

胚移植後 14 日目におけるウサギ体細胞クローン胚の体内での発生

木田 雄大¹、歐 則克¹、矢持 隆之¹、
森田 恭平²、岸上 哲士^{1,2}、細井 美彦^{1,2}

要 旨

1997 年にヒツジで初めて哺乳類の体細胞クローン作出が報告されて以来、マウスやウシ、ブタなど多くの種で体細胞クローン産仔作出の成功が報告されているが、その産仔作出効率は未だ著しく低い。また、作出された体細胞クローンの殆どが胎盤の異常や過大仔症候群、呼吸不全などの異常を伴っている。マウス体細胞クローンにおいて、着床の前後に体細胞クローン胚の多くが致死を示すことが報告されており、また、着床後の発生においても胎盤の形成不全や胎仔の神経管・心臓・消化管・血管などに形態的異常が多く観察されている。ウサギ体細胞クローンにおいては胎仔期の発生を観察した知見は無く、体細胞クローンの体内における発生は不明である。

本実験ではウサギ体細胞クローン胚の胚移植後の体内における着床後の発生を評価するため、胚移植後 14 日目のクローン胎仔および胎盤を形態的に観察した。その結果、胚移植後 14 日目において着床率は 7%、胎仔形成率は 3% と、非常に低率であることが分かった。また、体細胞クローン胎仔の形態的観察においては、通常の発生と違わない発生段階のものも得られたが、発生が遅延や停止しているものも得られた。胎盤においては体細胞クローンのものは重量が有意に低く、形成不全のものが観察された。

1. 緒 論

体細胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer ; SCNT) は、遺伝学的に優れた家畜の複成や絶滅危惧種の保存や遺伝子組み換え動物の生産、および内科療法用細胞療法など、広い分野において応用される可能性がある。1997 年にヒツジで初めて哺乳類の体細胞クローン作出が報告されて以来、マウスやウシ、ブタなど数多くの種での体細胞クローン産仔作出の成功が報告されている。しかし、その産仔作出効率は未だ著しく低く、マウスでは 5%、ウシでは 3%、ブタでは 0.5% である。また、作出された体細胞クローンはドナー核の雌雄や細胞種に関係なく胎盤の過形成を起こしており、また、臍帯ヘルニアや過大仔症候群、呼吸不全などの異常も見られ、成体にまで成長できるのは僅かである⁽¹⁾。

ウサギは、古くから医薬品の薬効や安全試験、催奇形性、ヒト代謝疾患・関節疾患等のモデルとして利用されている実験動物である。また、体外受精 (In vitro fertilization ; IVF) や顕微授精 (Intracytoplasmic sperm injection : ICSI) などの初期胚の研究においても幅広い知見が得られており、体細胞クローンの作出は、実験動物としての価値をあげるものであると考えられる^(2,3)。さらに、近年マウスやサル、ウサギ、ラットなどの種で ES 細胞 (embryonic stem cell) の作出が報告されているが、生殖系列へ寄与することが確認されているのはマウスとラットの ES 細胞株のみである^(2,4-8)。そのため、SCNT によるクローンの作出は ES 細胞が生殖系列へ寄与しない動物種において、ノックアウト動物を作成する唯一の手段であり、重要な技術であると考えられる。

ウサギ体細胞クローンは 2002 年になって初めて卵丘細胞をドナーとした SCNT により、産仔作出の成

1. 近畿大学大学院生物理工学研究所 〒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

功が報告された⁽⁹⁾。その後も繊維芽細胞や胎仔繊維芽細胞をドナーとして用いた体細胞クローン産仔作出の成功が報告されている⁽¹⁰⁻¹²⁾。しかし、これらの報告における産仔作出効率は非常に低率であり、また、ほとんどの産仔は生後3週間以上生存できていない⁽¹³⁾。

マウスにおいて、体細胞クローン胚の多くが着床時期に発生を停止しており、着床に至った体細胞クローン胚の多くが脱落膜を形成するが胚体および胚体外組織を含んでおらず、10.5日齢においては着床に至ったものの僅か10%ほどしか、胚体および胚体外組織を含んでいないことが報告されている。また、胚体および胚体外組織が観察された個体でも、胎盤の形成不全や胎仔の神経管・心臓・消化管などに形態的異常が観察されている⁽¹⁾。ウサギ体細胞クローンにおいては胎仔期の発生を観察した知見は無く、体内での発生は不明である。

本実験ではウサギ体細胞クローン胚の胚移植後の体内における着床後の発生能を観察するため、14日目の胎仔および胎盤を形態的に観察した。

2. 材料と方法

(1) 卵子の回収

New Zealand White (NZW) 種成熟雌ウサギに妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 80IU、72時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 60IU を注射し、過剰排卵処理を施した。hCG の投与後14時間目に安楽死処分後、卵管を回収し、卵管を M2+0.3%BSA (以下 M2) で灌流し、卵子卵丘細胞複合体を回収した。続いて、0.1% ヒアルロニターゼで約1分間処理後、ピペッティングすることで卵丘細胞を除去した。卵子は CMRL+20%FBS (以下 CMRL)、で使用まで培養した (37°C、5% CO₂)。

(2) ドナー細胞の準備

卵子を裸化した際に得られた卵丘細胞をドナー細胞として用いた。顕微操作用のチャンバー上の10%PVPドロップに卵丘細胞を懸濁して使用時まで静置した。

(3) 卵子の除核

除核の前処理として 7.5 μg/ml サイトカラシン B と 10 μg/ml ヘキスト 33342 を含む M2 で卵子を10分間処理した。除核操作にはピエゾマイクロマニピュレーターを使用し、外径が 15-18 μm のマイクロピペットを用いて、染色体と少量の卵子細胞質及び極体を吸引することで除核した。除核の成功はヘキストで染色された染色体に紫外線を当て、蛍光像で確認した。除核した卵子は、細胞を注入するまで CMRL で保存した (37°C、5% CO₂)。

(4) 再構築胚の作成

除核した卵子の卵胞腔内にドナー細胞を注入した。融合培地はマンニトールを使用し、融合用電極を用いて細胞融合装置 [ネッパジーン、LF-101] により、ドナー細胞と卵子細胞質を融合した (DC 2.5kV/cm、30 μsec×2)。再構築胚は、活性化処理するまで CMRL で保存した (37°C、5% CO₂)。

(5) 再構築胚の活性化処理

細胞融合装置 [島津製作所、SSH-10]、チャンバー [島津製作所、FTC-22S] を用いて、電気刺激による活性化を30分間隔で2回 (DC 2.5kV/cm、30 μsec×2)、その後 CMRL +2mM 6-DMAP で2時間培養することで活性化処理を行った。活性化処理後は胚を十分に洗浄し、CMRL で培養した (38.5°C、5% O₂、

5%CO₂、90%N₂)。

(6) 体細胞クローン胚の胚移植

ドナーより 22-24h 遅らせて胚移植のレシピエント（以下 代理母）に偽妊娠処理（PMSG 80IU、72 時間後に hCG 60IU を注射）を行った。移植には 4-8 細胞期に発生した体細胞クローン胚を用い、外科的手術により両卵管に体細胞クローン胚を移植した。

(7) 交配卵の回収

NZW 種成熟雌ウサギに PMSG 80IU、72 時間後に hCG 60IU を注射し、過剰排卵処理を施した。hCG の投与後すぐに NZW 種成熟雄ウサギと交配させた。交配後 20 時間後に安楽死処分後、卵管を回収し、卵管を M2 で灌流し、交配卵を回収した。得られた卵子は CMRL で 24 時間培養した（38.5℃、5% O₂、5% CO₂、90% N₂）。

(8) 交配卵の胚移植

代理母に交配卵のレシピエントと同時期に偽妊娠処理（PMSG 80IU、72 時間後に hCG 60IU を注射）を行った。移植には 4-8 細胞期に発生した交配卵を用い、外科的手術により両卵管に交配卵を移植した。

