

## マウス体細胞核移植由来初期胚を用いたガラス化保存の検討

東 里 香<sup>1</sup>、中 家 雅 隆<sup>1</sup>、井 上 達 也<sup>2</sup>、梶 本 み づ き<sup>2</sup>、  
加 藤 博 己<sup>1,3</sup>、三 谷 匡<sup>1,3</sup>、細 井 美 彦<sup>1,2,3</sup>、安 齋 政 幸<sup>1,3</sup>

### 要 旨

これまで遺伝資源の保存技術の構築のために、様々な動物種の培養細胞を樹立し遺伝資源の確保と細胞特性の検討を行っている。しかし、高度な発生工学・生殖工学的技術の習熟には時間を要し、特に体細胞核移植操作は、作製した再構築胚の発生率が非常に低率であることから多くの胚を作製しなければならない状況下にある。そこで本実験では、体細胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer : SCNT) により作製した初期胚のガラス化保存を実施し、加温後の正常性を検討した。B6D2F1 マウスへ常法に従い過剰排卵処置後に SCNT を実施した。続いて発生した胚は簡易ガラス化法によりガラス化保存を行った。加温後、形態的に正常と認められた胚は、DAPI 染色および免疫染色 (Oct4) による組織学的観察と胚発生を検討した。SCNT により作製し、生存した卵子を活性化処理後、2 細胞期へ発生した再構築胚は 83.2% であり、一部は胚盤胞期へ発生した (44.8% : 47/105)。これら再構築胚をガラス化保存し一部を加温した結果、加温後の生存胚は 70% 以上であり免疫組織化学的解析により形態的な正常性を認めた。以上の結果から、作製された SCNT 胚のガラス化保存による遺伝資源の保存とそれらの胚を用いた移植核の内部構造構築に関する基礎的検討が可能であることが示唆された。

キーワード：体細胞核移植 (SCNT)、ガラス化保存、マウス、遺伝資源保存

### 1. 緒 論

現在、哺乳動物における体細胞核移植技術は、20 種以上の動物に応用され、個体産生効率についてはマウスも含め改善されつつある<sup>(1)</sup>。また、この技術による体細胞核移植胚の作出および発生能の低い原因は、体細胞ゲノムの再プログラム化における特異的な異常とレシピエント卵子との間に、具体的にどのような因果関係が生じるか詳細に検討することによって解明されると考えられる<sup>(2,3)</sup>。一方、この体細胞核移植技術は、畜産分野<sup>(4,5)</sup> や展示動物<sup>(6,7)</sup> への研究開発と個体生産の応用が進み<sup>(8-10)</sup>、近年、Wakayama らは 16 年間  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存された凍結個体からのクローンマウスの作出に成功し<sup>(11)</sup>、さらに Kamimura らは、微量血液内から回収された白血球核をドナーとしたクローンマウスの作出に成功している<sup>(12)</sup>。我々も、展示動物から供与された 2 系統の野生小型マウスの培養細胞の樹立と保存、それらを用いた体細胞核移植操作による再構築胚の作出および絶滅危惧種から得られた体細胞を用いた異種間核移植による再構築胚の作出に成功しており<sup>(13,14)</sup>、今後、絶滅に瀕する動物種あるいは絶滅動物種への応用が期待される<sup>(15,16)</sup>。しかしながら、体細胞核移植操作には、高度な発生工学・生殖工学的技術の習得が必要であり<sup>(17,18)</sup>、移植核の動態制御の解析には、より多くの再構築胚を作製しさらには発生条件の詳細な検討をする必要がある<sup>(19)</sup>。このように、一度に多くの再構築胚の作出は困難であり、今後、体細胞核移

原稿受付 2015 年 2 月 17 日

本研究の一部は、近畿大学 学内助成金 21 世紀研究開発奨励金「マンモス研究拠点の形成に向けて：YUKA マンモスのサンプルを用いたマンモスの総合的研究」の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院 生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

植技術の有用性を高め広く利用可能なものにさせるためには、より簡便で安定した再構築胚の確保が望まれる。そこで本実験では、体細胞核移植により作製した再構築胚を用いて、ガラス化保存を検討し加温後の正常性を検討した。

## 2. 材料と方法

### (1) 供試動物

供試動物として、成熟齢に達した B6D2F1 マウス（日本 SLC（株））を用いた。このマウスは入荷後、概日調整を 1 週間以上おこない順化した後（明期 7:00-19:00）、実験に供試した。飼育条件は、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50% の飼育環境下において、飼料（CRF1R：オリエンタル酵母工業（株））および飲水を自由摂取させた。なお、本実験に際して動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規定に準じて実施した。

### (2) 体細胞核移植操作

供試マウスを常法に従い過剰排卵処置を施し、hCG 投与後 13-14 時間に卵管膨大部より卵子-卵丘細胞複合体を採取した<sup>(20)</sup>。採取した卵子-卵丘細胞複合体は、0.1% ヒアルロニダーゼ in mCZB HEPES 中に静置することにより卵丘細胞を除去した。

卵子の操作は、倒立顕微鏡マイクロマニピュレーターシステム（Leica Microsystems K.K.）へピエゾ圧電素子（PRIME TECH Ltd.）を装着しておこなった。除核操作は、供試卵を  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  サイトカラシン B（和光純薬工業（株））を含む mCZB-HEPES<sup>(21)</sup> へ約 10 分間静置後、ピエゾマイクロマニピュレーターに取り付けた内径  $5-8 \mu\text{m}$  のガラスピペットでピエゾ圧電素子にて透明帯を貫通し、染色体を吸引除去した（Int：5, Speed：2）。除核卵子は mCZB 培地にて洗浄後ドナー細胞の注入まで炭酸ガスインキュベーター内で培養した（ $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in air）。続いてドナー細胞の注入は、同系統の卵丘細胞を用いた。mCZB-HEPES 培地内へ卵子を導入し、同様にピエゾ圧電素子により除核した卵子の透明帯を貫通し、さらに卵子細胞膜を開孔（Int：2-3, Speed：1）させドナー細胞を注入した<sup>(22)</sup>。

卵子の活性化処理は、Kishigami ら<sup>(23)</sup>の方法を若干修正しておこなった。生存卵は、炭酸ガスインキュベーター内で約 1 時間培養し、早期染色体凝集を確認した後、 $\text{Ca}^{2+}$  不含 mCZB 培地に 10mM 塩化ストロンチウム（和光純薬工業（株））、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  サイトカラシン B を添加した活性化培地へ、5nM トリコスタチン A（Sigma-Aldrich Corp. 以下、TSA）を加え 3 時間卵子活性化処理をおこなった。続いて、 $\text{Ca}^{2+}$  不含 mCZB 培地へ  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  サイトカラシン B および 5nM TSA を加え 3 時間卵子を培養した。次にアミノ酸含有 KSOM 培地<sup>(24)</sup>（EMD Millipore Corp. 以下、KSOM 培地）に 5nM TSA を加えた培地に卵子を移し 4 時間培養をおこなった。これらの活性化処理後、得られた再構築卵子は、KSOM 培地へ移し 2 細胞期へ発生させた。

### (3) 体外受精操作

体外受精操作は宮地ら<sup>(25)</sup>の方法に準じておこなった。成熟齢に達した B6D2F1 雄マウスから精巣上体尾部を採取し得られた精子塊を予め平衡させた mHTF 培地中に導入した。その後、炭酸ガスインキュベーター内で 1.5 時間前培養して受精能を獲得させた。続いて、過剰排卵処置を施した同系統の成熟齢雌マウスより採取した卵子-卵丘細胞複合体を mHTF 培地中へ導入後、予め受精能を獲得させた精子懸濁液を添加し媒精をおこなった（200 精子/ $\mu\text{L}$ ）。媒精後 6 時間目に卵子をアミノ酸不含有 mKSOM 培地に移し洗浄と選別をおこない、引き続き炭酸ガスインキュベーター内で培養し 2 細胞期への発生を確認した。

#### (4) 簡易ガラス化保存および加温操作

作製した各胚のガラス化保存操作は、Nakao ら<sup>(26)</sup>の方法に準じておこなった。1M DMSO in PB1 (アーク・リソース (株)) ドロップ内に発生した各胚を移した後、5  $\mu$ L の 1M DMSO in PB1 と共に胚を凍結チューブ (住友ベークライト (株)) へ移した。続いて 0°C アルミブロッククーラー (旭テクノグラス (株)) で 5 分間冷却した。次に、予め冷却したガラス化保存液 DAP213 (アーク・リソース (株)) を 95  $\mu$ L 凍結チューブ内に素早く加えさらに 5 分間冷却した後、液体窒素中に浸漬した。加温操作は、保管容器内から凍結チューブを取出し、室温下にて 30 秒静置後、予め温めていた 0.25M sucrose in PB1 (アーク・リソース (株)) を 900  $\mu$ L 加え素早くピペッティングすることによりガラス化保存液を希釈した。続いて、回収された各胚を KSOM 培地に移し洗浄をおこない、形態学的に正常と認められた胚はその後の発生能を確認した。

#### (5) 免疫組織学的検査

発生した桑実期胚および胚盤胞期胚の一部は、免疫組織学的検査<sup>(27)</sup>による正常性を確認した。発生した各胚は、酸性タイロド溶液 (IS Japan Co., Ltd) にて透明帯を除去し、3mg/mL Polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA; MW 360,000; K 値 80-100 (lit.)) を含む PBS (-) で洗浄した (以下、PVP/PBS)。次に、3% Paraformaldehyde (nacalai tesque) で 15 分間固定し、PVP/PBS で洗浄後 0.2% TritonX-100 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) で 15 分間透過処理した。続いて 3%BSA を含む 0.01%Tween in PBS (-) で 15 分間 blocking 処理を施した後、一次抗体として Rabbit anti -Oct4 抗体 (1:1000 Abcam Inc, Cambridge, MA, USA) を用いて 4°C 下にて一晩、定着処理をおこなった。次に、二次抗体として Alexa Fluor®488 Donkey-anti rabbit IgG (1:2000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて室温下にて 1 時間処理した。PVP/PBS で洗浄後、DAPI (1:4000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で核染色の後、各胚をスライドガラス上に移し、VECTASHIELD mounting medium (Vector Lab. Inc. Burlingame, CA, USA) を 5 $\mu$ L 滴下しカバーガラスを被せ周囲を封入した。作製した試料は、蛍光顕微鏡 (LEICA DMI 6000B: AF6000) にて観察した。

#### (6) 統計学的解析

本実験操作における全ての統計処理については、解析ソフトウェア (Stat View-J 5.0) を用いて、それぞれ分散分析値を求めた後、Fisher の PLSD により解析をおこなった。なお、統計学的有意差は、5% 水準未満とした。

### 3. 結 果

体細胞核移植操作における前核様構造形成およびその後の再構築胚への発生成績を表 1 に示した。ドナー細胞として、同系統の卵丘細胞を除核未受精卵子に注入して生存した卵子は 61.6% (762/1,238) であり、生存した卵子の 96.6% (736/762) が早期染色体凝集を形成した。これら生存した卵子を活性化処理した結果、93.2% (686/736) の卵子が前核様構造の形成を認め、それらを体外培養後、83.2% (571/686) の前核様構造形成卵子が 2 細胞期へ発生した。

表1 体細胞核移植由来再構築卵子における前核様構造の形成および2細胞期への発生成績

供試卵子数	注入後 生存卵子数 (%)	活性化処理 卵子数 (%)	前核様構造 卵子数 (%)	2細胞期 発生成績 (%)
1,238	762 (61.6)	736 (96.6)	686 (93.2)	571 (83.2)

表2には、体細胞核移植操作および体外受精操作 (IVF) により作製された2細胞期胚を用いたガラス化保存成績を示した。体細胞核移植操作により作製した2細胞期胚の一部を、簡易ガラス化法によりガラス化保存した結果、加温後、95.1% (352/370) の胚が回収され、90.9% (320/352) の生存を確認した。さらに、生存していた再構築胚の98.8% (316/320) が形態学的に正常であると認められた。一方、体外受精操作により作製した2細胞期胚を、簡易ガラス化法を用いてガラス化保存をおこなった結果、加温後、88% (57/65) の胚が回収され、79% (45/57) の胚の生存を確認した。さらに生存した受精胚は96% (43/45) が形態的に正常であると認めた。2細胞期におけるガラス化保存は、胚の作製方法による差は認められなかった ( $p>0.05$ )。

表2 体細胞核移植および体外受精由来2細胞期胚のガラス化保存成績

実験区	保存胚数	加温胚数	回収胚数 (%)	生存胚数 (%)	形態的 正常胚数 (%)
SCNT	370	370	352 (95.1)	320 (90.9)	316 (98.8)
IVF	65	65	57 (88)	45 (79)	43 (96)

簡易ガラス化法により保存した2細胞期胚の加温後における体外培養成績を表3に示した。加温後得られた形態的に正常な胚は、いずれも胚盤胞期への発生成績が認められた。体外受精由来2細胞期胚をガラス化保存した結果、79% (34/43) が胚盤胞期へ発生した (未保存区: 88% (65/74))。一方、体細胞核移植由来2細胞期胚をガラス化保存した成績は16% (14/85) であり、未保存区の44.8% (47/105) と比較して、加温後の胚発生の低下が認められた。

表3 簡易ガラス化法により保存した各2細胞期胚の加温後における体外発生成績

実験区	供試 2細胞期 胚数	胚発生成績 (%)				
		4細胞期	8細胞期	桑実期	胚盤胞期	
SCNT	保存区	85	48 (56)	33 (39)	26 (31)	14 (16) <sup>a</sup>
	未保存区	105	85 (81.0)	60 (57.1)	56 (53.3)	47 (44.8) <sup>b</sup>
IVF	保存区	43	42 (98)	38 (88)	37 (86)	34 (79)
	未保存区	74	74 (100)	73 (99)	73 (99)	65 (88)

a, b; 異文字間に有意差有り ( $p<0.05$ )

表 4 には、体細胞核移植で得られた一部の胚盤胞期胚をガラス化保存後、加温して得られた形態的正常胚数の結果を示した。胚盤胞期胚におけるガラス化保存は、体細胞核移植操作および体外受精操作による形態的に正常胚数に差は認められなかった。

表 4 体細胞核移植および体外受精由来胚盤胞期胚のガラス化保存成績

実験区	保存胚数	加温胚数	回収胚数 (%)	生存胚数 (%)	形態的 正常胚数 (%)
SCNT	42	42	42 (100)	37 (88)	27 (73)
IVF	40	40	40 (100)	36 (90)	28 (78)

体外発生した体細胞核移植および体外受精由来胚盤胞期胚は、一部を免疫組織学的染色による多能性マーカーである Oct4 の観察をおこなった (図 1, 2)。未保存区では、体細胞核移植胚と体外受精胚のどちらも内部細胞塊で Oct4 の発現が確認された。体外受精胚をガラス化保存した区では、未保存区と同程度の内部細胞塊における Oct4 の発現が観察された。しかしながら、体細胞核移植胚をガラス化保存した区では、体外受精胚をガラス化保存した区と異なり、未保存区と比べて Oct4 の発現低下が観察された。

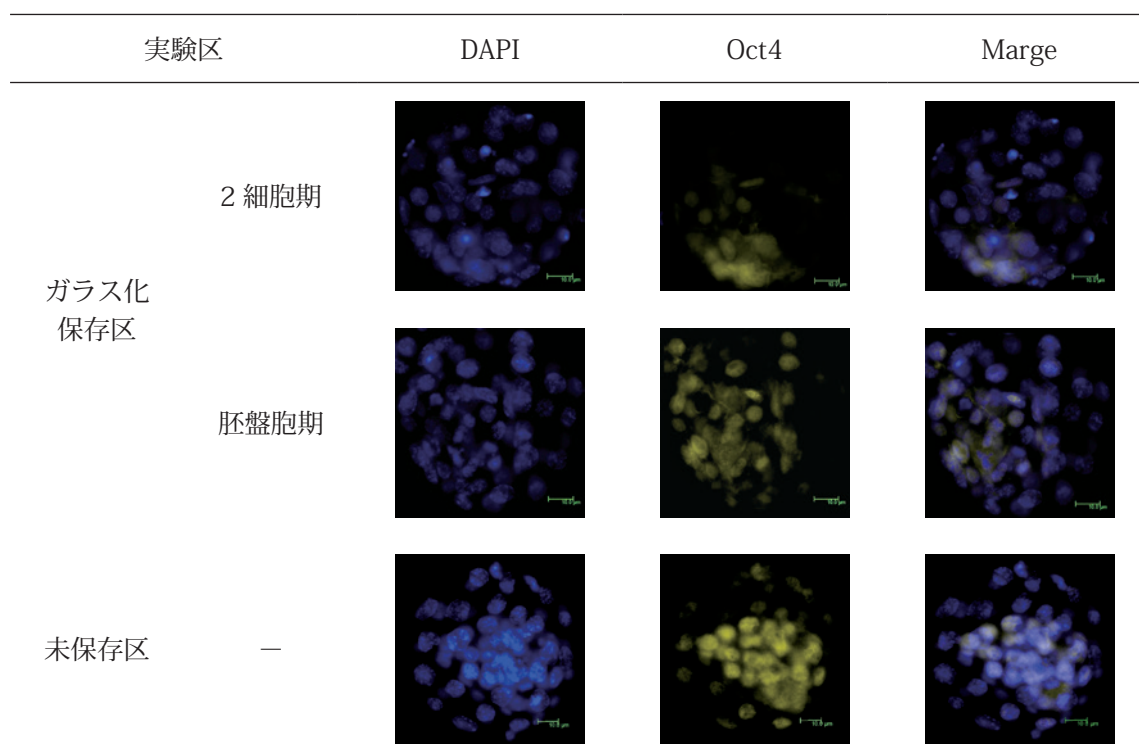


図 1 ガラス化保存後胚盤胞期へ発生した体細胞核移植胚における Oct4 免疫組織化学的解析 (染色像は 400 倍を示す)

#### 4. 考 察

今回、体細胞核移植をおこない作製した 2 細胞期胚および胚盤胞期胚において、簡易ガラス化法を用いたガラス化保存は可能であることが示された。また、体細胞核移植由来 2 細胞期胚では、加温後の胚発生が未保存区と比較して有意に低下した。Wee らは、ドナー細胞の培養環境に TSA を添加することによって、ドナー細胞の DNA methyltransferase およびヒストン脱アセチル化酵素のタンパク質の低下や反復配列であるサテライト I における DNA メチル化レベルが低下したことを報告している (28, 29)。さらに、マウス体細胞核移植においては、卵子への細胞注入から初期活性化時に TSA 添加培地で培養することによって、未添加区と比較して胚盤胞期への発生率が約 3 倍に改善されることが報告されている (23)。しかしながら、本実験において、体細胞核移植をおこない活性化培地中へ 5nM TSA 添加することにより再構築した 2 細胞期胚をガラス化保存したところ、未保存区と比較して胚盤胞期への発生率が有意に低下した。今回使用したガラス化保存液には、2M DMSO と 1M Acetamide そして 3M Propylene glycol が含まれている (26)。これまでの研究で、DMSO は凍結保護剤として生殖細胞や培養細胞の保存液に使用されているが、その細胞毒性が指摘されており、DMSO 内のメチル基によりタンパク質や核酸のメチル化が促進され、細胞の形態や機能を変化させてしまうことが報告されている (30)。さらに、岩谷らは、マウス ES 細胞に対する DMSO 処理により、DNA メチル基転移酵素の 1 つである Dmmt3a の発現が上昇し、DNA の高メチル化状態を引き起こすことを報告している (31, 32)。これらのことから、体細胞核移植操作によるリプログラミング時に要求される、ドナー細胞の DNA メチル化レベルの低下を DMSO が阻害した可能性が考えられた。一方、マウス胚発生において、胚性ゲノムの活性化は 1 細胞期の後期から 2 細胞期の初期にかけて生じることが知られている (33)。体細胞核移植胚において、胚性ゲノムの活性化遺伝子は、体外受精胚と比較し

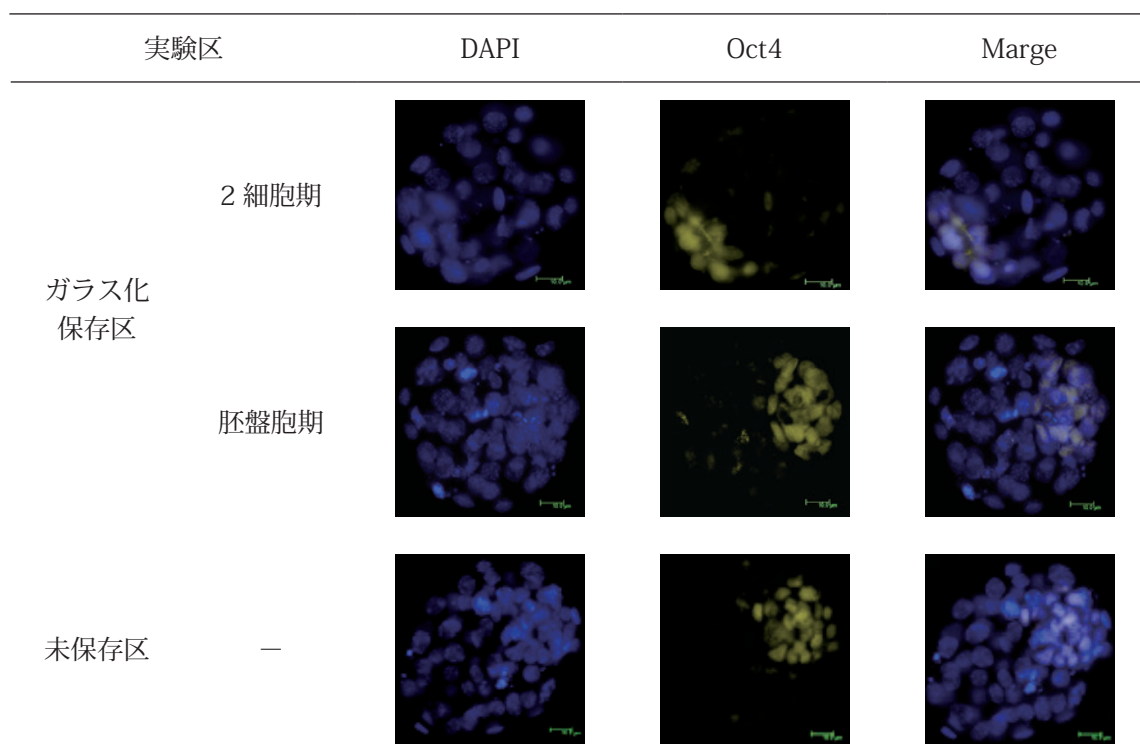


図 2 ガラス化保存後胚盤胞期へ発生した体外受精由来胚における Oct4 免疫組織化学的解析 (染色像は 400 倍を示す)

て35-65%抑制され、胚性ゲノムの活性化異常は胚発生を停止させることが報告されている<sup>(34)</sup>。体細胞核移植胚の発生段階に伴うガラス化保存をおこなったところ、2細胞期胚では、加温後の胚発生率は未保存区と比較して低下したが、胚盤胞期胚では、体外受精胚と同程度の正常胚を得た。これらの知見は、胚性ゲノムの活性化途中の2細胞期胚においては、ガラス化保存により活性化異常が生じ加温後の胚発生低下を誘引したことが考えられる。通常、配偶子や初期胚では、多能性の獲得のために多能性転写制御因子 *Oct4* 遺伝子は低メチル化状態が維持されている。一方、体細胞では *Oct4* 遺伝子の上流制御配列部位がメチル化修飾を受けており、転写活性が抑制されている。Boiani ら<sup>(35)</sup> は、体細胞核移植後、*Oct4* 遺伝子の上流制御配列部位は高メチル化修飾を受けており、4細胞期以降の脱メチル化によって転写活性が上昇し、正常な胚盤胞期胚では低メチル化状態に達することを報告している。さらに、発生遅延を生じた胚においては、高メチル化状態が維持されていることが認められている<sup>(36)</sup>。本実験においても、体細胞核移植由来胚をガラス化保存することにより、加温後の胚盤胞期胚における *Oct4* の発現が未保存区と比較して低下したことは、ガラス化保存することによる凍結保護剤に含まれるメチル化促進作用が、*Oct4* 遺伝子の高メチル化状態を誘導したことが考えられた。

近年の体細胞核移植技術の発展により、クローンマウス作出効率の改善<sup>(37)</sup> や培養細胞を用いた体細胞核移植胚からの ntES 細胞の樹立が報告されている<sup>(38)</sup>。今回、体細胞核移植由来胚を省力的に長期的にガラス化保存することが可能となり、これまで新鮮な体細胞核移植胚を材料としていた ntES 細胞の樹立や体細胞核移植に最適な培養条件検討<sup>(23)</sup> に必要とされる多くの胚の提供には十分に有用性があると考えられる。また、そのような ntES 細胞の樹立には、体細胞核移植胚を作製する高度な発生工学・生殖工学技術に加えて、高度な細胞培養技術も必要であるため、体細胞核移植胚のガラス化保存をおこない安定的に保存し凍結輸送することも可能である。さらに、効率的に体細胞核移植胚の DNA メチル化状態を探求する新たな手法となる可能性が示唆され、今後、体細胞核移植由来初期胚の発生段階に合わせたガラス化促進剤の選択および加温後の着床前調節領域の解析をおこなうことにより、効率的な遺伝子資源保存の可能性が示された。

## 5. 結 論

本研究では、作製された体細胞核移植由来初期胚をガラス化保存による、その後の発生能を検討した。加温後回収された体細胞核移植胚は形態的に正常であることが確認され、胚盤胞期への発生を認めた。得られた胚盤胞期胚の一部は、免疫組織化学染色解析により多能性マーカーである *Oct4* を保持した内部細胞塊を確認した。これらの結果から、遺伝資源の保存とそれらの胚を用いた移植核の内部構造構築に関する基礎的検討が可能であることが示唆された。

## 6. 謝 辞

本実験に関して、適切なお助言を賜りました(株)紀和実験動物研究所、中川隆生氏に感謝申し上げます。本研究の一部は、近畿大学 学内助成金 21世紀研究開発奨励金「マンモス研究拠点の形成に向けて：YUKA マンモスのサンプルを用いたマンモスの総合的研究」の助成を受けたものです。

## 7. 参考文献

1. Yanagimachi R. (2002). Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol.* 187, 241-248.
2. Wakayama S, J B Cibelli, Wakayama T. (2003). Effect of timing of the removal of oocyte chromosomes before or after injection of somatic nucleus on development of NT embryos. *Cloning Stem. Cells.* 5, 181-189.
3. C. Palmieri, P. Loi, G. Ptak, L. D. Salda. (2008). A Review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in Cattle, Sheep, and Mice. *Vet Pathol.* 45, 865-880.
4. Willadsen SM. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.* 320, 63-65.
5. Prather RS, Sims MM, First NL. (1989). Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod.* 41, 414-418.
6. P. Loi, G. Ptak, B. Barboni, J. Fulka, Jr, P. Cappai, M. Clinton. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962-964.
7. H.J. Oha, M.K. Kim, G. Jang, H.J. Kim, S.G. Hong, J.E. Park, K. Park, C. Park, S.H. Sohn, D.Y. Kim, N.S. Shin, B.C. Lee. (2008). Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology.* 70, 638-647.
8. Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. (2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning.* 2, 79-90.
9. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature.* 415, 859.
10. Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD, Westhusin 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.
11. Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T. (2008). Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 17318-17322.
12. Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Hirose M, Oikawa M, Yo M, Ohara O, Miyoshi H, Ogura A. (2013). Mouse cloning using a drop of peripheral blood. *Biol Reprod.* 89, 1-6.
13. 安齋政幸、村井仁志、宮下実、岸昌生、中家雅隆、西村愛美、杉本奈央、松崎ひかる、東里香、三谷匡、加藤博己、細井美彦. (2014). 野生マウス由来線維芽細胞の樹立による遺伝資源保存技術の一例. 近畿大学先端技術総合研究所紀要. 19, 13-23.
14. 東里香、宮下実、村井仁志、中家雅隆、崎田恵、亀井美紅、三谷匡、細井美彦、安齋政幸. (2014). 絶滅に瀕する小型動物種の有用遺伝子回収方法の確立に向けて. 第20回日本野生動物医学会要旨. pp44.
15. 入谷明. (1998). クローン動物が語る現状と未来. *Newton.* 18, 80-87.
16. 若山照彦. (2009). クローンマンモスへの道 クローン技術最前線の技術における発生・再生医療技術を探る. pp62-68. アドスリー.
17. Ogura A, Inoue K, Takano K, Wakayama T, Yanagimachi R. (2000). Birth of mice after nuclear



- transfer by electrofusion using tail tip cells. *Mol Reprod Dev.* 57, 55–59.
18. Yanagimachi R. (2011). Problems of sperm fertility: a reproductive biologist's view. *Syst Biol Reprod Med.* 57, 102–114.
  19. Mizutani E, Yamagata K, Ono T, Akagi S, Geshi M, Wakayama T. (2012). Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. *Dev Biol.* 364, 56–65.
  20. 安齋政幸、糟谷佳恵、細井美彦、松本和也、佐伯和弘、入谷明. (2005). JAX|MICE C57BL/6J マウスを用いた体外受精および初期胚ガラス化保存の基礎的検討. *実験動物技術.* 40, 87–90.
  21. Kawasumi M, Unno Y, Matsuoka T, Nishiwaki M, Anzai M, Amano T, Mitani T, Kato H, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Kishigami S, Matsumoto K. (2009). Abnormal DNA methylation of the Oct-4 enhancer region in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 76, 342–350.
  22. Kishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, H T Bui, Balbach S, Ogura A, Boiani M, Wakayama T. (2006). Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat Protocols.* 1, 125–138.
  23. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, 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.
  24. M.C. Summers, L.K. McGinnis, J.A. Lawitts, J.D. Biggers. (2005). Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Hum Reprod.* 20, 1364–1371.
  25. 宮地志織、安齋政幸、古田祐奈、柳美穂、中島竜之、川辺敏晃、金子武人、中瀨直己. (2008). 各種系統由来ガラス化保存透明帯穿孔卵子を用いた体外受精の検討. *実験動物技術.* 43, 25–29.
  26. Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. (1997). Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp. Anim.* 46, 231–234.
  27. 西脇恵、三谷匡、安齋政幸、加藤博己、松本和也、佐伯和弘、細井美彦、入谷明. (2007). 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. *近畿大学先端技術総合研究所紀要.* 12, 33–42.
  28. Wee G, Shim JJ, Koo DB, C JI, L KK, Han YM. Epigenetic alternation of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction.* 134, 781–787.
  29. 高橋昌志、坂谷美樹、山中賢一. (2010). 体細胞クローン胚における DNA のメチル化制御機構の解明とその評価. *畜産草地研究所研究資料.* 10, 33–38.
  30. 佐藤朋花、矢内信昭. (2013). 培養細胞凍結保存に対するラクトアミドの凍結保護作用. *生活環境科学研究所研究報告.* 45, 11–16.
  31. 岩谷美沙、大鐘潤、塩田邦郎. (2005). 発生・分化とエピジェネティクス. *ゲノム医学.* 5, 25–30.
  32. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. (2006). Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells.* 24, 2549–2556.
  33. Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. (2007). Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J. Reprod. Dev.* 53, 707–715.
  34. Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim JM, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. (2006). In efficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J. Cell.*

Sci. 119, 1985–1991.

35. Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16, 1209–1219.
36. Yamazaki Y, Fujita T. C, EW Low, VB Alarcon, Yanagimachi R, Marikawa Y. (2006). Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 73, 180–188.
37. Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. (2010). Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science.* 330, 496–499.
38. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science.* 292, 740–743.

## 英文抄録

Simple vitrification of mouse early embryos derived from  
somatic cell nuclear transfer

Rika Azuma<sup>1</sup>, Masataka Nakaya<sup>1</sup>, Tatsuya Inoue<sup>2</sup>, Mizuki Kajimoto<sup>2</sup>,  
Hiromi Kato<sup>1,3</sup>, Tasuku Mitani<sup>1,3</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1,2,3</sup> and Masayuki Anzai<sup>1,3</sup>

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been used in various research namely investigation into cellular features for establishing of genetic resources technology from wild animals. However, it requires a high level of developmental engineering and reproduction technology which take time to learn as well as many successfully reconstructed oocytes and embryos. In this experiment, we examined the cryopreservation by simple vitrification of the mouse early embryos produced by SCNT. After warming a part of cloned embryos, morphologically normal embryos were obtained at more than 70%. And they were morphologically normal by the investigation with immunohistochemical analysis, which detected Oct4, pluripotency factor in inner cell mass. In conclusion, these results suggested that the genetic resources preservation were possible by simple vitrification of cloned mouse embryos. Furthermore, fundamental study on the internal structure of the cell nucleus can be made possible using the cloned mouse embryos.

Key word: Somatic cell nuclear transfer, Vitrification, Mouse, Genetic resource

---

1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University. Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Department of Genetic Engineering, B.O.S.T, Kinki University. Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

3. Institute of Advanced Technology, Kinki University. Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan

