられてきたが、着床・胎盤形成に関わる改善は認められない。最近、マウス栄養外胚葉で転写因子、Caudal-related homeobox 2 (Cdx2) が発現していることが報告された [18]。また、Cdx2 は Oct3/4 と相互作用し、それぞれの転写抑制を行っていることも報告されている [19]。

そこで本研究では、マウス SCNT 胚において、着床の開始と維持のために必要な栄養外胚葉系譜細胞への分化過程に着目し、まずその基点となる栄養外胚葉で発現する Cdx2 とさらに ICM で発現する Oct3/4 の発現解析を行った。

材料および方法

動物

核移植に供するレシピエント卵子は、成熟週齢の B6D2F1 (C57BL/6N×DBA/2N) の雌マウス (日本エスエルシー (株)) より回収した。ドナー細胞には卵丘細胞を用い、成熟週齢の B6C3F1 (C57BL/6×C3H/He) 雌マウス (日本チャールスリバー (株)) より回収した。胚移植に供する受胚雌には精管結紮した同系統の雄と交配した MCH (ICR) (日本クレア (株)) を用いた。

顕微授精 (ICSI) には、成熟週齢の B6C3F1 (C57BL/6×C3H/He) 雌マウス (日本チャールスリバー (株)) より回収した卵子と同系統の雄マウスより回収した精巣上体精子を用いた。

なお、本実験に際して、実験の立案や実験動物に関わる取り扱いについては、近畿大学先端技術総合研究所動物実験の指針に準じて実施した。

核移植ならびに顕微授精

SCNT 操作は、常法に従って行った [2]。過剰排卵処理を行った B6D2F1 雌マウス卵管膨大部より卵子を回収し、0.1% ヒアルロニダーゼ中に静置することで卵丘細胞の除去を行った。卵子の除核には、微分干涉倒立顕微鏡にピエゾインパクトユニットを取り付けた、圧電的に駆動されたマイクロピペットで吸引して行なった。ドナー細胞には、同じく過剰排卵処理を行った Crj:B6C3F1 雌マウスから卵丘細胞を回収し細胞注入操作に用いた。ドナー細胞注入後、約 1 時間培養した卵子を倒立顕微鏡下で検鏡し、早期染色体凝集を起こした核移植卵を、Ca²⁺ 不含有 mCZB 培地に 10mM Sr⁺、5 μg/ml サイトカラシン B を添加した培地で 3 時間培養し活性化処理を行い、続いて mCZB 培地に 5 μg/ml サイトカラシン B を添加した培地で 3 時間培養を行った。活性化処理後の卵子は、mkSOM 培地中で、37℃、5%CO₂ の気相下で胚盤胞期 (96 時間) まで培養し、一部の胚は 2 細胞期で偽妊娠 0.5 日の受胚雌へ卵管移植した。

対照区として顕微授精 (ICSI) 卵を用いた。卵子は、過剰排卵処理を行った B6C3F1 雌マウス卵管膨大部より回収し、0.1% ヒアルロニダーゼ中に静置することで卵丘細胞の除去を行った。精子は、B6C3F1 雄マウスから精巣上体精子を回収し、超音波処理によって精子頭部と精子尾部に切断し、精子頭部を精子注入操作に用いた。精子注入後、卵子は、mkSOM 培地中、37℃、5%CO₂ の気相下で胚盤胞期 (96 時間) まで培養した。

胚の免疫染色操作

胚の染色は、8 細胞期胚 (54 時間)、初期桑実期胚 (60 時間)、後期桑実期胚 (72 時間)、胚盤胞期胚 (96 時間) で染色をおこなった。胚は 4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 (SIGMA Cat#T-8787) を用い透過処理を行った。一次抗体には、anti-Cdx2 mouse monoclonal IgG, 1:50 (Bio Genex, Anti-CDX-2 [CDX2-88])、anti-Oct3/4 rabbit polyclonal IgG, 1:50 (Santa Cruz Biotechnology) を、二次抗体には、goat anti-mouse IgG-FITC, 1:100 (Santa Cruz Biotechnology)、donkey anti-rabbit IgG-R, 1:100 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて染色を行った。