(9) 胎仔および胎盤の回収

胚移植後 14 日目に代理母を安楽死処分後、子宮を切開し着床痕によって妊娠を確認した。また、胎仔および胎盤を回収した。

(10) マイクロサテライトマーカー解析

代理母をコントロールとして、SCNT の核ドナーと体細胞クローン胚由来胎仔の遺伝子型を解析した。プライマーには 12L1E11 (AF421941)、19L1A4 (AF421948) を用いた^(18,19)。

3. 結 果

卵丘細胞をドナーとして体細胞クローン胚を作成した結果、胚盤胞期胚への発生率は 66% であったのに対し（表 1）、胚移植後の体内での発生を確認したところ、着床率および胎仔形成率は 7%、3% と非常に低いものであった（表 2）。

得られた胎仔 5 匹のうち、サンプリングできた 4 匹はマイクロサテライトマーカー解析を行い体細胞クローンであることを確認した（図 1）。得られた胎仔 5 匹のうち 1 匹は発生が早い段階で停止しており、また、1 匹の発生に遅延が見られた（図 2）。発生の停止していた 1 匹を除く体細胞クローン胎仔と交配卵由来胎仔の体長には差が見られなかった（表 3）。胎盤においては、交配卵由来のものとは比べ体細胞クローンのものは小さく（図 3）、また、胎盤重量は有意に低かった（表 3）。

表 1. ウサギ体細胞クローン胚の着床前発生

	供試卵子数	再構築胚数 (%)*	卵割胚数 (%)**	胚盤胞期胚数 (%)**
体細胞クローン胚	151	127 (84)	120 (94)	84 (66)

*供試卵子数を分母とする

**再構築胚数を分母とする

表 2. ウサギ体細胞クローン胚の胚移植後 14 日目までの発生

	移植胚数	代理母数	妊娠した代理母数 (%)*	着床痕 (%)**	胎仔数 (%)**
体細胞クローン胚	174	6	4 (67)	21 (7)	5 (3)

*代理母数を分母とする

**移植胚数を分母とする

表 3. 胚移植後 14 日目における交配卵由来胎仔と体細胞クローン胚由来胎仔の比較

胚	胎仔数	胎仔体長 ±S.D (mm)	胎仔重量 ±S.D (g)	胎盤重量 ±S.D (g)
交配卵由来胎仔	7	155±11	0.34±0.05	0.79±0.14 ^a
体細胞クローン胚由来胎仔	4	149±20	N.D	0.36±0.09 ^b

