

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500506

研究課題名(和文) マウス遺伝資源の保全に対応した高度生殖工学技術の開発と体細胞核移植技術への応用

研究課題名(英文) Application to somatic cell nuclear transfer technology and the development of advanced reproductive technology engineering corresponding to the conservation of mouse genetic resources

研究代表者

安齋 政幸 (ANZAI, Masayuki)

近畿大学・先端技術総合研究所・講師

研究者番号：30454630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣内に存在する未成熟な卵子の利用は、今後生殖補助医療分野への展開へ繋がる技術として考えられている。申請者は未成熟卵子を用いた体外成熟操作の改善と体外受精方法を検討し、近交系マウスを用いた産児作出に成功した。また成熟操作培地の開発を進め、卵子初期の遺伝子発現がアミノ酸構成要素により影響を与えることを認めた。さらに小型げっ歯類を供試して体細胞の樹立を検討し、得られた体細胞ストックは、体細胞核移植により再構築卵子を作成し活性化処理後、クローン胚の作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Use of immature oocytes present in the ovary is considered as technology leading to expansion into assisted reproductive medical field in the future. The applicant has succeeded in producing infants to consider in vitro fertilization method and improvement of in vitro maturation operation using the immature oocytes, were used inbred mice. It was also acknowledged that advances the development of maturation operation medium, gene expression of initial egg affects the amino acid component. The somatic cells stock to consider the establishment of the fibroblast cells by the tested small rodents further, obtained, after activation, we have succeeded in the production of cloned embryos to create a reconstructed embryo by somatic cell nuclear transfer.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：生殖工学 凍結保存 実験動物学 卵巣卵母細胞 体外成熟 体細胞核移植 野生マウス 遺伝資源の保存

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳動物の卵巣には様々な大きさの卵胞が存在し、この卵母細胞の大半は出生前に失われ(Nicholas *et al.*, 2010)、排卵するまでに大部分が回収されずに至っている(krysko *et al.*, 2008)。これらのことから、配偶子をより効率的に回収するために、卵巣内に存在する未成熟卵子の体外培養と発生能について様々な知見が得られ、現在、ウサギ、家畜、霊長類、ヒトにおいて体外成熟技術が開発されている(Handa *et al.*, 1999、Schramm *et al.*, 2000)。特にヒトにおいては、体外成熟卵子を用いることは患者の負担を軽減する不妊治療として有効な手段と考えられている(福田ら., 2001)。また、実験動物のマウスを用いた研究において Eppig らは、交雑種を用いた体外成熟卵子からの産子獲得に成功している(Eppig *et al.*, 1986)ものの、遺伝的差異の少ない近交系に由来する系統の産子獲得の報告はこれまで無く、各近交系マウス系統に有益な、卵子の成熟機構の解明と産子作出方法の実用化が急務である。

(2) 哺乳類の中で一番多い生物種であるげっ歯類は、開発による里山や河川の分断化にともなう生息地の減少、また集団の小規模化にともなって近親交配が増加した結果、集団内の遺伝的多様性の減少と遺伝的均一化が起きることによっても、生息数が減少していることが指摘されている(Charlesworth *et al.*, 2009)。このため、種の保存に関する活動として、生息域の環境保全と共に、野生のげっ歯類の生理機能や遺伝的多型に関する研究が行われている。また通常の繁殖活動でその種を保存することができない小集団では、遺伝的多様性の確保と遺伝的均一化の回避方法として、人工繁殖技術が期待されている。しかし、実験動物の遺伝資源の保存・増殖で実用化している生殖工学・発生工学技術である胚や配偶子などの生殖細胞の操作および遺伝子発現制御機構の解明そして生殖細胞

等の保存技術の標準化は、野生のげっ歯類では十分に確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、下記の3項目について重点的に検討することを目的とした。

(1) 近交系マウス由来卵巣内卵子を用いた効率的な繁殖技術の検討

(2) 卵母細胞内における成熟促進因子および卵成熟の活性化に関する検討

(3) 野生マウスを用いた低侵襲的な体細胞回収技術の確立および遺伝情報の獲得の検討

3. 研究の方法

本研究では、各研究目的を踏まえて、5項目について実施した。なお、本実験に関する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。

(1) 近交系マウス由来卵巣内卵子を用いた効率的な繁殖技術の検討

卵巣および卵巣内卵子の雌性生殖由来細胞の保存法および輸送方法を検討した。外科的処置により卵巣部分摘出を施すことで、申請者がこれまで開発した体外成熟方法(西村ら., 2010)やレーザー穿孔処理法(Anzai *et al.*, 2006)を用いた受精方法を組み合わせ、効率的な個体の増殖と遺伝資源の保存法を検討した。