Real-time PCR

胚 10 個 /1 tube としてサンプリングし、total-RNA を抽出し (QuickPrep Micro mRNA Purification Kit: GE ヘルスケア, 27-9255-01)、DNase I 処理を行った後、逆転写反応 (SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green : Invitrogen, 11735-032) を行った。胚 1 個相当を 1 反応として Real-time PCR (Real-time PCR system 7300 : ABI) に供した。Cdx2 のプライマーは、Perfect Real Time サポートシステム (<http://www.takara-bio.co.jp/prt/intro.htm>) にて設計した。Cdx2 は Mus musculus Caudal-type homeobox 2 (Cdx2), mRNA (TAKARA Primer Set ID: MA024944) を使用した。Oct3/4 のプライマーは、ABI カスタムメイド (<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/home/index.jsp>) にて設計した。統計解析にはスチューデント t 検定を用いた。

結 果

1. SCNT 胚の発生能および産仔への発生能の検討

SCNT 胚の核移植操作後の前核様構造形成と 2 細胞期への第 1 卵割について検討した (表 1)。核移植操作による生存率は 68% (494/717) であり、活性化処理後の再構築胚の前核様構造形成率は 90% (446/494)、2 細胞期胚への発生率は 92% (411/446) であった。

次に、SCNT 胚の 2 細胞期から胚盤胞期までの発生能について検討した (表 2)。2 細胞期胚からの発生率は時間とともに低下し (4 細胞期胚; 77% (202/259)、桑実期胚; 53% (139/259))、活性化処理後 96 時間での胚盤胞期胚への発生率は 30% (80/259) であった。

核移植後、2 細胞期胚へと発生した SCNT 胚の一部は、産仔への発生能を検討するために、偽妊娠雌マウスへの卵管移植を行なった (表 3)。12 匹の受胎雌に移植後、3 匹 (25%) に着床が確認された。13 個 (8%) の着床痕が認められ、生存 SCNT 産仔が 2 匹 (1.3%) 得られた (図 1b)。しかし、1 匹は出生直後に死亡し、離乳産仔は 1 匹 (0.7%) であった。

表 1. マウス SCNT 胚の 2 細胞期胚への発生 (%)

細胞注入 供試卵子数 ^a	生存卵子数 ^b	前核様構造 形成卵子数 ^c	2細胞期胚 ^d
717	494 (68) ^e	446 (90) ^f	411 (92) ^g
前核様構造形成; 活性化処理後6時間 2細胞期胚への発生; 活性化処理後24時間			e=b/a f=c/b g=d/c

表 2. マウス SCNT 胚の 2 細胞期胚から胚盤胞期胚への発生 (%)

2細胞期胚 (供試卵数)	4細胞期胚	桑実期胚	胚盤胞期胚
259	202 (77)	139 (53)	80 (30)
2細胞期胚への発生 ; 活性化処理後24時間 4細胞期胚への発生 ; 活性化処理後48時間 桑実期胚への発生 ; 活性化処理後72時間 胚盤胞期胚への発生 ; 活性化処理後96時間			

表 3. マウス SCNT 胚の産仔への発生 (%)

移植 供試胚数	移植受胚雌数	妊娠受胚雌数	着床痕数	産仔数	離乳匹数
152	12	3 (25)	13 (8)	2 (1.3)	1 (0.7)

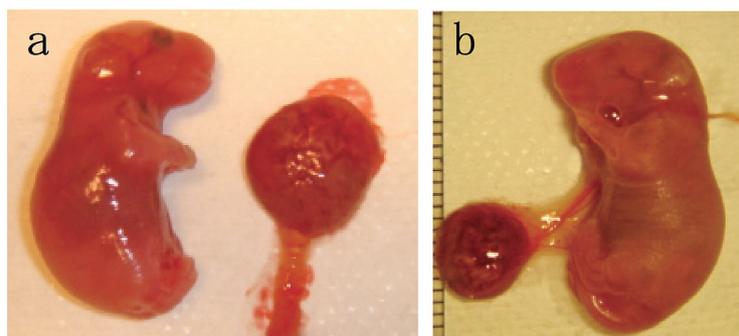


図 1. 卵丘細胞由来 SCNT 胚における産仔
 (a) SCNT クローン胎仔と胎盤
 (b) ICSI 胚由来胎仔と胎盤

2. SCNT 胚および ICSI 胚における免疫組織学的解析

SCNT 胚および ICSI 胚における Cdx2 ならびに Oct3/4 の発現と局在について、免疫組織学的解析を行なった (図 2)。Cdx2 の発現については、対照区として用いた ICSI 胚では、8 細胞期胚から部分的に Cdx2 の発現が確認された (b)。初期桑実胚 (f) では、すべての割球で Cdx2 の発現が確認され、後期桑実胚 (j) では、Cdx2 の発現部位が外側の割球に局在しているのが観察された。さらに胚盤胞期胚 (n) では、ICM を取り囲む栄養芽細胞でのみ Cdx2 が発現していた。一方、SCNT 胚では、初期桑実胚 (f')、後期桑実胚 (j')、胚盤胞期胚 (n') では、ICSI 胚と同様の発現と局在が見られたが、8 細胞期胚 (b') では、Cdx2 の発現が観察されなかった。