a, b 間に有意差あり (P < 0.05) t 検定

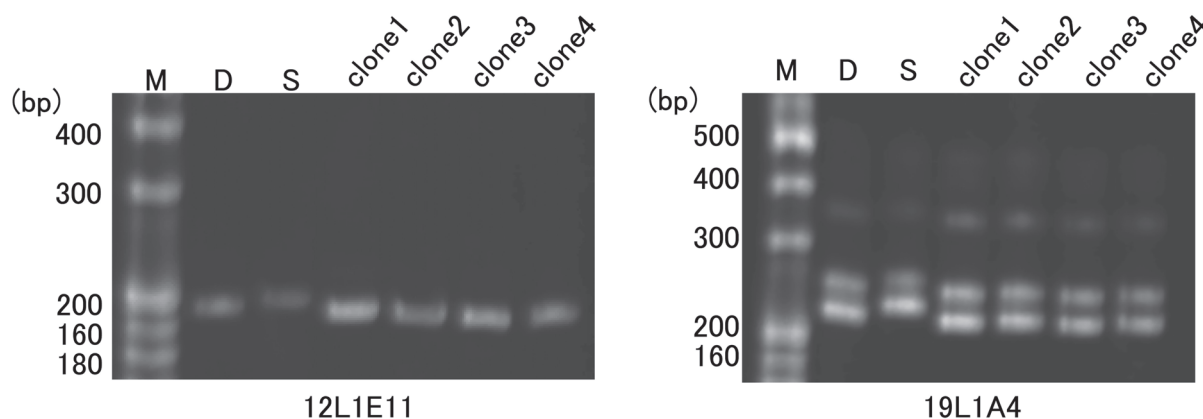


図 1. クローンのマイクロサテライトマーカー解析

M: 20bp ラダーマーカー D: 核ドナー S: 代理母

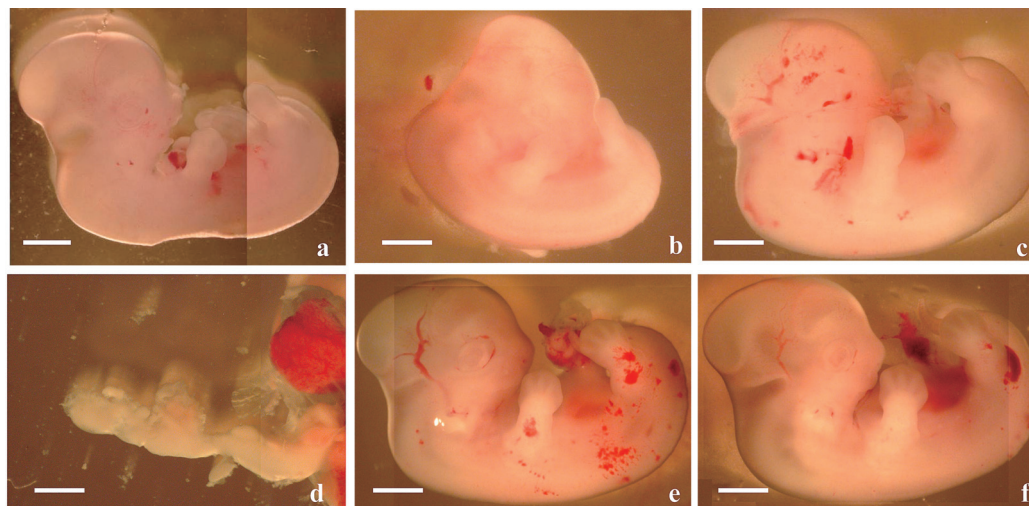


図 2. 胚移植後 14 日目における体細胞クローン胚由来胎仔の形態的観察

(a) 交配卵由来 (b-f) 体細胞クローン胚由来 Bar=2mm

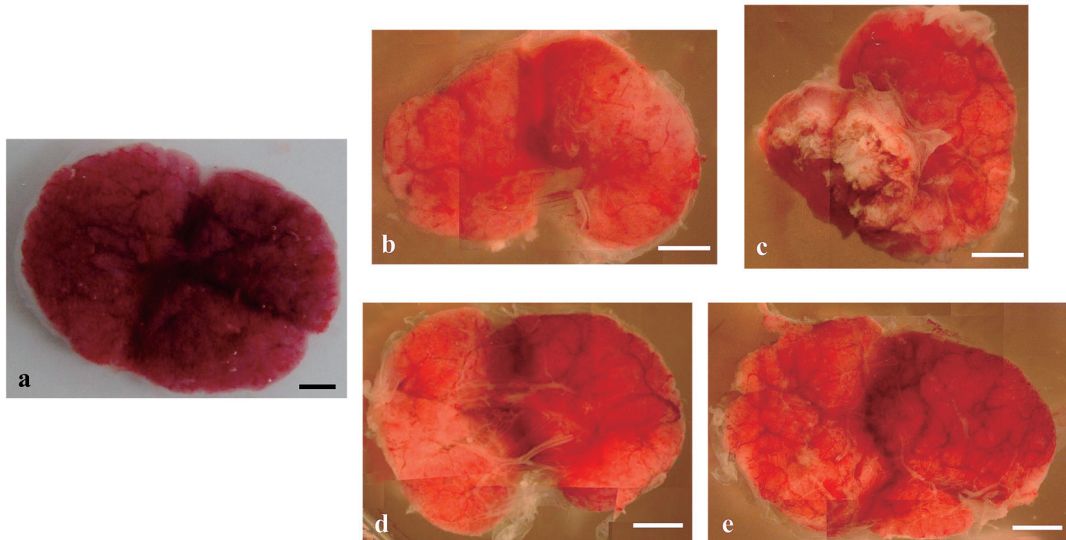


図 3. 胚移植後 14 日目における体細胞クローン胚由来の胎盤
(a) 交配卵由来 (b-f) 体細胞クローン胚由来 Bar=2mm

4. 考 察

本研究において、ウサギ体細胞クローン胚の約 60% が体外培養で胚盤胞期胚へと発生することが確認されたが、胚移植の結果、着床率は 6.9% と非常に低いものであった。マウスの SCNT においては、体細胞クローン胚の約 50% が胚盤胞期胚に発生し、胚移植後、その約 50% の体細胞クローン胚が着床することが報告されている^(1, 14-17)。この着床率の違いは、ウサギの着床許容期間の短さにあると考えられる。ウサギの受精卵では、胚は子宮角において胚盤胞の急速かつ大幅な拡張が起こり、胚周囲の子宮壁を押し広げ、位置を固定することで交配後 6 日後には "着床部位" として個々の胚の着床の位置が決定することが知られている。その後、胚盤胞期胚の透明帯やムチン層の被覆層の溶解・消失が起こり、着床をするが、これは交配後 7 日目だけでしか起こらない^(9, 20)。また、ウサギ体細胞クローン胚は受精卵と比較して、1 日程度の発生速度の遅延が見られることが報告されている⁽⁹⁾。このように、着床時期が限定され、かつ、発生速度の違いにより、胚移植の際の代理母と移植する胚の同期が難しく、体細胞クローン胚の着床の低率さに繋がっていると考えられる。

マウスの SCNT において、着床した胚のその多くが脱落膜を形成するが、胚体および胚体外組織を含んでおらず、10.5 日齢においては着床したものの僅か 10% ほどしか、胚体および胚体外組織を含んでいないと報告されている⁽¹⁾。本研究において着床した体細胞クローン胚の内、41% (5/12) と高率に胚体を内包していた。これは、2つの理由が考えられる。まず、着床の際の胚のスペーシングには十分な胚の拡張が必要であり、これによって、質の良い体細胞クローン胚のみがセレクションされ、着床していることが考えられる⁽²⁰⁾。次に、ウサギは着床後、発育の悪い胎仔を吸収する特性を持っているため、発生の悪い体細胞クローン胚が吸収されてしまったことが考えられる⁽²⁰⁾。

本研究において得られた体細胞クローン胎仔 5 匹のうち、受精卵由来の胎仔と変わらない発生段階のものが 3 匹得られた。このことから、移植後 14 日目においては、正常な発生段階のクローンが得られることが示された。しかし、発生が遅延・停止している胎仔も得られ、胚の発生にバラつきが見られた。ウサギは胎盤が絨毛型に切り替わるおよそ 14 日目において胚吸収を起こしやすいとされているため、発生が停止していた体細胞クローン胚は吸収されている途中であると考えられる⁽²⁰⁾。

マウスの SCNT において、分娩満期まで発生した体細胞クローンの胎盤ほとんどに過形成が見られるが、

胚移植後 10.5 日目においては、胎盤の形成不全が多く見られることが報告されており、その形成不全が体細胞クローン産仔作出効率の低さに繋がるということが報告されている⁽¹⁾。本研究においても、得られた胚移植後 14 日目の体細胞クローンの胎盤は交配卵由来のものとは比べ小さく、重量が有意に低く、胎盤の形成不全が認められた。そのため、ウサギの体細胞クローンにおいても妊娠中期の胎盤の形成不全が体細胞クローン産仔作出効率の低さに繋がっている可能性が考えられる。

これらのことから、ウサギ体細胞クローン作出の際には、着床の際に多くの体細胞クローン胚が着床に至らず、発生を停止することが示された。また、ウサギ体細胞クローン作出には代理母と移植胚の発生の同期化が非常に重要であることが示唆された。さらに、ウサギ体細胞クローンにおいても、妊娠中期において胎盤の形成不全が観察され、また、胚の再吸収も伴うため、ウサギ体細胞クローン産仔作出効率が低くなることが示唆された。

5. 参考文献

1. Wakisaka-Saito N, et al. (2006) Chorioallantoic placenta defects in cloned mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349 (1) : 106-114.
2. WHonda A, et al. (2008) Stable embryonic stem cell lines in rabbits : potential small animal models for human research. *Reproductive Biomedicine Online* 17 (5) : 706-715.
3. WHonda A, et al. (2010) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits potential experimental models for human regenerative medicine. *Journal of Biological Chemistry* 285 (41) : 31362-31369.
4. WEvans. MJ & Kaufman. MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 : 154-156.
5. Suemori H, et al. (2001) Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Developmental Dynamics* 222 (2) : 273-279.
6. Mitalipov S, et al. (2006) Isolation and characterization of novel rhesus monkey embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 24 (10) : 2177-2186.
7. Li P, et al. (2008) Germline Competent Embryonic Stem Cells Derived from Rat Blastocysts. *Cell* 135 (7) : 1299-1310.
8. Buehr M, et al. (2008) Capture of Authentic Embryonic Stem Cells from Rat Blastocysts. *Cell* 135(7) : 1287-1298.
9. Chesne P, et al. (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology* 20 (4) : 366-369.
10. Li SG, Chen XJ, Fang ZF, Shi JJ, & Sheng HZ (2006) Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. *Reproduction* 131 (6) : 1085-1090.
11. Du FL, et al. (2009) Beneficial Effect of Young Oocytes for Rabbit Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cloning and Stem Cells* 11 (1) : 131-140.
12. Li SG, et al. (2009) Cloning rabbits from fetal fibroblasts. *Livestock Science* 122 (1) : 77-80.
13. Meng QG, Polgar Z, Liu J, & Dinnyes A (2009) Live Birth of Somatic Cell-Cloned Rabbits following Trichostatin A Treatment and Cotransfer of Parthenogenetic Embryos. *Cloning and Stem Cells* 11 (1) : 203-208.

-
14. 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 (6691) : 369-374.
 15. Wakayama T & Yanagimachi R (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22 (2) : 127-128.
 16. Wakayama T, Rodriguez I, Perry ACF, Yanagimachi R, & Mombaerts P (1999) Mice cloned from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (26) : 14984-14989.
 17. Ogura A, et al. (2000) Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biology of Reproduction* 62 (6) : 1579-1584.
 18. vanHaeringen WA, denBieman M, vanZutphen LFM, & vanLith HA (1996) Polymorphic microsatellite DNA markers in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Experimental Animal Science* 38 (2) : 49-57.
 19. Korstanje R, et al. (2003) Mapping of rabbit microsatellite markers using chromosome-specific libraries. *Journal of Heredity* 94 (2) : 161-169.
 20. 佐久間勇次 監修 1988 ウサギ - 生殖生理と実験手技—p77—p94 近代出版

英文抄録

In vivo development of rabbit somatic cell nuclear transfer embryos at 14 day

Yuta Kida¹, Noriyoshi Oh¹, Takayuki Yamochi¹, Kyohei Morita²,
Satoshi Kishigami^{1, 2} and Yoshihiko Hosoi^{1, 2}

Abstract

Since the successful cloning of sheep using somatic cell nuclear transfer (SCNT) was first reported in 1997, clone animals have been produced in many mammalian species. However, the cloning efficiency is still very low. Moreover, most of the clones have many abnormalities such as placental hyperplasia, large offspring syndrome, and obesity. In mouse SCNT cloning, it has been reported that most SCNT clones die around the time of implantation. In the development of mouse SCNT clones after implantation, many morphological abnormalities have been reported in the heart, neural tube, gut, and blood vessels. In the rabbit SCNT cloning, there have been no reports that study clone development in the fetal period. Therefore, *in vivo* development of rabbit SCNT clone is unknown.

In this study, both cloned embryos and placentas at 14 day were morphologically-analyzed to evaluate *in vivo* development of rabbit SCNT embryos after implantation.

The results showed both implantation rate and fetal formation rate were very low (6.9% and 2.8%). The clone fetuses were found to be at normal developmental stages at 14 day. However, the development of some clones had stopped or delayed. Moreover, the placenta weights of clone were significantly lower, and had morphological abnormalities.

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