(2) 卵母細胞内における成熟促進因子および卵成熟の活性化に関する検討

体外成熟卵子を用いて卵細胞質内存在下における種々の発現機構を探求する手段として、免疫組織化学的に検出する非放射性標識プローブを用いた *in situ* hybridization 技術にて、細胞質内における RNA 存在下蓄積領域の解析を進めた。

(3) 野生マウスを用いた低侵襲的な体細胞回収技術の確立及び遺伝情報の獲得の検討

比較的低侵襲的に回収が可能な組織(尾

部・耳部・上皮細胞等) から体細胞を取得し培養の後、細胞株の樹立を行った。体細胞クローン技術による樹立細胞の発生能の検討および塩基配列の決定等による遺伝情報の獲得を検討した。

4. 研究成果

本研究において、新たに得られた知見をまとめると以下の通りである。

(1) 近交系マウス由来卵巣内卵子を用いた効率的な繁殖技術の検討

本研究により、卵巣内卵子を用いて体外成熟後、体外受精により作出した初期胚を簡易ガラス化法および冷蔵保存が可能であることが示され、輸送した初期胚の一部は正常産児を獲得した。また、成熟雌卵巣の部分切除より回収した未成熟卵子を用いた体外成熟卵子の獲得および体外受精により産児の作出に成功した。

(2) 卵母細胞内における成熟促進因子および卵成熟の活性化に関する検討

マウス体外成熟培地 TaM へ 5%FBS を添加した修正 TaM 培地を開発し近交系マウスへの応用が可能になりその要因を単一卵子にて *in situ* により発現動態を可視化した。その結果、体外成熟操作で得られた卵子の一部は、成熟過程に密接に関わる Gdf9 因子を指標として Real-time PCR 及び *in situ* hybridization により観察した。さらに、活性酸素種の影響を蛍光プローブにより、単一卵子を観察した。回収した GV 期卵子を mTaM 培地、高純度アルブミン含有 mTaM 培地での体外成熟成績および発生した M 期卵子の体外受精成績には差は認められなかったものの、受精後の胚盤胞期への発生が (36% : 25/70, 63% : 55/88) 改善した。M 期卵子における遺伝子発現にお

いて、高純度アルブミン添加培地では早期の発現低下を抑制していることが示唆された。

さらに体外成熟培地へ培養された卵子細胞質において産生される細胞内活性酸素種においても同様に高純度アルブミン添加培地では体外成熟卵子の酸化抑制が示唆された。

(3) 野生マウスを用いた低侵襲的な体細胞回収技術の確立及び遺伝情報の獲得の検討

供試動物としてカヤネズミおよびアカネズミを用いた。それぞれのマウスから尾部の一部を採取した後、尾部片の一部を DNA 精製後、シークエンスにて得られた DNA の相同性を検索 (DDBJ) した。さらに、尾部片の一部は培養し線維芽細胞の樹立を行った。樹立した細胞は、DNA 抽出を行い同様に DNA の相同性を確認した。また、樹立した細胞を用いて凍結保存を行い、一部を融解後、正常性を染色体解析及び相同性検索にて評価した。融解後のそれぞれの細胞を核型解析した結果、カヤネズミ 85%(268/317)、アカネズミ 87%(87/100) と高い正常性が得られた。また樹立細胞より DNA 抽出を行い、得られたサンプルはそれぞれ 100% と高い相同性を得た。さらに細胞の機能性を体細胞核移植により活性化処理後、初期卵割を有することを確認した (カヤネズミ 70%(70/100)、アカネズミ 64%(75/118))。これらの結果より、展示動物由来による体細胞樹立における遺伝子資源管理システムの構築が可能であることが示された。

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)

[雑誌論文](計 13 件)

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. 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. 査読有. 2014. 19. 13-24.

<http://kurepo.clib.kindai.ac.jp/>

Ishizuka Y, Nishimura M, Matsumoto K, Miyashita M, Takeo T, Nakagata N, Hosoi Y, Anzai M. The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes. *Theriogenology*. 査読有. 2013. 80, 421-426.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.002

Hatanaka Y, Shimizu N, Nishikawa S, Tokoro M, Shin SW, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Kishigami S, Matsumoto K. GSE is a maternal factor involved in active DNA demethylation in zygotes. *PLoS One*. 査読有. 2013. 8: e60205.

DOI: 10.1371/journal.pone.0060205

Shin SW, Shimizu N, Tokoro M, Nishikawa S, Hatanaka Y, Anzai M, Hamazaki J, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Murata S, Matsumoto K. Mouse zygotespecific proteasome assembly chaperone important for maternal to zygotic transition. *Biol Open*. 査読有. 2013. 15; 2: 170-182.