Oct3/4 の発現については、8 細胞期胚 (c, c')、初期桑実期胚 (g, g')、後期桑実期胚 (k, k') において、ICSI 胚と SCNT 胚で顕著な差は認められなかったが、胚盤胞期胚において、ICSI 胚 (o) では、ICM に局限しているのに対し、SCNT 胚 (o') では、一部の栄養芽細胞で異所的な発現が観察された。

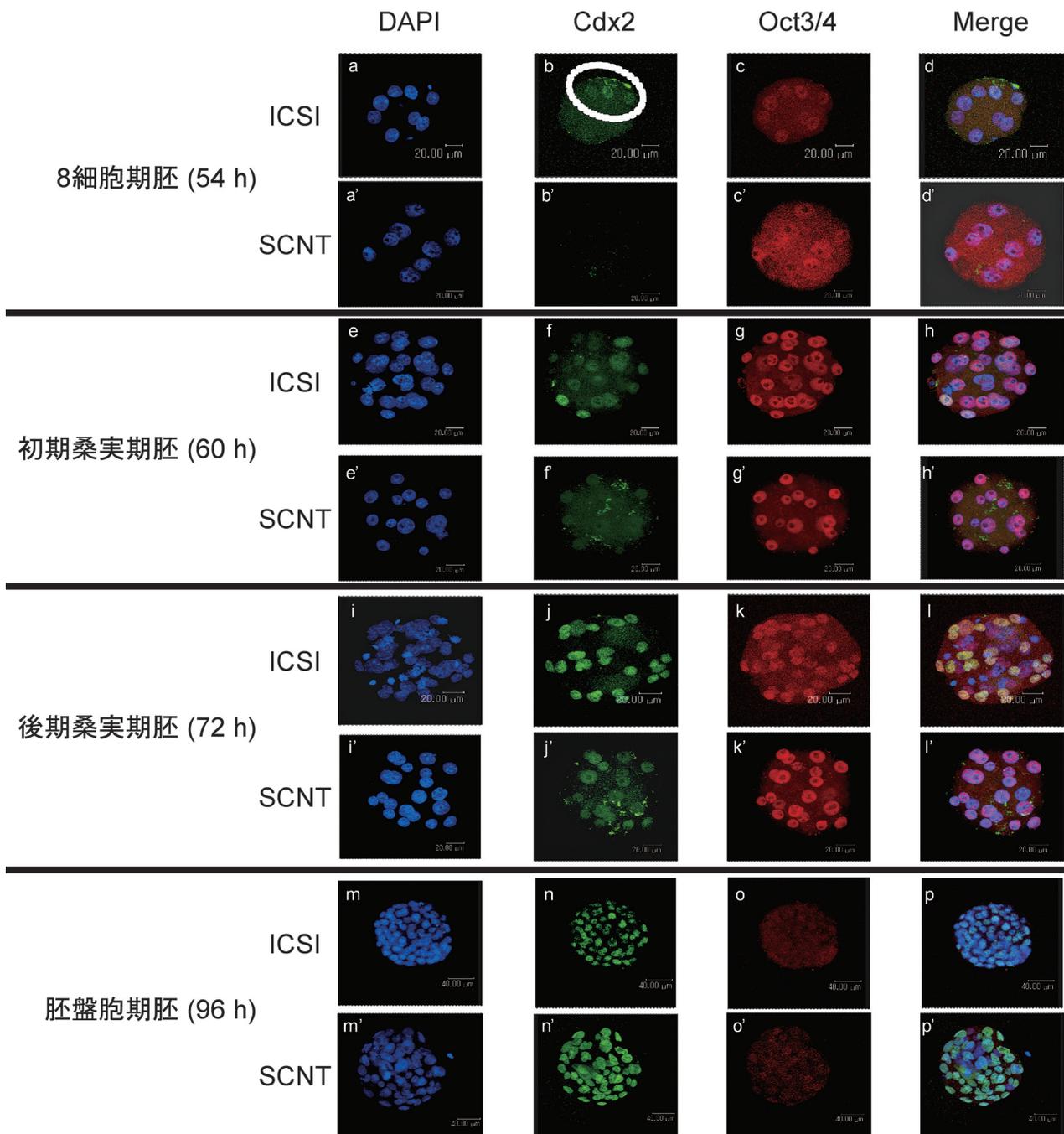


図2. SCNT 胚および ICSI 胚における免疫組織学的解析像 (×630)

SCNT 胚および ICSI 胚において、Cdx2 ならびに Oct3/4 の免疫抗体染色を行った。ICSI 胚 (a-p)、SCNT 胚 (a'-p')、8 細胞期胚 (a-d, a'-d')、初期桑実胚 (e-h, e'-h')、後期桑実胚 (i-l, i'-l')、胚盤胞期胚 (m-p, m'-p')。

3. Real-time PCR 法による Cdx2 および Oct3/4 の転写量解析

Cdx2 および Oct3/4 の転写量について real-time PCR 解析を行った結果、免疫組織化学的解析で観察された結果と同様に、ICSI 胚では 8 細胞期胚において Cdx2 の転写が認められたが、SCNT 胚では Cdx2 の転写は全く検出されなかった (図 3 a)。また、胚盤胞期胚では、ICSI 胚と SCNT 胚との間に有意差が認められた (図 3 a, $p < 0.05$)。一方、Oct3/4 においては、各発生ステージにおいて有意差は認められなかった (図 3 b)。

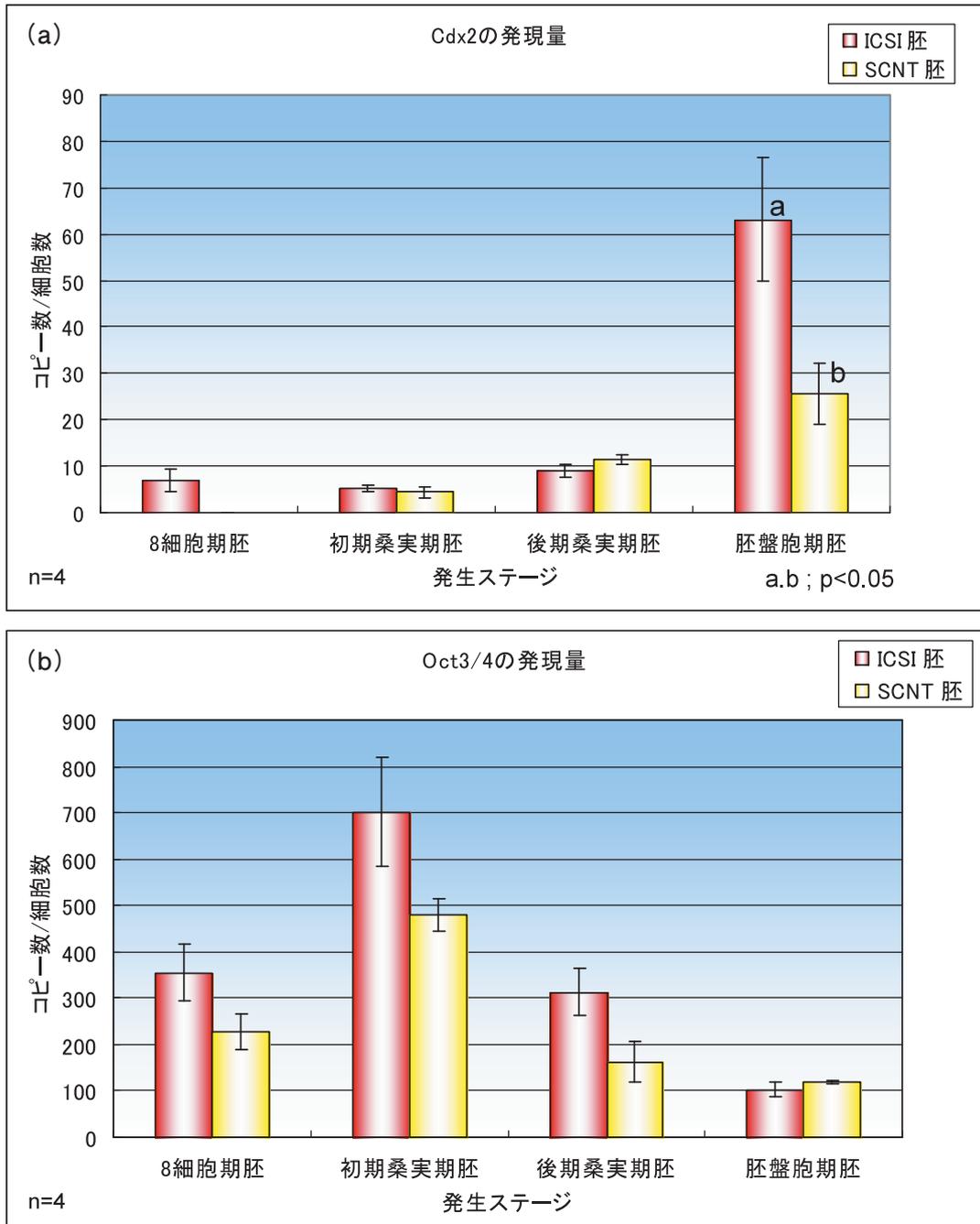


図 3. SCNT 胚および ICSI 胚における Cdx2 ならびに Oct3/4 の転写量の real-time PCR 解析
上段; Cdx2 の転写量、下段; Oct3/4 の転写量。Cdx2 については、胚盤胞期胚において、
有意差が認められた ($p < 0.05$)。

考 察

SCNT 胚の産仔への発生能の検討を行ったところ、SCNT クローン個体の作成に成功した。SCNT 産仔は 2 匹得られたが、1 匹は出生直後に呼吸を継続することができずに死亡した。出生直後の蘇生不良が原因で死亡する胎仔は、クローン個体では非常に多く、本研究室においても同様の結果が観察された。

免疫組織学的解析により、SCNT 胚において、転写因子 Cdx2 の発現は、8 細胞期胚では観察されなかったが、その後の発生ステージで発現が観察され、胚盤胞期胚では、ICM を取り囲む栄養芽細胞での発現が観察された。胚盤胞期胚での Cdx2 の発現は、これまでに報告されているものと一致した [20]。また、これまで Boiani ら [21] により報告されている Oct3/4 の異所的な発現も観察された。栄養外胚葉の分化過程において、Cdx2 は最も初期に発現する転写因子であり、その後の栄養外胚葉系譜の細胞分化の基点となる [22]。SCNT 胚においても、発現開始時期は遅れてはいるものの、初期胚における最初の細胞分化となる栄養外胚葉系譜への分化は起きていると考えられる。

しかし、SCNT 胚の胚盤胞期での Cdx2 の発現量は、ICSI 胚と比較して有意に低いことが示された。Cdx2 は、Eomes や BMP4 の転写に関係すると考えられており、したがって SCNT 胚の胚盤胞期胚での Cdx2 の発現量の低下が、その後の Eomes や BMP4 等の栄養外胚葉系譜の遺伝発現に異常を引き起こしている可能性が考えられる。さらに最近、SCNT 胚において、栄養芽細胞の分化過程で発現する P11 と Tpbpa 遺伝子の発現異常が、胎盤における海綿状栄養膜細胞層の形成異常に影響していることが示されていることから [23]、Cdx2 の標的分子ならびにその下流分子の発現制御について解析を進める必要がある。

一方、栄養外胚葉系譜の分化誘導は、ICM 側からの因子による制御も受けている。胚盤胞期胚には、分化した栄養外胚葉にも自己複製能を有する細胞があり、FGF4 添加培地で培養することにより、Trophoblast stem cell (TS 細胞) が樹立された [24]。FGF4 は ICM 側から分泌され、Oct3/4 と Sox2 の複合体によって転写制御されており、着床後の Cdx2 の発現維持には、FGF4 レセプターである FGFR2 からのシグナルが必要である。このように、着床前後の栄養外胚葉系譜での遺伝子発現は、ICM からのシグナルによっても制御を受けている [25, 26]。したがって、着床成立・維持過程での栄養外胚葉系譜の初期の分化における遺伝子発現異常が、SCNT 胚の発生能の急激な低下をもたらす大きな要因となっていると考えられる。今後、栄養外胚葉系譜での遺伝子発現カスケードの解析とともに、ICM からのシグナル分子にも注目し、SCNT 胚の発生異常の分子背景を探ることにより、SCNT 胚の正常発生を誘起する技術の開発へとつながるものと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省 21 世紀 COE プログラム「食資源動物分子工学研究拠点」の助成によって行われた。

参考文献

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
2. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374
3. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098
4. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF. (2000) Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289: 1188-1190
5. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y. (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17: 456-461.
6. Chense P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard J-P. (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20: 366-369.
7. Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD, Westhunsin ME, Burghardt RC, Hinrichs K. (2002) Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. *Biol. Reprod.* 67: 561-567.
8. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhunsin M. (2002) A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
9. Zhou Q, Renard J-P, Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. (2003) Generation of fertile cloned rats using controlled timing of oocyte activation. *Science* 302: 1179.
10. Woods GL, White LK, Vaderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LM, Pate BJ. (2003) A male cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301: 1063.
11. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. (2002) Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583-586.
12. Ono Y, Shimosawa N, Ito M, Kono T. (2001) Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 64: 44-50.
13. Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M, Nishida A, Ogra A. (2002) Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet.* 30: 253-254.
14. Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seely RJ, D' Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR. (2002) Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat. Med.* 8: 262-267.
15. Wakayama T, Yanagimachi R. (2001) Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122: 49-60.
16. Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Schöler HR, and McLaughlin KJ. (2003) Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J.* 22: 5304-5312.
17. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui H and Wakayama T. (2006) Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic

-
- nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340: 183–189.
18. Strumpf D, Mao C-A, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132: 2093-2102.
 19. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123: 917-929.
 20. Kishigami S, Hikichi T, Thuan NV, Ohta H, Wakayama S, Bui H, Mizutani E, Wakayama T. (2006) Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic nuclear transfer. *FEBS Lett.* 580: 1801-1806.
 21. Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin, KJ. (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones; consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16: 1209-1219.
 22. Simmons DG, Cross JC. (2005) Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 284: 12-24.
 23. Wakisaka-Saito N, Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hikichi T, Mizutani E, Wakayama T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. (2006) Chorioallantoic placenta defects in cloned mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 106-114.
 24. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis A, Nagy A, Rossant J. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282: 2072-2075.
 25. Ambrosetti D, Scholer HR, Dailey L, Basilico C. (2000) Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J. Biol. Chem.* 275: 23387-23397.
 26. Guzman-Ayala M, Ben-Haim N, Beck S, Constam D. (2004) Nodal protein processing and fibroblast growth factor 4 synergize to maintain a trophoblast stem cell microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15656-15660.

英文要旨

Expression of transcription factor Cdx2 and Oct3/4
in mouse somatic cell nuclear transfer embryosMegumi Nishiwaki¹, Tasuku Mitani², Masayuki Anzai², Hiromi Kato²,
Kazuya Matsumoto^{1,2}, Kazuhiro Saeki^{1,2}, Yoshihiko Hosoi^{1,2}, Akira Iritani^{1,2}

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos develop during preimplantation period. Most of these embryos, however, die after implantation. A transcription factor Caudal-related homeobox 2 (*Cdx2*) appears to be involved in the initiation of trophectoderm (TE) differentiation in preimplantation embryos. *Cdx2* and Oct3/4 are mutually regulated by each other. Both *Cdx2* and Oct3/4 are entirely expressed at the morula stage and *Cdx2* expression becomes restricted to the TE cells as the blastocyst forms. Mouse embryos deficient in *Cdx2* are able to develop to normal blastocysts but die soon after implantation probably because of defects in the TE cell lineage. In this study, we focused on *Cdx2* and Oct3/4 and examined their expression in mouse SCNT embryos. The embryos derived from nuclear transfer of cumulus cells or from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were examined the expression of *Cdx2* and Oct3/4 by immunohistochemistry and real-time PCR analysis. Immunohistochemical analysis demonstrated that *Cdx2* expressed entirely in ICSI embryos at the early morula stage, but in contrast, partially in SCNT embryos. *Cdx2* expression was then restricted in the TE cells both in the ICSI and SCNT blastocysts, however the ectopic expression of Oct3/4 was observed in the TE cells of SCNT blastocysts. Real-time PCR analysis showed that at the 8-cell stage *Cdx2* expressed in ICSI embryos but not in SCNT embryos. In addition, the expression level of *Cdx2* in SCNT embryos at the blastocyst stage reached only to the half of that in ICSI embryos. On the other hand, there was no significant difference in that of Oct3/4 between ICSI and SCNT embryos. These results indicate that the disarranged and limited expression of *Cdx2* in SCNT embryos may lead to the ectopic expression of Oct3/4 and the defects in the differentiation of TE lineage for placental formation afterwards.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama 642-0017, Japan