DOI: 10.1242/bio.20123020

⑤Nishikawa S, Hatanaka Y, Tokoro M, Shin SW, Shimizu N, Nishihara T, Kato R, Takemoto A, Amano T, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Matsumoto K. Functional Analysis of Nocturnin, a Circadian Deadenylase, at Maternal-to-zygotic Transition in Mice. *Journal of Reproduction and Development*.

査読有. 2013. 59: 258-265.

<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2013-001>

Yamochi T, Kida Y, Oh N, Ohta S, Amano T, Anzai M, Kato H, Kishigami S, Mitani T, Matsumoto K, Saeki K, Takenoshita M, Iritani A, Hosoi Y. Development of interspecies cloned embryos reconstructed with rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) oocytes and cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fibroblast cell nuclei. *Zygote*. 査読有. 2012. 5: 1-9.

DOI: 10.1017/S0967199412000019

M. Nishimura, K. Fukumoto, Y. Nakamura, Y. Hosoi, T. Takeo, N. Nakagata and M. Anzai. Transport of 2-cell embryos produced by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) at cold temperatures (4 °C). *近畿大学生物理工学部紀要*. 査読有. 2012. 28. 109-116.

<http://kurepo.clib.kindai.ac.jp/>

西村愛美、中牟田裕子、福本紀代子、近藤朋子、春口幸恵、竹下由美、土山修治、石川裕子、石束祐太、細井美彦、三谷匡、竹尾透、中瀬直己、安齋政幸. マウス体外成熟由来2細胞期胚を用いた冷蔵輸送・保存方法の検討. *近畿大学生物理工学部紀要*. 査読有.

2012. 29. 33-42.

<http://kurepo.clib.kindai.ac.jp/>

西村愛美、石束祐太、杉本奈央、中家雅隆、中川隆生、東雅志、村井仁志、宮下実、三谷匡、細井美彦、安齋政幸. 外科的処置によるし低侵襲的卵巣回収方法および得られた未成熟卵子発生能の検討. *近畿大学先端技術総合研究所紀要*. 査読有. 2012. 17. 1-6.

<http://kurepo.clib.kindai.ac.jp/>

松浦悟、西村愛美、石束祐太、杉本奈央、中家雅隆、東雅志、三谷匡、細井美彦、安齋政幸. L-カルニチン添加体外成熟培地がマウス未成熟卵子由来初期胚の発生に与える影響. *近畿大学先端技術総合研究所紀要*. 査読有. 2012. 17. 9-16.

<http://kurepo.lib.kindai.ac.jp/>

Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Hum Gene Ther*. 査読有. 2011. 22(1):27-34. DOI : 10.1089/hum.2010.054

西村愛美、近藤健二、木我敬太、東佳澄、田部和宏、中川隆生、加藤博己、細井美彦、安齋政幸. QuantiGene ViewRNA を用いたマウス単一卵子での in situ hybridization 技術手法の確立. 近畿大学先端技術総合研究所紀要. 査読無. 2011. 16. 35-42.

<http://kurepo.lib.kindai.ac.jp/>

東佳澄、西村愛美、木我敬太、中川隆生、永井匡、岸昌生、細井美彦、安齋政幸. ウシ血清アルブミン非添加培地を用いた L-カルニチン添加における体外受精および発生能の検討. 近畿大学先端技術総合研究所紀要. 査読無. 2011. 16. 43-50.

<http://kurepo.lib.kindai.ac.jp/>

[学会発表](計 18 件)

東里香、中家雅隆、恵本哲矢、崎田恵、亀井美紅、三谷匡、加藤博己、宮下実、細井美彦、安齋政幸. 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. 日本実験動物技術者協会関東支部第 39 回懇話会 2014. 3. 7. 三島東レ研修センター (静岡).

M. Anzai, M. Nishimura, R. Azuma, M. Nakaya, M. Kamei, M. Sakita, H. Kato, T. Mitani, Y. Hosoi. Examination about the motherly control structure using the inbred line mouse immature oocytes. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013. 12. 3-6. 神戸国際会議場 (兵庫).

安齋政幸、松崎ひかる、村井仁志、中家雅隆、三谷匡、宮下実、細井美彦. 野生マウス由来繊維芽細胞の樹立による遺伝資源保存技術の構築. 第 47 回日本実験動物技術者協

会総会. 2013. 9. 27-28. 川崎医療福祉大学 (岡山).

安齋政幸、松崎ひかる、北原直弥、中家雅隆、三谷匡、細井美彦. ALBUMAX 添加体外成熟培地がマウス未成熟卵子の細胞質内酸化ダメージに与える影響. 第 31 回日本受精着床学会・学術講演会. 2013. 8. 8-9. 別府国際コンベンションセンター (大分).

安齋政幸、北原直弥、松崎ひかる、坂山浩彬、筒井れな、細井美彦. 体外成熟卵子を用いた各種培地が細胞内酸化ダメージに与える影響. 第 60 回日本実験動物学会総会 2013. 5. 15-17. つくば国際会議場 (茨城).

安齋政幸、北原直弥、松崎ひかる、坂山浩彬、筒井れな、細井美彦. マウス体外成熟培地への各アルブミン類の添加がその後の細胞質のクオリティーに与える影響. 日本実験動物技術者協会関東支部第 38 回懇話会 2013. 3. 2. 国立がんセンター (東京).

Kitahara.N, Nishimura.M, Matsuzaki.H, Azuma M, Sakayama.H, Tsutsui.R, Nakagata N, Hosoi.Y. Anzai.M. Effects of intracellular reactive oxygen species generation and developed of immature mouse oocytes were addition medium of high purity albumin. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012. 12. 11-14. 福岡国際会議場 (福岡).

Nakaya.M, Emoto.T, Kawaguchi.S, Takatu.H, Anzai.M, Hosoi.Y, Harata.M, Mitani.T. The effect of Trichostatin A on the dynamics of histone H2A variants in mouse somatic cell nuclear transfer embryos. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012. 12. 11-14. 福岡国際会議場 (福岡).

Matsuzaki.H, Murai.H, Kitahara.N, Nakaya.M, Sakayama.H, Tsutsui.R, Miyashita.M, Hosoi.Y. Anzai.M. Examined of wild mouse (*Apodemus Speciosus*) genetic resources preservation. 第 35 回日本分子

生物学会年会.2012.12.11-14.福岡国際会議場(福岡).

Anzai.M, Matsuzaki.H, Murai.H, Kitahara.N, Nishimura.M, Nakagata.N, Sakayama.H, Tsutsui.R, Sugimoto.N, Miyashita.M, Hosoi.Y. Study on Conservation of genetic resources using wild mouse. 第35回日本分子生物学会年会.2012.12.11-14.福岡国際会議場(福岡).

松崎ひかる、松浦悟、杉本奈央、北原直弥、中家雅隆、東雅志、三谷匡、細井美彦、安齋政幸. マウス体外成熟由来初期胚におけるアミノ酸添加がその後の胚発生に与える影響. 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会. 2012.8.30-31.大阪国際会議場(大阪).

安齋政幸、西村愛美、北原直弥、松崎ひかる、東雅志、酒井峻、加藤博己、中瀬直己、細井美彦. 体外成熟培地内へのALBUMAX添加が未成熟卵子の成熟改定における母性発現因子に与える影響. 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会. 2012.8.30-31.大阪国際会議場(大阪).

北原直弥、松浦悟、杉本奈央、松崎ひかる、東雅志、中家雅隆、三谷匡、細井美彦、安齋政幸. L-カルニチン添加体外成熟培地を用いたマウス未成熟卵由来初期胚が発生に与える影響. 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会.2012.8.30-31.大阪国際会議場(大阪).

安齋政幸、石東祐太、西村愛美、松浦悟、杉本奈央、東雅志、中瀬直己、細井美彦. C57BL/6未成熟卵を用いた受精培地にグルタチオン添加がその後の発生に与える影響. 第59回日本実験動物学会総会. 2012.5.24-26.別府国際コンベンションセンター(大分).

石東祐太、西村愛美、松浦悟、杉本奈央、東雅志、細井美彦、中瀬直己、安齋政幸. C57BL/6未成熟卵を用いた同系統凍結精子において受精培地にグルタチオン添加がも

たらす効果. 第59回日本実験動物学会総会. 2012.5.24-26.別府国際コンベンションセンター(大分).

西村愛美、石東祐太、松浦悟、杉本奈央、田上友貴、東雅志、細井美彦、中瀬直己、安齋政幸. 体外成熟培地へのALBUMAXの添加による体外成熟胚の胚発生への影響. 第59回日本実験動物学会総会. 2012.5.24-26.別府国際コンベンションセンター(大分).

N.Sugimoto, M.Nishimura, H.Murai, Y.Ishizuka, M. Miyashita, H.Kato, Y.Hosoi, M.Anzai. DNA extraction from wild mice using supervoltage extraction system Baro Cyclor. 第34回日本分生物学会年会. 2011.12.13-16.パシフィコ横浜(神奈川).

M.Nishimura, Y.Ishizuka, S.Matsuura, M.Azuma, Y.Hosoi, M.Anzai. Establishment of in situ hybridization technique with mouse single ovum using QuantiGene ViewRNA. 第34回日本分生物学会年会. 2011.12.13-16.パシフィコ横浜(神奈川).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安齋 政幸 (ANZAI, Masayuki)
近畿大学先端技術総合研究所・講師
研究者番号: 30454630

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし