

博士學位論文

マウス体細胞核移植胚の
胚移植前選別に関する基礎的研究

近畿大学大学院

農学研究科 バイオサイエンス専攻

大 畠 一 輝

博士學位論文

マウス体細胞核移植胚の
胚移植前選別に関する基礎的研究

平成 28 年 1 月 7 日

近畿大学大学院

農学研究科 バイオサイエンス専攻

大 畠 一 輝

目次

第1章 序論	4
第2章 twin 胚を用いた検討： Oct4、Sox2 の発現様式による選別	8
第1節 目的	
第2節 材料および方法	
第3節 結果および考察	
第3章 intact 胚を用いた検討：形態的特徴による選別	30
第1節 目的	
第2節 材料および方法	
第3節 結果および考察	
第4章 intact 胚を用いた検討： Oct4、Nanog の発現様式による選別	46
第1節 目的	
第2節 材料および方法	
第3節 結果および考察	
第5章 新たな選別法がマウスクローン作出効率に及ぼす影響	73
第1節 目的	
第2節 材料および方法	
第3節 結果および考察	
第6章 総合考察	84
要約	88
SUMMARY	91

發表論文	95
附表	96
引用文献	99
謝辞	112

第1章 序論

体細胞核移植技術は、分化した体細胞に全能性を獲得させることのできる唯一の手段である。その歴史は古く、Briggs と King が 1952 年に行った研究[1]にまで遡る。彼らは、ヒョウガエルの未受精卵の核を不活化し、同じくヒョウガエルの初期胚の核を移植することにより、オタマジヤクシが得られることを明らかにした。すなわち、未受精卵の細胞質には、発生の進んだ初期胚細胞の核の情報をリセット（初期化）する能力があることが明らかとなり、これをきっかけに核移植の研究は盛んに行われるようになった。そして、1962年に Gurdon らはアフリカツメガエルのオタマジヤクシの小腸細胞を核移植することによって、オタマジヤクシを作出し、カエルにまで発生したことを報告した[2]。よって、初期胚の細胞だけでなく完全に分化した体細胞も初期化が可能であることが明らかとなった。しかし、成体カエルの体細胞を用いた場合にはオタマジヤクシまでしか発生しなかった[3]。その後、核移植の対象は哺乳類へと移り、1983年 McGrath と Solter は、除核したマウス受精卵に、受精卵から得た核を融合することによって産子を得ることに成功した[4]。この報告により、哺乳類でも核移植が可能であることが明らかにされ、他の動物種でも研究が始まった。Willadsen は、レシピエント卵細胞質として未受精卵を用いることに成功し、ヒツジの未受精卵に 8~16 細胞期胚の細胞核を移植し産子を得たことを皮切りに[5]、着床前胚の細胞由来の産子はマウス[6]、ウシ[7]、ウサギ[8]、ブタ[9]で報告された。哺乳類では成体の体細胞から産子を得ることは難しいとされていたが、1997年に Wilmut らは成体雌ヒツジの乳腺細胞を除核未受精卵に移植することにより、産子を得たと報告した[10]。哺乳類における世界初の成体体細胞由来のクローン個体であり、ドリーと名付けられた。この報告が引き金になり、ヒツジでの実験手法を基に様々な動物種で成体体細胞を用いたクローンの作出が試みられた。1998年に Wakayama らがマウス[11]、本研究室がウシ[12]で、その後、ヤギ[13]、ブタ[14]、ガウル[15]、ムフロン[16]、ウサギ[17]、ネコ[18]、ラバ[19]、ウマ[20]、ラット[21]、ヤマネコ[22]、イヌ[23]、スイギュウ[24]、アカシカ[25]、シンリンオオカミ[26]、アイベックス[27]、ラクダ[28]の合計 20 種の動物で作出されている。この内、ガウル、ムフロン、ヤマネコ、シンリンオオカミ、アイベックスはドナー細胞とレシピエント卵子の種が異なる種間核移植によって作出された。

しかし、体細胞核移植によって作出されたクローン個体には様々な異常が報告されている[29,30]。また、クローン個体の作出効率も非常に低く[31]、実用

化には至っていない。本実験で用いたマウスでは、胎盤の肥大化、出産直後の死、そして、初期発生中の胚においても、ヒストンおよび DNA の修飾、遺伝子発現、染色体の動態など数多くの異常、すなわち受精卵とは様態が大きく異なっていることが報告されている[32,33]。特に、ヒストンのアセチル化、メチル化などのエピジェネティック修飾は核移植胚と受精卵で大きく異なる。エピジェネティック修飾は遺伝子の発現活性および抑制を制御し、胚発生に大きく関わっている。例えば、ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A を核移植胚の活性化培地に加えることで、マウスクローン効率は大きく向上する[34,35]。以前と比較して、クローン効率はわずかではあるが向上してきているものの、胎子まで正常に発生する核移植胚と、胚移植後に死んでしまう核移植胚の特徴はほとんど明らかとなっていない。そこで学位申請者は、胎子まで正常に発生する核移植胚を、受胎雌へ胚移植する前に選別できないかと考えた。図 1 には核移植の方法、初期胚の発生の模式図を示した。高発生能を有する核移植胚のみを胚移植することができれば、胚移植当たりのクローン効率は向上し、胚移植の労力の軽減や、代理母の削減につながる。特にウシは単胎動物であり、1 頭の代理母に対して胚を 1 個移植することが基本のため、高発生能を有する核移植胚の選別法を確立することができれば、非常に有用な手法となる。さらに、高発生能を有する核移植胚とそうでない核移植胚の特性を知ることができれば、今後のクローン研究や初期化機構の解明にも重要な知見となる。

核移植胚を初期胚で選別した例は非常に少なく、発生速度[36–38]、染色体の分配様式[39]で報告されているのみである。本研究では、家畜胚への応用を最終目的として、マウス核移植胚の形態的な選別法と、遺伝子発現様式による選別を試み、クローン効率を向上させることができるかどうかを、一卵性双子 (twin) 胚 (1 つの胚を 2 つに分けて得られる胚) と intact 胚 (完全なままの胚) を用いて検討した。第 2 章では、核移植由来 twin 胚を作出し、胚盤胞での遺伝子発現様式を指標とした選別法を検討した。第 3 章では、intact 胚を用いた 2 細胞期核移植胚の形態的特徴による選別法を検討した。続いて第 4 章では、intact 胚の胚盤胞における遺伝子発現様式による選別法を検討した。そして第 5 章では、本研究で検討した新たな選別法を用いることによって、マウスクローン効率を向上させることができるかどうかを検討した。

なお、本研究では実験動物であるマウスを用いるため、近畿大学動物実験安全委員会に申請書を提出し、許可を得た後、国が定める法律等および近畿大学動物実験規定を遵守して動物実験を実施した (第 2~5 章)。また、遺伝子組換

え実験は、近畿大学遺伝子組換え安全委員会に申請書を提出し、許可を得た後、国が定める法律等および近畿大学遺伝子組換え安全管理規定を遵守して実施した（第4、5章）。

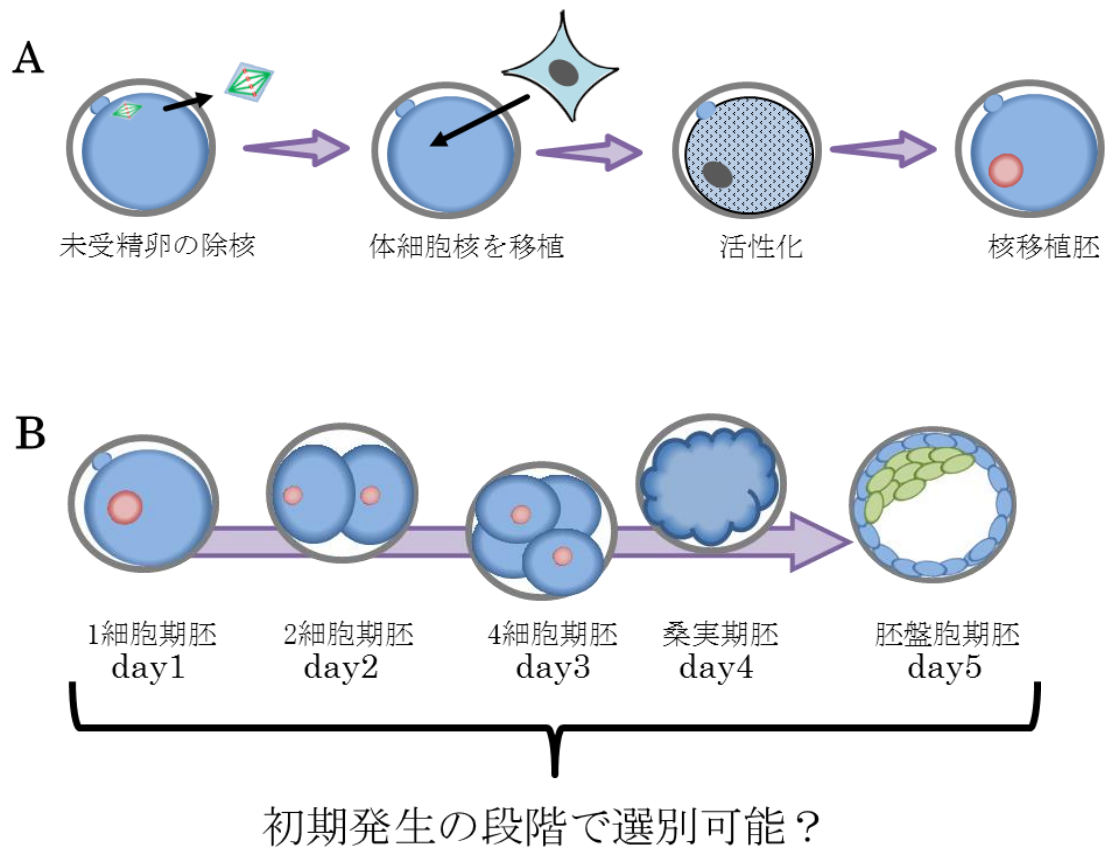


図 1. 体細胞核移植の手順 (A) と核移植胚の初期発生 (B)

第2章 twin 胚を用いた検討：Oct4、Sox2 の発現様式による選別

第1節 目的

マウス体細胞核移植胚の発生率は未だ低く改善が求められている[32,33]。核移植胚は、胚盤胞までは高率に発生するが、胚移植後の体内発生中にほとんどが死んでしまう[31]。しかし、異常のある核移植胚、異常のない核移植胚を選別しそれぞれの胎子への発生能を検討した例は少ない。初期発生の段階で、胚移植前に高発生能を有する胚を選別することができれば、移植胚数当たりのクローン効率は向上し、非常に有用な手段となる。遺伝子の発現活性、抑制は、細胞の生命維持にはかかせないが、核移植胚の初期胚での遺伝子発現様式は、体内受精卵と比較して大きく異なっていることが明らかとなっている[40]。このことから、胚発生を左右する因子である遺伝子発現は、発生運命を見極める指標になるのではないかと考えられる。学位申請者の研究室では以前、個々の核移植胚でも遺伝子発現様式は大きく異なっていることを明らかとした[41]。すなわち、体細胞核移植胚では、除核未受精卵へ核移植した直後から生じる「初期化」は、個々の核移植胚により異なる反応を示していることが分かる。このことから、得られた核移植の中から数個をピックアップし、その遺伝子の発現を解析しても、その結果が他の核移植胚の発現に反映されているとは限らず、遺伝子発現の解析と胚移植を同一胚で行う必要がある。遺伝子発現の解析には、通常PCR法や、マイクロアレイ法などを用いるが、このような解析に供した胚はそれ以上培養することはできない。そこで、本実験では一卵性の双子（twin）胚を作出することとした。twin 胚は1つの核移植胚から作出するため、同じ初期化状態を持つ核移植胚を2つ得ることができると考えられる。

選別の指標とする遺伝子には Oct4[42,43]、Sox2[44]を選択した。これらは共に、細胞の未分化能（多能性）を制御している遺伝子であり、iPS 細胞の樹立にも必須である[45]。Oct4 は初期胚において着床後胎子へと発生する ICM (inner cell mass：内部細胞塊) と胎盤へと発生する TE (trophectderm：栄養外胚葉) の分化を制御しており[46]、Oct4 欠損胚では胚盤胞以降発生できず、ICM の多能性も低い[47,48]。Sox2 は、Oct4 同様胚盤胞で活発に発現し、ICM、TE の分化に関与しており、Sox2 欠損胚ではエピブラストを形成できないため、胚盤胞以降発生することができない[44,49]。このように胚盤胞以降の発生に重要な Oct4、Sox2 であるが、核移植胚ではそれらの発現が体内受精卵と比較して大きく異なっていることを学位申請者の研究室では以前報告した[41,50]。このこと

から、Oct4、Sox2 の発現様式は核移植胚の発生能を推測する上で有効な遺伝子であると考えられる。

学位申請者は、修士論文で核移植由来の一卵性双子胚の体外培養条件について検討し、効率に胚盤胞を得られる培養法を確立した[51]。すなわち本実験では、核移植双子胚を培養して得られた双子胚盤胞の一方を遺伝子解析し、それと対になる胚盤胞を胚移植する方法によって核移植胚を選別する実験系の確立を目指した (図 2)。

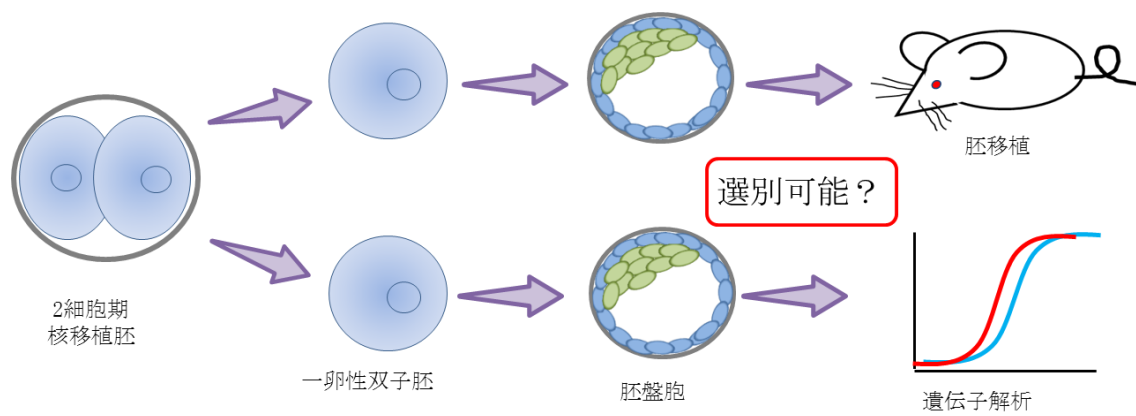


図 2. 一卵性双子胚を用いた核移植胚の選別の流れ

第2節 材料および方法

本研究で用いた操作培地 (M2 [52]) と培養培地 (KSOM [53])、Ca、Mg 不含リン酸緩衝液 (PBS⁻)、ダルベッコ修正イーグル培地 (DMEM [54,55]) の組成は付表に示した。また、マウスは7時~19時明期、温度 22±2°C、湿度 50±10%の飼育環境下で飼育した。

体内受精卵の回収

ICR 系雌マウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を 48 時間間隔で 5IU 投与することにより過剰排卵を誘起させた。hCG 投与後 20 時間目に頸椎脱臼法により屠殺し、卵管を採取した。屠殺から卵管の回収までは、農学部内の第二共同研究棟で行った。回収した卵管を M2 培地に入れて研究室に持ち帰った後、M2 培地中で卵管膨大部を裂くことにより得た卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を、300µg/ml ヒアルロニダーゼを含む M2 培地中に移し裸化した。卵丘細胞を完全に除去した卵子は、あらかじめ培養器内で 1 時間以上平衡 (37°C、5% CO₂、95% 空気) させておいた KSOM 培地に移し培養した。4~5 時間後に雌雄前核の確認をし、前核が形成されている卵子 (受精卵) のみを KSOM 培地で培養した。

体細胞核移植

体細胞核移植の方法は既報[11][34]を基に行った。以下にその詳細を示す。

・レシピエント卵とドナー細胞の準備

BDF1 系雌マウス (C57BL/6 雌マウスと DBA 雄マウスの交配により得られたマウス) に上記と同様の方法で過剰排卵を誘起させ、hCG 後 15 時間目で得られた COCs を裸化することによって第二減数分裂中期卵 (MII 期卵) を得た。得られた MII 期卵は KSOM 中で除核まで培養した。裸化時に得られた卵丘細胞はドナー細胞として用いるため 1.5ml チューブに入れた 1ml M2 培地中で核移植まで室温で静置した。

・除核

顕微操作用スライドガラス型チャンバー上に、12%ポリビニルピロリドン (PVP) 添加 M2 培地 (以下 PVP 溶液) のドロップ (微小滴) 1 つ、5µg/ml サイトカラシン B (CB) 添加 M2 培地のドロップ 3 つを 1.5µl で作成しミネラル

オイルで覆った (図 3A)。KSOM 中で培養していた M2 期卵をチャンバー上の除核操作ドロップに移した (1 回につき 20~30 個)。除核操作のピペットを準備した後、ピエゾドライブユニット (Prime Tech 社) を装着したマイクロマイニピュレーター (Narishige 社) を用いて少量の細胞質と共に第二減数分裂中期染色体を除去した (図 3B~E)。倒立顕微鏡の保温プレートは 37°C に設定した。除核操作で MII 期卵を培養器外に出している時間は約 15 分とした。除核した MII 期卵は KSOM 培地で良く洗浄し CB を除去後、KSOM 培地で少なくとも 1 時間培養した。

・核移植

ドナー細胞を保存しているチューブを遠心 (1500g、15 秒) 後、M2 培地を除去して 12% PVP 溶液を約 10 μ l 添加してドナー細胞懸濁液とした。チャンバーに、PVP 溶液ドロップ、ドナー細胞懸濁液ドロップ、M2 培地ドロップを 1.5 μ l で作成した (図 4A)。ドナー細胞注入操作ピペットをマイニピュレーターにセットし、KSOM 培地で培養していた除核 MII 期卵をチャンバー上の M2 ドロップに移した。ドナー細胞は、注入ピペットで数回ピペッティングすることによって細胞膜を破壊した後回収し、除核 MII 期卵に 1 つずつ注入した (図 4B~E)。注入操作は全て室温で行った。注入後の卵子は室温の M2 培地中で 10~15 分程度静置し細胞膜を修復させた後、KSOM 培地で培養した。培養器外に卵子を出している時間は細胞膜の修復も含めて 20~25 分とした。全ての除核 MII 期卵に注入後、核移卵を 100nM トリコスタチン A (TSA) を含む KSOM 中で 2 時間培養した。その後、100nM TSA、10mM 塩化ストロンチウム 6 水和物 (SrCl₂ · 6H₂O)、5 μ g/ml サイトカラシン B (CB) を含む Ca²⁺ 不含 KSOM で 6 時間培養することにより活性化処理を行った。活性化処理終了後、偽前核が形成された核移植卵を KSOM 培地に移し 2 細胞期まで培養した。

twin 胚の作出

2 細胞期まで発生した核移植胚は、スライドガラス型チャンバー上に作った M2 培地中に移した。透明帯の除去は倒立顕微鏡上でマイクロマイニピュレーターを用いて行った。すなわち、2 細胞期胚を固定ピペットで固定し、透明帯の円周 180 度ピエゾパルスによる微振動で穿孔し、ピペットでゆっくりと透明帯の外に押し出した (図 5A~C)。その後実体顕微鏡下で、胚よりわずかに直径が小さいピペットを用いて、2 細胞期胚をピペッティングすることによって割球を分離し、一卵性双子胚を作出した (図 6A)。

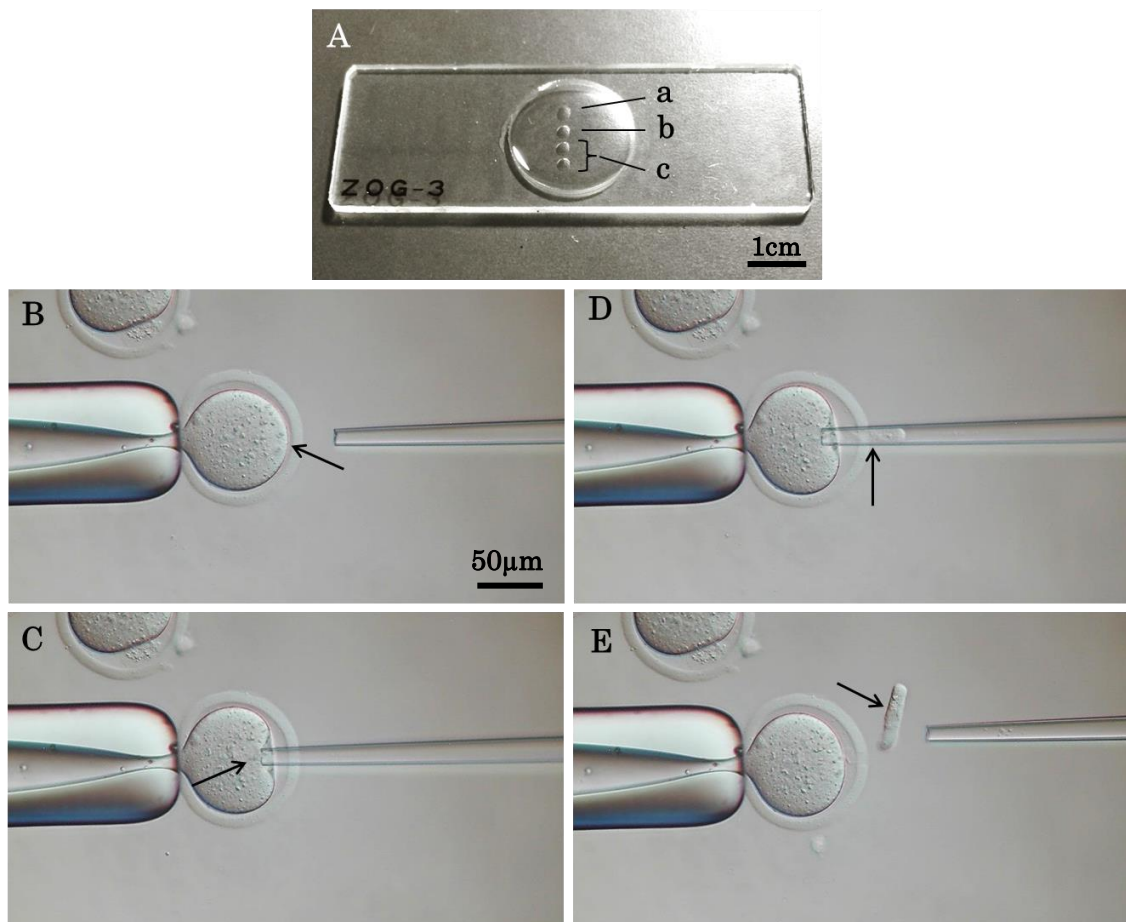


図 3. 除核操作

A) ガラスチャンバー (a : ピペット洗浄用 PVP 溶液ドロップ、b : ピペ
ット洗浄用 CB 添加 M2 培地ドロップ、c : 除核操作用 M2 培地ドロップ)
B~E) 除核操作の流れ (矢印 : 第二減数分裂中期染色体)

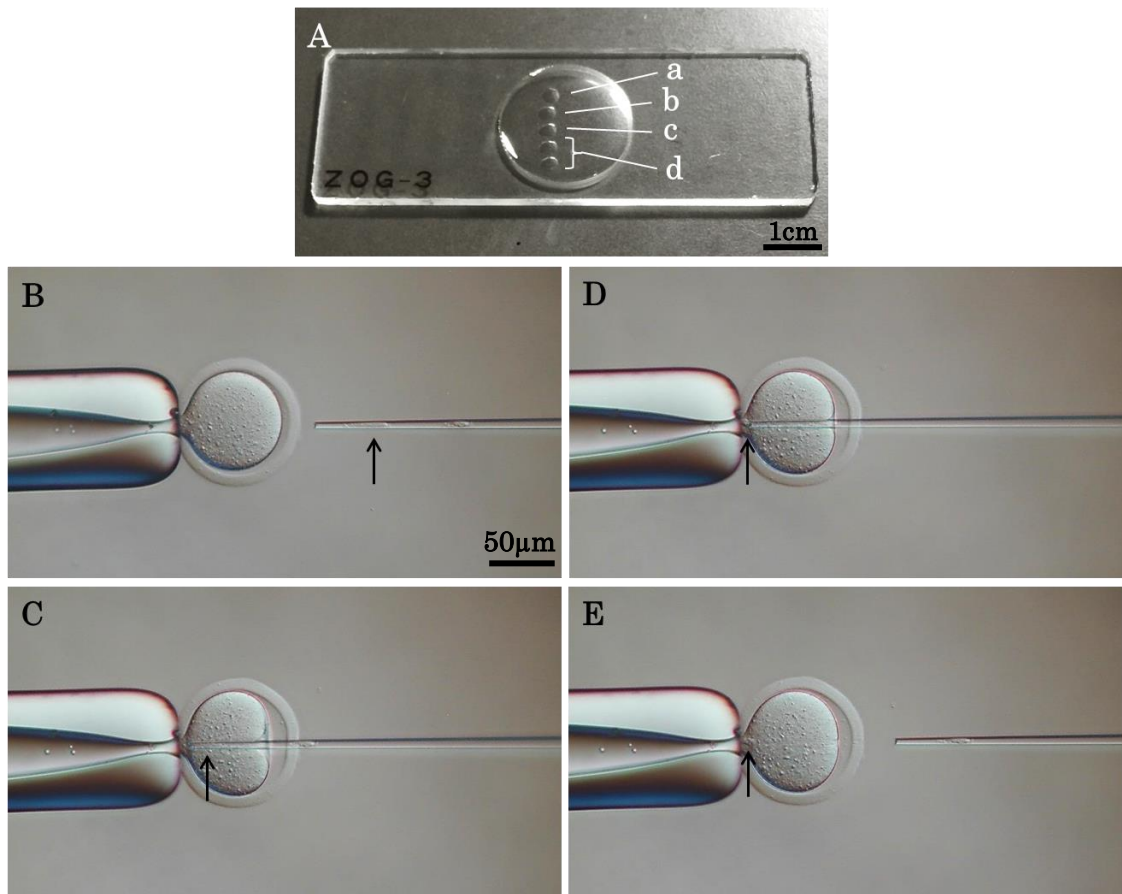


図 4. 注入操作

A) ガラスチャンバー (a : ピペット洗浄用 PVP 溶液ドロップ、b : ドナー細胞懸濁 PVP 溶液ドロップ、c : ピペット洗浄用 M2 培地ドロップ、d : 注入操作用 M2 培地ドロップ)

B~E) 注入操作の流れ (矢印 : ドナー細胞)

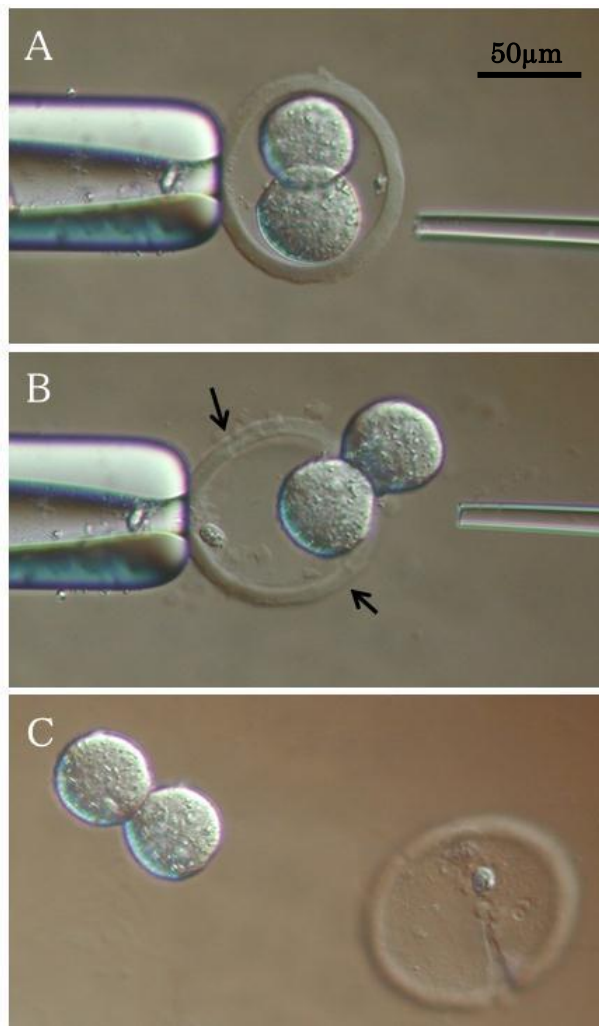


図 5. 機械的な透明帯の除去

- A) 保定ピペットで保定した 2 細胞期胚
- B) 矢印から矢印までの約 180° を穿孔
- C) ピペットで胚を押し出す

一卵性双子胚の体外培養

核移植双子胚の体外培養は WID (Well-in-Drop) 法[56]で行った。まず、培養ディッシュに 10 μ l の KSOM ドロップを作り、その上から滅菌した針を用いてディッシュの底に双子胚よりわずかに大きいサイズの穴 (well) を作った (図 6Ba、C)。1つの培地ドロップに対して well を 10 個作り (図 6Ba)、ドロップをミネラルオイルで覆った。核移植双子胚はその well に入れて培養した。さらに、体内授精卵 5 個を同一ドロップで一緒に培養した (図 6Bb)。すなわち、10 μ l の KSOM ドロップ中で、双子胚 5 ペア、体内受精卵 5 個培養することとなる (図 6B)。これらの胚は、核移植胚の活性化開始後 64 時間目で 2% (v/v) 必須アミノ酸、1% (v/v) 非必須アミノ酸を添加した KSOM (KSOMaa) 培地に 3.5mg/ml グルコースを添加した培地に移し換えた後、hCG 後 135 時間目に (図 6D) 胚盤胞への発生を観察した。

胚盤胞細胞数の計測

得られた胚盤胞は、hCG 後 135 時間目に蛍光二重染色法によって内部細胞塊 (ICM) と栄養外胚葉 (TE) を染め分け、それぞれの細胞数を計測した。染色は既報[57,58]に従い以下のように行った。まず、KSOM 培地で培養していた胚盤胞を M2 培地で洗浄し、pH 2.5 の酸性タイロド溶液に 30 秒程度浸すことによって透明帯を除去した。次いで、10% 抗マウス抗体を含む M2 培地中に 30 分間静置した後、10% ウシ胎子血清 (FBS) を含む M2 培地中で 5 分間静置することでブロッキング処理を行った。最後に、10% モルモット補体、10 μ g/ml プロピジウムイオダイド、10 μ g/ml ヘキスト (hoechst33342) を含む M2 培地中で 30 分間静置し、TE の細胞膜を破壊および細胞の染色処理を行った。70% エタノールで固定後、グリセロールを用いてスライドガラス上にマウントし、カバーガラスを上から置いた。蛍光顕微鏡下で UV 照射しながら胚盤胞を写真撮影し、細胞数を計測した。ICM は青色に、TE はピンク色に染色される (図 7B) ので、別々に計測した。

逆転写

hCG 投与後 135 時間目に核移植により得られた双子胚盤胞の一方を、PBS⁻で洗浄後 Lysis buffer 10 μ l ずつ分注したチューブに 1 つずつ入れた。逆転写の手順は Li らの報告[50]に従って行った。詳細を以下に示した。逆転写は Cells-to-cDNATM II Kit (Life Technologies) を用いて行った。Lysis buffer に溶解した胚を Heat block により 75 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱後、氷上にとった。遠心

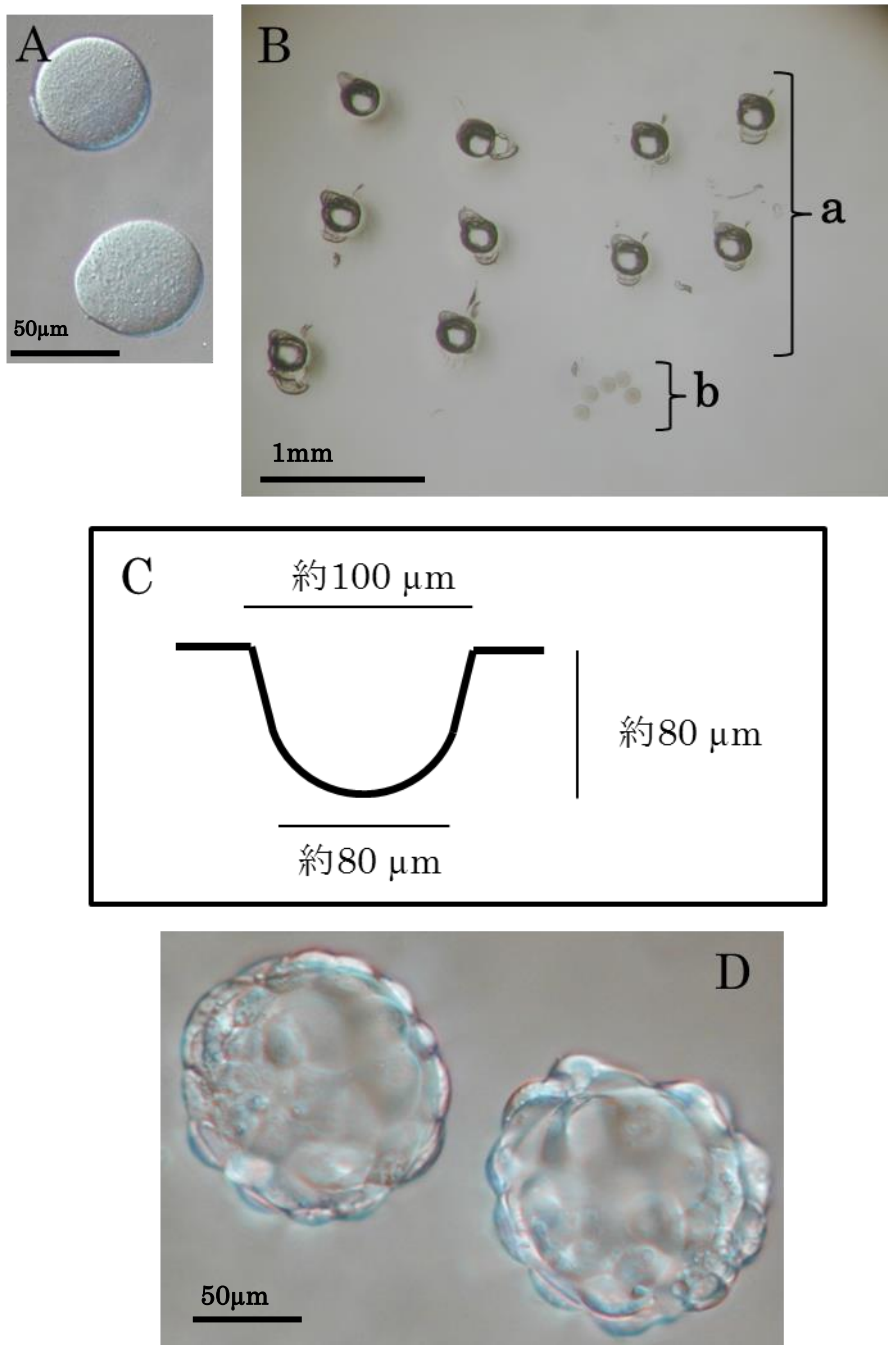


図 6. 双子胚の培養

- A) 2細胞期胚を分離して得られた双子胚
- B) 双子胚培養中の様子 (a: デッシュの底に作製したウェル (小穴)
b: 体内受精卵)
- C) ウェルのサイズ
- D) 得られた双子胚盤胞

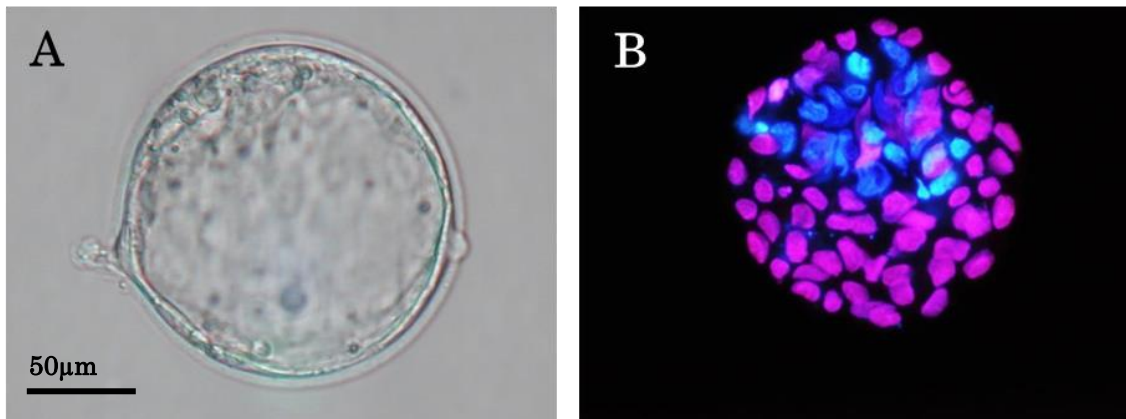


図 7. 明視野の胚盤胞 (A) と蛍光二重染色によって染色した胚盤胞 (B)
青 : ICM、ピンク : TE

後、DNase を 1 μ l 加え、遠心した。Heat block を用いて 37°C で 15 分、75°C で 10 分間加熱し、氷上に戻し、遠心をかけた。1 サンプルにつき dNTPmixture 4 μ l、random decamer 2 μ l、luciferase RNA 1 μ l をサンプル分混合し、7 μ l ずつ 0.5ml チューブに分注した。DNase 処理した lysate を 9 μ l ずつ上記のチューブに加え、混合し遠心をかけた。Heat block を用いて 70°C で 5 分間加熱し、直ちに氷上で冷やした後、遠心をかけた。次いで、1 サンプルにつき、RT buffer 2 μ l、M-MLV RTase 1 μ l、RNase Inhibitor 1 μ l をサンプル分混合し、4 μ l ずつ添加した。遠心後、Heat block を用いて 42°C で 60 分、その後 90°C で 5 分間加熱し、氷上に戻した後遠心をかけた。

リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は ABI Prism7000 (Applied Biosystems) を用いて、既報[50]に従い以下の手順で行った。Oct4、Sox2 の塩基配列とアクセション番号は表 1 に示した。Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l、Primer (forward) 0.05 μ l、Primer (reverse) 0.05 μ l、Probe 0.05 μ l、dH₂O 7.85 μ l をサンプル分混合し、18 μ l ずつ Optical tube に分注した。各プライマー、プローブの最終濃度は 0.1 μ M に合わせた。その後、cDNA 2 μ l を入れ、合計 20 μ l とした。Optical tube に Optical caps をはめこみ、マイクロプレート用遠心機で遠心し気泡を潰した。PCR 条件は、50°C 2 分、95°C 10 分、続いて 95°C 15 秒、60°C 1 分を 50 サイクルに設定した。PCR 終了後、データの解析は ABI Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems) による比較 Ct 法で行った。 Δ Ct 値、 $\Delta\Delta$ Ct 値を求め、相対的な遺伝子発現は $2^{-\Delta\Delta Ct}$ の計算式によって求めた。

胚移植

胚移植前日の夕方に ICR 系雌マウスの性周期を確認し、発情前期のマウスを精管結紮した ICR 系雄マウスと同居させ交配させた。翌日の朝に膣栓が確認できた雌マウス (偽妊娠 0.5 日目) をレシピエントマウスとして使用した。胚盤胞まで発生した核移植胚は、その日の夕方 (偽妊娠 1.0 日目) に以下のようにして移植した。レシピエントマウスに 10% ネンブタールまたはソムノペンチルを腹腔内に体重 1g 当たり 0.01ml を基準として投与した。麻酔が完全に効いたことを確認後、背中側を切開して卵巣、卵管を露出させた。あらかじめ M2 培地で洗浄しておいた胚盤胞を、パスツールピペットを用いて卵管に移植した[59]。1 つの卵管に対し双子胚盤胞を 1 つ移植し、他方の卵管には体内受精由来胚盤胞

表1. 本実験で用いたプライマーとプローブの配列

遺伝子名	プライマー、プローブ	配列 (5' → 3')	配列の位置	アクセシオン番号
Oct4	Forward	CCTGCAGAAAGGAGCTAGAACAGT	349-371	X52437
	Reverse	TGTTCTTAAGGCTGAGCTGCAA	515-494	
	Probe	TGAAAAGGTGTTTCAGCCAGACCACCAT	451-477	
Sox2	Forward	AAGATGCACAACCTCGGAGATCA	560-581	NM_011443
	Reverse	GCTTCTCGGTCTCGGACAAA	629-610	
	Probe	TTTCCACTCCGGCCCCCAGG	607-589	

を 5~10 個移植した。移植終了後、卵巣を体内に戻し切開した部位を実験動物手術用クリップで止め、イソジンで消毒した。移植マウスは白熱灯下に約 2 時間静置し回復させた。開腹検査は偽妊娠 12.5 日目、18.5 日目で行った。

統計解析

得られた結果において、発生率については χ^2 検定を、細胞数、遺伝子発現レベルについてはt検定を用いて統計解析を行った。

第3節 結果および考察

核移植由来の twin 胚の胚盤胞までの発生率を表 2 に示した。1 つの核移植胚から得られた 2 つの twin 胚が、両方とも胚盤胞へ発生した割合は 25%であった。

図 8 には、intact 体内受精卵、核移植胚、twin 体内受精卵、核移植胚の Oct4、Sox2 の発現レベルを示した。twin 核移植胚の Oct4 の発現レベルは、intact 体内受精卵と比較して大きくばらついており、有意に抑制されていた。また Sox2 に関しては、有意差はなかったものの Oct4 同様、twin 核移植胚で大きくばらついていた。そして、intact 体内受精卵における発現のばらつきは、平均を基準として Oct4、Sox2 共に約 0.2~5 倍であった。intact 体内受精卵は高率に胎子まで発生するため、これらのばらつきは適切な遺伝子発現の範囲であると考えられる。すなわち、核移植胚での発現レベルが intact 体内受精卵のばらつきの範囲内であれば、その核移植胚は高発生能を有していると考えられる。そこで本実験では、twin 核移植胚での発現レベルが intact 体内受精卵のばらつきの範囲内であれば「正常胚」、範囲外のものを「異常胚」とした。

続いて、得られた twin 胚盤胞の内、片方を遺伝子発現解析し、他方を胚移植した。その結果、twin 核移植胚の 21.9%は Oct4、Sox2 共に正常な発現レベルを示していた (表 3)。しかし、解析した胚盤胞とペアとなる胚盤胞を胚移植した結果、両方正常な胚を含む全ての twin 核移植胚からは、妊娠 18.5 日目 (満期)、12.5 日目 (中期) どちらにおいても胎子を得ることはできなかった (表 4)。妊娠中期においても胎子を得ることができなかったことから、twin 核移植胚の発生能は非常に低いと考えられる。

twin 体細胞核移植胚の発生能は低いが、twin 体内受精卵の発生能は高く、個体へも発生させることができる。哺乳類ではウシ[60]、ヒツジ[61]、ヤギ[62]、ウマ[63]、ブタ[64]、アカゲザル[65]、マウス[66]で、2 細胞期胚から胚盤胞期の胚を 2 つに分けることによって双子の個体が作出されている。体細胞核移植由来の双子 twin 胚から個体を得たという報告はなく、本実験でも胎子を得ることはできなかった。本実験では twin 胚は、透明帯を除去した 2 細胞期胚をピペッティングすることによって作出した。この際用いたピペットは、先端の直径が胚の割球より少し小さいピペットを用いた。2 細胞期胚を分離するためには仕方のないことではあるが、胚を圧迫してしまうことになる。しかし、Grygoruk らは胚の圧迫は、DNA のフラグメント化や細胞のアポトーシスを招くと報告している[67,68]ため、双子胚を作出する際のピペッティング操作は、低発生能の 1 つの原因として挙げられる。さらに、intact 体内受精卵、核移植胚、twin 体内

表2. 核移植胚由来双子胚の体外発生率

培養数胚(双子数)	胚盤胞数(%)	双子胚盤胞数(%*)
886(443)	358(40)	109(25)

* : 双子数から計算

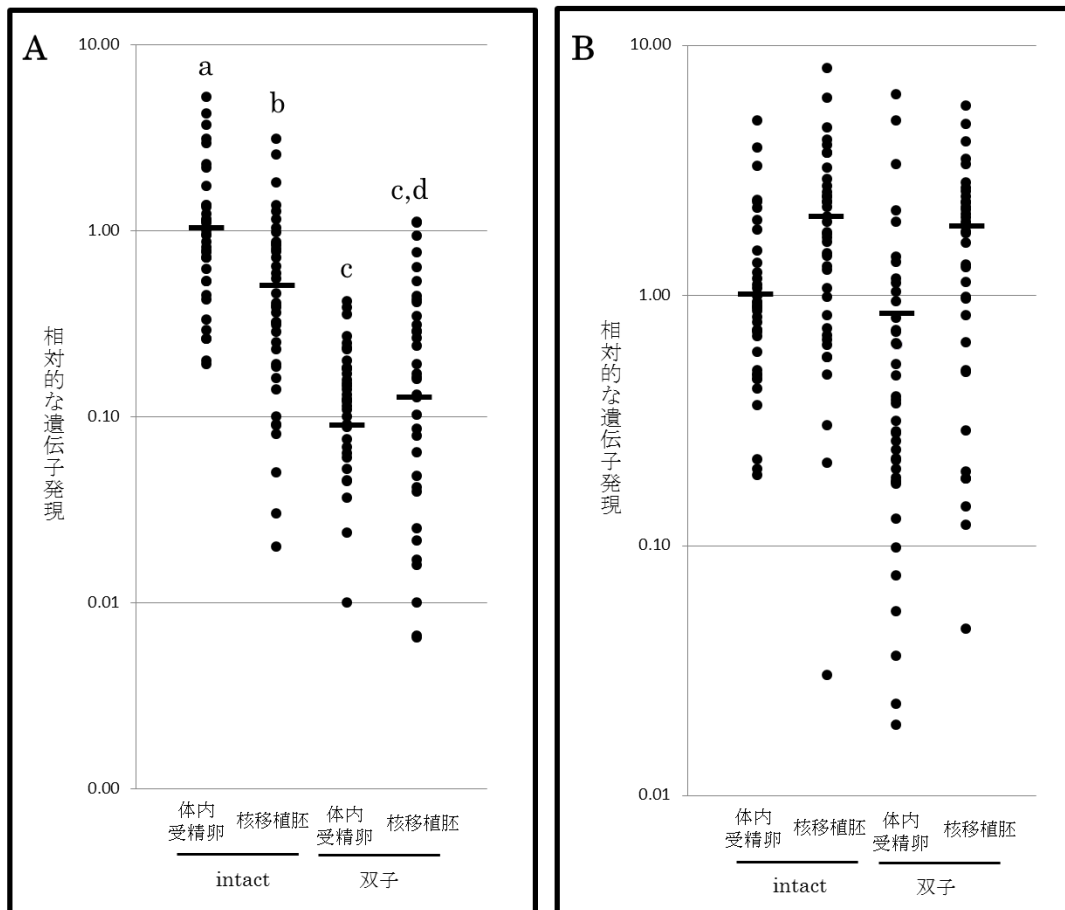


図 8. Oct4 (A) と Sox2 (B) 体内受精卵、核移植胚の intact、双子胚盤胞での相対的な遺伝子発現レベル

a-d : 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)。バーは平均値を示す。

表3. 核移植胚の胚盤胞での遺伝子発現レベルによる分類

供試卵数	グループ	胚数(%)
82	Oct4のみ正常	15 (18.3)
	Sox2のみ正常	15 (18.3)
	両方正常	18 (21.9)
	両方異常	34 (41.5)

表4. intact核移植胚とtwin核移植胚の体内発生率

開腹日	実験区	移植胚数	レシピエント数	生存胎子数(%)
18.5	intact	60	3	3(5)
	twin	41	21	0(0)
12.5	intact	53	2	6(11.3) a
	twin	41	25	0(0) b

a-b : 異符号間に有意差あり (p<0.05)

受精卵、核移植胚の胚盤胞の細胞数を比較したところ、twin 核移植胚の総細胞数は他 3 グループと比較して有意に少なかった (表 5)。特に、将来胎子を形成する ICM の細胞数は平均 5 個であり、intact 体内受精卵の約 1/6 と非常に少なく、胚盤胞以降へ発生しなかったものと考えられる。胚盤胞の細胞数は以降の発生に重要であり、発生能が低い核移植胚では胚盤胞の細胞数も少ない (表 5、6) [69]。胚盤胞の細胞数を増やす 1 つの方法として複数の胚を集合させる方法がある。初期胚は透明帯を除去し、胚同士を接着させるとその後 1 つの胚のように発生していく。核移植胚を集合させることによって胚盤胞の細胞数が増加し、さらに胚盤胞および胎子への発生率が向上することが報告されている [70,71]。しかし集合胚は複数の胚を用いることから、元のドナー細胞のクローンとは言い難く、本実験で適用することはできない。これらのことから、双子胚を用いた遺伝子発現様式による核移植胚の選別は困難であると考えられる。

本実験では、核移植胚の遺伝子発現を指標として胚移植前選別を試みた。21.9%の双子核移植で Oct4、Sox2 共に体内受精卵と同程度発現していたが、胚盤胞の細胞数が著しく少ないなど、双子核移植胚の発生能は非常に低く、新たな選別法の確立が必要であることが示唆された。

表5. intact胚とtwin胚の胚盤胞での細胞数

グループ	供試卵数	細胞数(平均±標準偏差)			
		ICM	TE	合計	
intact	体内受精卵	31	31.1±19.1 a	61.7±27.2 a	97.3±24.2 a
	核移植胚	32	14.8±3.8 b	31.8±8.8 b	46.6±11.3 b
twin	体内受精卵	38	8.1±3.6 c	43.1±11.3 c	51.2±12.4 b
	核移植胚	34	5.3±2.5 d	23.9±6.4 d	29.2±7.5 c

a-d : 異符号間に有意差あり (p<0.05)

表6. intact胚とtwin胚の体外発生率

グループ	胚発生数(%)		
	培養卵数	胚盤胞	
intact	体内受精卵	32	31(97) a
	核移植胚	58	36(62) b
twin	体内受精卵	63	38(60) bc
	核移植胚	271	34(13) d

a-d : 異符号間に有意差あり (p<0.05)

第3章 intact 胚を用いた検討：形態的特徴による選別

第1節 目的

前章の実験において、核移植胚由来 twin 胚は極めて発生能が低く、胚移植前選別に用いるのが困難であることが示唆されたため、第3章では intact 胚での選別法の確立を目指した。Intact 核移植胚の選別は、これまでに第一卵割の速度、染色体の分配様式で報告されている。Kobayashi らは核移植胚の第一卵割の速度によってその後の発生能が異なることを明らかにし[38]、初期胚の発生速度と胚発生能との関連性を証明した。また、核移植胚では初期卵割時に染色体分配異常が高頻度で起きる[72]ということから、Mizutani らは初期胚での染色体分配様式で核移植胚を選別した結果、選別が可能であることを明らかとしている[39]。しかし、前者の選別法は核移植胚を夜から朝にかけて数分ごとに観察しなければならず、後者の方法では胚をあらかじめ蛍光ラベルする必要があることや、培養器と蛍光顕微鏡が一体化した高価なシステムが必要になる。このため、簡便な選別法として、核移植胚の形態的な特徴で選別できないかと考えた。

核移植胚と体内受精卵の満期胎子への発生能を比較すると、大きく異なっている[50]。そのため、着床後の発生能を見極めるためには、着床直前の胚である胚盤胞の形態での選別が有効であると考えられる。しかし、核移植胚と体内受精卵の胚盤胞の形態を比較すると全く差はなく、多くの核移植胚の中から高発生能を有する胚のみを選別することは不可能であると考えられる。また、核移植胚の胚盤胞期での遺伝子発現レベルは大きくばらついているものの、その胚盤胞の形態では全く差がないことも明らかとなっている[41]。そこで、核移植後の初期胚を注意深く観察したところ、核移植胚では2細胞期胚の2つの割球の大きさが異なる胚が、多く存在することを見出した。2細胞期胚の割球間では、mRNA 代謝、細胞骨格[73]、細胞周期、分化に関連する遺伝子[74]、ミトコンドリア DNA 量[75]などが異なっていることが明らかとなっている。すなわち2つの割球は全く同じ性質を有しているのではなく、多くの遺伝子の発現レベルやタンパク質量が割球間で厳密に調節されていることが分かる。これらのことから、2細胞期の2つの割球サイズに大きな差が生じると、遺伝子発現レベルやタンパク質量の割球間の均衡が乱れ、その後の発生能に影響を及ぼす可能性がある。

また、マウス胚ではこの時期、胚発生に非常に重要な過程である胚性ゲノム

の活性化 (Zygotic gene activation: ZGA) が起こる。ZGA とは、受精後の発生に必要不可欠な膨大な数の遺伝子が新たに合成される時期のことであり、胚の発生には必要不可欠な現象である[76]。マウス胚における ZGA は、1 細胞期の G2 期から始まり 4 細胞期の初期まで続くため[77,78]、マウス胚にとって 2 細胞期胚はその後の発生を左右する重要な時期である。

これらのことから、2 細胞期の時点で高発生能を有する核移植胚の選別が可能なのではないかと考え、本章では 2 細胞期の割球サイズの差異が核移植胚のその後の発生能に及ぼす影響及び、高発生能を有する核移植胚の選別が可能かどうかを検討した。

第 2 節 材料とおよび方法

体内受精卵の回収

第 2 章と同様の方法で行った。

単為発生卵の作出

PMSG、hCG 投与により ICR 系雌マウスに過剰排卵を誘起させた。hCG 投与後 15 時間目で回収した COCs を裸化することにより MII 期卵を得た。KSOM 培地中で 2 時間培養した後、10 mM $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2 倍体処理のために 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CB もしくは、5 μM Latrunculin A (LatA)[79]を添加した Ca^{2+} 不含 KSOM 培地で 6 時間単為発生的活性化を付与した。活性化終了後、偽前核の形成が確認できた卵子のみを KSOM 培地で培養した。

体細胞核移植

レシピエント卵、ドナー細胞の回収から、除核、核移植までは第 2 章と同様の方法で行った。ドナー細胞を注入した MII 期卵は、100 nM TSA を含む KSOM 中で 1 時間培養した後、100 nM TSA、10 mM $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CB または 5 μM LatA を含む Ca^{2+} 不含 KSOM で 7 時間培養することにより活性化処理を行った。活性化処理終了後、偽前核が形成された核移植卵を KSOM 培地に移し 2 細胞期まで培養した。

割球サイズの測定と体外培養

hCG 後 45 時間目で 2 細胞期まで発生した体内受精卵、単為発生卵、核移植卵は、1 つずつ倒立顕微鏡下で撮影した。その後 ImageJ (NIH) を用いて割球のサイズを測定した。1 つの割球の長径と短径を合計した数値をその割球の割球サイズとして、2 つの内、数値が小さい割球を基準に比を算出した (図 9)。撮影後は、個々の胚発生の追跡を可能にするため、1 μl の KSOM 培地ドロップで胚を 1 つずつ培養した。核移植卵については、活性化後 64 時間目で 3.5 mg/ml グルコース添加 KSOMaa 培地に移し換えた[34]。

胚盤胞細胞数の計測

第 2 章と同様の方法で行った。

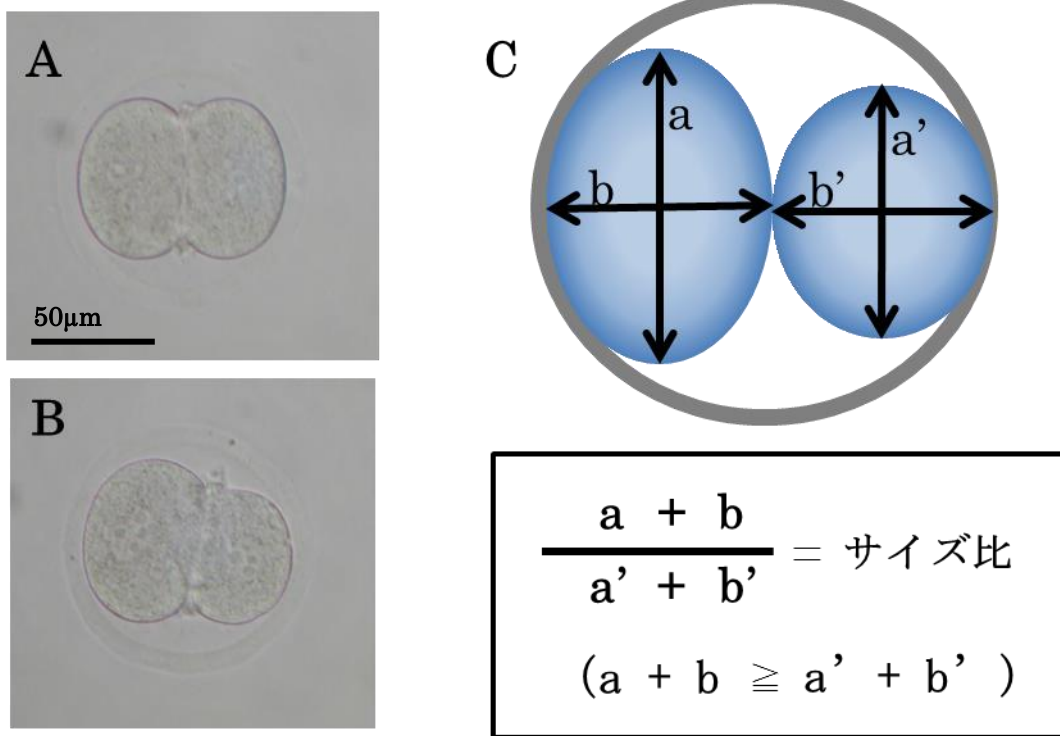


図 9. 等分裂胚 (A) および不等分裂胚 (B) と割球サイズの測定方法 (C)

胚移植

得られた胚盤胞は1つの卵管への移植数が10~15個となるように、第2章と同様の方法で胚移植した。開腹検査は偽妊娠18.5日目で行った。

実験デザイン

実験1： 2細胞期の割球サイズによる選別

まず、2細胞期胚の2つの割球サイズの比が、胚盤胞への発生にどのように影響を及ぼすのかを核移植胚、体内受精卵で検討した。胚盤胞まで発生した胚と途中で発生が停止、または変性した胚におけるサイズ比を比較し、選別の基準となる値を設定した。続いて、設定した基準を基に2細胞期胚の時点で選別し、胚盤胞への発生能と細胞数、満期発生能を比較した。

実験2： 第一卵割における不等分裂改善の試み

本実験では、核移植の方法によって第一卵割時の不等分裂を改善することができるかを検討した。アクチン重合阻害剤の種類の影響を検討するため活性化培地に添加するアクチン重合阻害剤にはCBまたはLatAを用いた。さらに、ドナー細胞を注入する位置が割球サイズ比に及ぼす影響について検討するため、ドナー細胞は細胞質の奥または中央に注入した。

統計解析

得られた実験結果は、体外発生および体内発生率に関しては χ^2 検定、胚盤胞での細胞数、割球サイズ、胎児および胎盤の重量に関してはt検定を行い、 $P < 0.05$ の場合に有意差ありと判断した。

第3節 結果および考察

実験1ではまず、核移植胚と体内受精卵の2細胞期における割球サイズの比較をした。2つの割球の内、小さい方を基準にしてサイズ比を求めたところ、体内受精卵では平均1.029であるのに対し、核移植胚では平均1.071であり核移植胚は2細胞期のサイズ比が有意に大きいことが明らかとなった(表7)。また核移植胚、体内受精卵において胚盤胞へと発生した胚と途中で発生が停止してしまった胚の2細胞期における平均サイズ比を比較すると、体内受精卵ではそれぞれ1.028、1.033で有意差はなかったが、核移植胚ではそれぞれ1.058、1.083と有意に大きかった(表7)。このことから2細胞期の時点で核移植胚の選別をする際の指標として、胚盤胞へ発生しなかった胚のサイズ比、すなわち1.083であることが適切であると考えた。2細胞期胚の割球サイズ比が1.083以上の胚、未満の胚で選別し、発生能の比較をした。桑実胚期への発生率は1.083以上の胚で63.3%、未満の胚で78%、胚盤胞への発生率はそれぞれ50.8%、36.7%であり、どちらも指標以上のサイズ比の胚で発生率は有意に低下した(表8)。しかし、サイズ比によって2グループに分けたそれぞれの胚の胚盤胞での細胞数を比較したが、選別したグループ間においてICM、TE、総細胞数全てで有意な差は見られなかった(表9)。続いて満期発生能を検討するため、これら2グループの胚移植を行ったが、着床率、満期胎子率共に差はなかった(表10)。これらのことから、2細胞期の割球サイズ比は胚盤胞への発生には影響するものの、発生速度や着床後の発生には影響を及ぼさないことが明らかとなった。すなわち、第一卵割時に不等分裂しても、胚盤胞まで発生した胚に関しては等分裂した胚と同等の着床後発生能を有していると考えられる。

サイズ比が大きいと、胚盤胞への発生能が低下する可能性が示唆されたことから、2細胞期の割球サイズ比と胚盤胞への発生率との関連性を検討した。体内受精卵ではサイズ比のばらつきは非常に小さいが、核移植胚では大きくばらついていることが分かる(図10)。核移植胚では2細胞期の割球サイズ比が1.1を超えると徐々に発生率は低下し、さらに、1.25を超えると胚盤胞へ全く発生しなくなることが明らかとなった。このことから、第一卵割時の不等分裂は、胎子への発生へは影響しないものの胚盤胞への発生には大きく影響し、2細胞期の割球サイズ比によって胚盤胞へ発生する核移植胚の選別が可能であることが明らかとなった。

表7. 核移植胚と体内受精卵の2細胞期における割球サイズ

	2細胞期胚数	平均サイズ (平均±標準偏差)			胚盤胞** 比	(平均±標準偏差)	n
		大	小	比*			
核移植胚	209	97.075 ± 3.168 ac	90.856 ± 3.765 bc	1.071 ± 0.067 c	0	1.058 ± 0.047 c	106
体内受精卵	81	98.224 ± 2.382 ad	95.527 ± 2.224 bd	1.029 ± 0.029 d	x	1.083 ± 0.081 d	102

* : 小さい方の割球を基準にした

** : oは胚盤胞へ発生した胚、xは発生しなかった胚

a,b : 同行内異符号間で有意差あり (p<0.05)

c-e : 同列内異符号間に有意差あり (p<0.05)

表8. 2細胞期の割球のサイズによる選別（体外発生成績）

サイズ比	培養数	胚発生数（%）	
		桑実胚	胚盤胞
<1.083	386	301 (78) a	196 (50.8) a
≥1.083	207	131 (63.3) b	76 (36.7) b

a,b：同列内異符号間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

表9. 割球サイズの違いが胚盤胞での細胞数に及ぼす影響

サイズ比*	n	細胞数 (平均±標準偏差)		
		ICM	TE	合計
<1.083	70	14.1 ± 4.2	31.2 ± 11.4	45.3 ± 13.1
≥1.083	24	13.5 ± 4.9	28.8 ± 12.4	42.2 ± 16.0

* : 胚盤胞へ発生しなかった胚の2細胞期における割球サイズ比の平均を基準にした

表10. 2細胞期の割球のサイズによる選別（満期発生成績）

グループ	移植胚数	着床率	胎子数 (%)			重量(g, 平均±標準偏差)	
			生存	死亡	胎盤数	胎子	胎盤
x < 1.083	163	78 (47.9)	2 (1.2)	0	5	1.023±0.055	0.206±0.065
x ≥ 1.083	72	36 (50)	1 (1.4)	0	1	1.279	0.267

x : 2細胞期における2つの割球の比

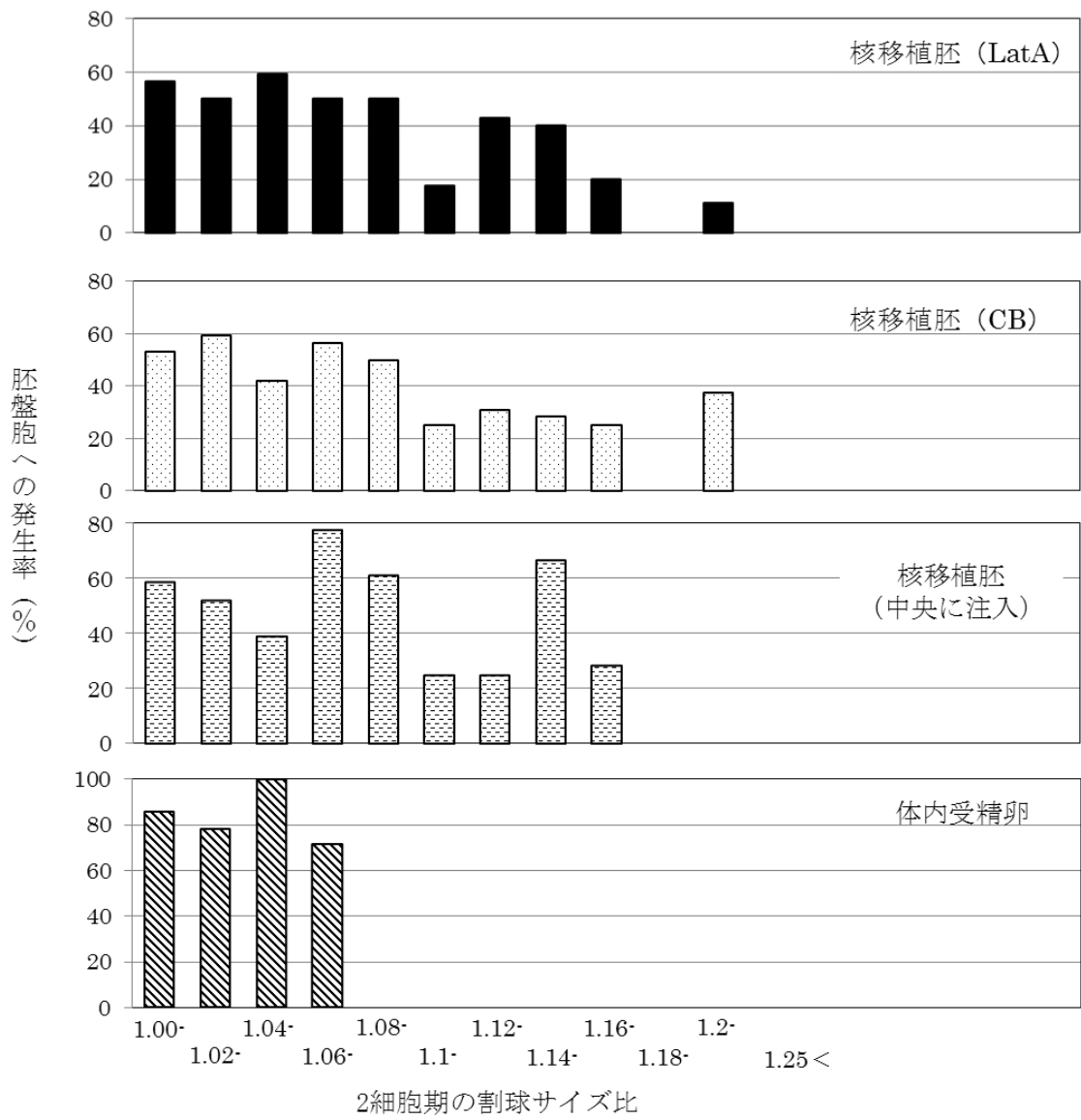


図 10. 核移植胚と体内受精卵の 2 細胞期における割球サイズ比と胚盤胞への発生能

このように、不等分裂胚の胚盤胞への発生能は低く、これを改善することができれば核移植胚の発生率を向上させることができると考えられる。そこで実験 2 では核移植の方法を変えることで、不等分裂を改善することはできるかどうかを検討した。CB と同様に、アクチン重合阻害剤であり卵子の 2 倍体処理に用いられるのが LatA であるが、アクチンへの働き方は異なる。CB は F アクチンと結合して、G アクチンの F アクチンへの結合を阻害することによって重合を阻害する[80]のに対して、LatA は G アクチンと結合して、重合を阻害している[81]。LatA を核移植胚の 2 倍体処理に用いると核移植胚の発生能が向上することが報告されているため、LatA の 2 細胞期の割球サイズへの影響を検討した。しかし、割球サイズ比は CB を用いた場合で 1.076、LatA を用いた場合で 1.073 であり差はなく、アクチンの重合阻害の方法は第一卵割の機構には影響しないと考えられる(表 11)。また、未受精卵に 2 倍体処理をして単為発生的活性化を与えると、卵子のゲノムのみを持つ単為発生卵を作出することができる。そこで、単為発生卵についてもこれらの試薬が第一卵割に及ぼす影響を検討した。その結果、CB、LatA を用いた場合で差はなかった(表 12)。単為発生卵のサイズ比は核移植胚と比較すると小さい傾向にあったが、体内受精卵と比較すると有意に大きかった。これらのことから、アクチン重合阻害剤を卵子に作用させると、第一卵割で不等分裂が起こりやすいことが示唆された。アクチンは細胞質を半分に絞りきるようにして細胞質を 2 つに分ける働きがある[82]。すなわち、単為発生卵や、核移植胚ではアクチンによる細胞質分裂を阻害するため(第二極体の放出を抑制するため)、重合阻害剤を作用させている。しかし、アクチンは卵細胞質内での染色体の配置に深く関与している[83,84]。また、未受精卵に精子が侵入すると、雌雄の前核はお互い引き寄せ合いながら卵細胞質の中央に位置するようになる[85]が、この移動には細胞骨格系タンパク質であるアクチンやチューブリンが関与している[86]。これらの細胞骨格系タンパク質はお互い協調してはたらいっているが、核移植胚ではこのチューブリンが機能的に異常(受精卵とは大きく異なる)になっていることが明らかとなっている[87,88]。これらのことから、アクチン重合阻害を作用させると、アクチンを含めた細胞骨格系タンパク質の制御に異常をきたし、核が細胞質の中央に移動するタイミングがずれることや、核を中央へ留める能力が低くなる可能性が考えられる。すなわち、活性化後このような試薬を培地から除いても、アクチンが正常に再構成される前に細胞質の分裂が起こり、不等分裂を起こしていると考えられる。

核を中央に移動、維持させる能力が低いのであれば、核移植時にドナー細胞を最初から細胞質の中央に注入すれば、核の移動距離は短くなり不等分裂が改

表11. アクチン重合阻害剤の種類が第一卵割様式に及ぼす影響

グループ	2細胞期胚数	割球サイズ比 (平均±標準偏差)	胚盤胞数 (%)
CB	115	1.076 ± 0.057	57 (49.6)
LatA	106	1.073 ± 0.06	56 (52.8)

表12. 単為発生的活性化が第一卵割様式に及ぼす影響

グループ	2細胞期胚数	割球サイズ比 (平均±標準偏差)	胚盤胞数 (%)	
単為発生卵	CB	78	1.057 ± 0.05 a	74 (94.9)
	LatA	83	1.048 ± 0.048 a	78 (94.0)
核移植胚 (CB)	56	1.069 ± 0.059 a	30 (53.6)	
体内受精卵	51	1.027 ± 0.031 b	49 (96.1)	

a,b : 異符号間に有意差あり (p<0.05)

善できるかもしれない。そこで続いて、ドナー細胞の注入位置が第一卵割に及ぼし影響を検討した。ドナー細胞を細胞質の奥に注入する方法（通常の方法）と中央に注入する方法を検討した結果、2細胞期の割球サイズ比はそれぞれ、1.074、1.069であり差はみられなかった（表 13）。よって、ドナー細胞を注入する位置は、第一卵割の様式に影響を及ぼさないことが明らかとなった。未受精卵に精子を直接注入し受精させる方法である、卵細胞質内精子注入（ICSI）法では、精子を注入する位置によって異常受精などが起こることが報告されている[89–92]が、核移植時のドナー細胞の注入位置では、第一卵割の様式や胚盤胞への発生能には影響しなかった。このことから、核移植胚では雌性前核との相互作用がないことや、細胞骨格系タンパク質の制御が乱れることで第一卵割時に不等な分裂を起こすと考えられる。

本実験では、2細胞期の形態、すなわち第一卵割時の不等分裂が核移植胚の発生能に及ぼす影響を検討し、2細胞期の形態で核移植胚の選別が可能かどうかを検討した。その結果、2細胞期の割球のサイズ比を指標にすることによって、胚盤胞期まで発生する核移植胚の選別が可能であることを明らかとした。核移植胚で多く見られる不等分裂を改善することができれば、発生能を向上させることができると考えられる。

表13. ドナー細胞を注入する位置が第一卵割様式に及ぼす影響

グループ	2細胞期胚数	割球サイズ比 (平均±標準偏差)	胚盤胞数 (%)
奥	103	1.074 ± 0.065	51 (49.5)
中央	116	1.069 ± 0.054	55 (47.4)

第4章 intact 胚を用いた検討：Oct4、Nanog の発現様式による選別

第1節 目的

前章では、胚盤胞ならびに 2 細胞期の形態での選別を試み、胚盤胞へ発生する核移植胚を選別することができたものの、満期胎子への発生能の指標となるまでには至らなかった。そこで本章では、遺伝子の発現を指標とした選別を試みた。

twin 胚を用いた第 2 章の選別法では、胚を 1/2 にしたため細胞数が少なくなり、胎子が得られず核移植胚の選別法としては適さないことが明らかとなった。そのため、細胞数を減らすことなく胚全体で遺伝子発現の観察と胚移植を同一胚で行うことが必要である。そこで、指標遺伝子に GFP を組み込み、生存性を損なうことなく遺伝子発現を可視化することによって、胚全体の発現様式を観察する方法を試みた。本法によって作出された核移植胚は、蛍光顕微鏡下で遺伝子発現の観察が可能になるため、遺伝子の発現様式と胚移植後の発生能の関連性を検討することが可能である。なお、GFP を組み込むことは胚の生存性を損なわないことが報告されている [93]。選別の指標とする遺伝子には、Oct4[42,43]と、Nanog[94]を選択した。

未分化マーカーである Oct4 は、胚盤胞で活発に発現しており、ICM、TE 分化、ICM の多能性維持に関与している [48]。このことから体細胞に多能性を獲得させるには重要な因子である [45]。Oct4 を欠損させた胚では、胚盤胞までは発生するものの ICM の多能性が低いことが報告されている [47]。

Nanog は Oct4 同様、体細胞の初期化には重要な遺伝子であり、初期胚においては胚盤胞期の ICM で高い発現レベルを示す [95]。その後 ICM の一部はエピブラストと呼ばれる胎子を構成する細胞群へと分化するが、Nanog はこのエピブラストの形成に必要不可欠な遺伝子であり [94,96]、Nanog 欠損胚は胎子まで発生することはできない [94]。これらのことから、Nanog は胚盤胞期の ICM での発現が重要であり、着床前後の胚発生を制御している主要な遺伝子の 1 つであることが分かる。これらのことから、Oct4 と同様に Nanog は着床時期の胚にとっては非常に重要であるため、その発現様式によって後の発生能は大きく左右されると考えられる。

核移植胚ではこれらの遺伝子の発現が異常であることが報告されている [50,97,98]。すなわち、着床前後の発生に不可欠なこれらの遺伝子の発現が胚盤胞で乱れているため、ほとんどの核移植胚は胚移植後に発生を停止しているも

のと考えられる。そこで本実験では、着床前後の発生に特に重要である Oct4、Nanog の遺伝子に GFP を融合させた遺伝子改変 (Tg) マウスから得られたドナー細胞を用いて核移植を行い、これらの遺伝子の胚盤胞での発現様式と、胚移植後の発生能との関連性を検討した。遺伝子発現様式によって核移植胚を選別し、胚移植後の発生能との関連性について検討した例はなく、本実験で得られる結果は核移植胚の特性を知るうえで重要な知見となる。

第 2 節 材料および方法

体内受精卵の回収

BDF1 雌マウスに第 2 章と同様の方法で過剰排卵を誘起させた後、C57BL/6 (Nanog - GFP+/+) 雄マウス[99]、または C57BL/6 (Oct4 - GFP+/+) 雄マウス[100]と交配させ、hCG 後 20 時間目で体内受精卵を回収した。得られた体内受精卵は KSOM 培地で hCG 後 116 時間目まで培養し、一部は hCG 後 140 時間目まで培養した。なお、これら 2 種の Tg 胚は体内受精由来の凍結保存 2 細胞期胚を、理研バイオリソースセンターより購入した (系統 No.はそれぞれ、RBRC02290、RBRC00771)。融解後、偽妊娠 ICR 雌に胚移植することによって得られた雄 Tg マウスを本実験の交配に用いた。

体細胞核移植

・レシピエント卵とドナー細胞 (卵丘細胞) の準備

レシピエント卵は BDF1 マウスの MII 期卵を用いた。MII 期卵の回収は第 2 章と同様の方法で行った。ドナー細胞には、C57BL/6 (Nanog - GFP+/+) 雄マウス、または C57BL/6 (Oct4 - GFP+/+) 雄マウスと BDF1 雌マウスを交配させて誕生した雌マウス (Nanog - GFP+/- または Oct4 - GFP+/-) から採取した卵丘細胞を用いた。卵丘細胞の回収のための過剰排卵、採卵、裸化の操作は MII 期卵の回収と同様に行った。裸化後に得られた卵丘細胞は、1.5ml の M2 培地の入ったチューブに移し、注入操作まで室温で保存した。

・脾臓細胞の回収

C57BL/6 (Nanog - GFP+/+) 雄マウスと BDF1 雌マウスを交配することにより誕生した雌マウスを頸椎脱臼法により屠殺後、脾臓を回収し、PBS で表面に付着した血液を洗浄した。ハサミを用いて PBS 中で脾臓を細かく切り刻んだ後、1.5ml チューブに移してホモジェナイズすることによって細胞を遊離させた。その後メッシュを通して細胞を濾しながら 15ml チューブに移した。遠心 (300g、5 分) 後上清を除去した。そこに赤血球溶解液 (155 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃、2 mM EDTA) を添加してピペティング後、室温で 5 分静置した。遠心後上清を除去し、M2 培地を添加、遠心して細胞を洗浄した。上清を除去した後、細胞凍結保護液 (DMEM、FBS、ジメチルスルフォキシド (DMSO) を 4 : 5 : 1 の割合で混合) を細胞濃度が 3 × 10⁵ cells/ml になるように添加し、500 μl ずつ分注して -80°C で保存した。ドナーとして使用する際は、37°C のウォーターバス

で半分ほど融解させた後、37°Cに温めた M2 培地を 1ml 添加して完全に融解させた。M2 培地で 2 回洗浄後、卵丘細胞と同様に室温 M2 培地中で注入時まで静置した。

- ・ 除核

除核操作は、第 2 章と同様に行った。

- ・ 核移植

Tg マウス由来の卵丘細胞、脾臓細胞をドナーとして用いた核移植は、第 2 章と同様に直接注入法で行った。活性化処理においても第 2 章と同様の方法で行った。偽前核の形成が確認できた核移植胚は、KSOM 培地で培養し、活性化後 64 時間目で 3.5 mg/ml グルコース添加 KSOM-AA 培地に移し換え、胚盤胞期 (day5 : hCG 後 116 時間目) まで培養した。

核移植胚盤胞の選別

hCG 後 116 時間目に、胚盤胞を 1µl の M2 培地に 1 つずつ移した。GFP フィルターをセットした倒立顕微鏡下で BV ライトを照射し、カメラのシャッタースピードは 1/2 秒に固定して 1 つずつ撮影した。倍率は 400 倍 (接眼 10 倍、対物 40 倍) に固定した。得られた画像を確認して、Oct4 - GFP 核移植胚は、高発現 (++) 胚、中発現 (+) 胚、低発現 (±) 胚の 3 グループに分けた (図 11)。Nanog - GFP 核移植胚に関しては予備実験において、核移植胚では受精卵の発現様式とは異なり、胚全体で発現している胚も多く見られたため、ICM、TE 両方で発現している (IT) 胚、ICM のみで発現している (I) 胚、低発現 (L) 胚の 3 グループに分けた (図 12)。

胚移植

1 つの卵管に対して 10~15 個の胚盤胞を、第 2 章と同様の方法で胚移植した。開腹検査は偽妊娠 12.5 日目または 19.5 日目で行った。

実験デザイン

実験 1 : Nanog または Oct4 の発現様式によるマウス体細胞核移植胚の選別

本実験では、胚盤胞での Nanog、Oct4 の発現様式を指標として、高発生能を有する核移植胚を胚移植前に選別することはできるかどうかを検討した。

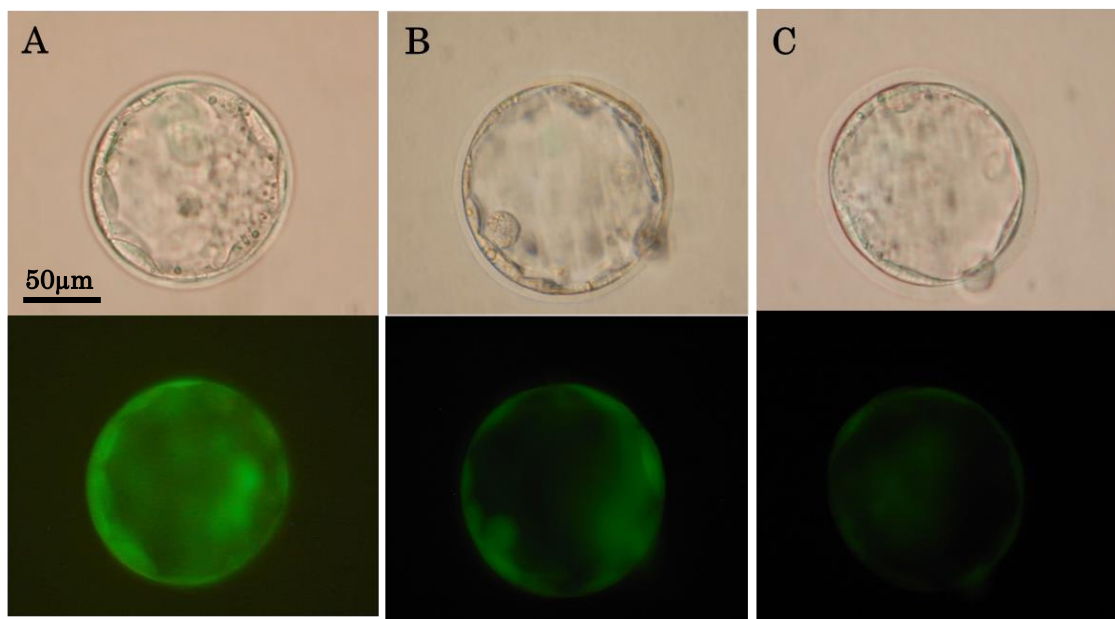


図 11. Oct4 - GFP 核移植胚の胚盤胞での蛍光様式
A) 強発現 (++)、B) 中発現 (+)、C) 低発現 (±)

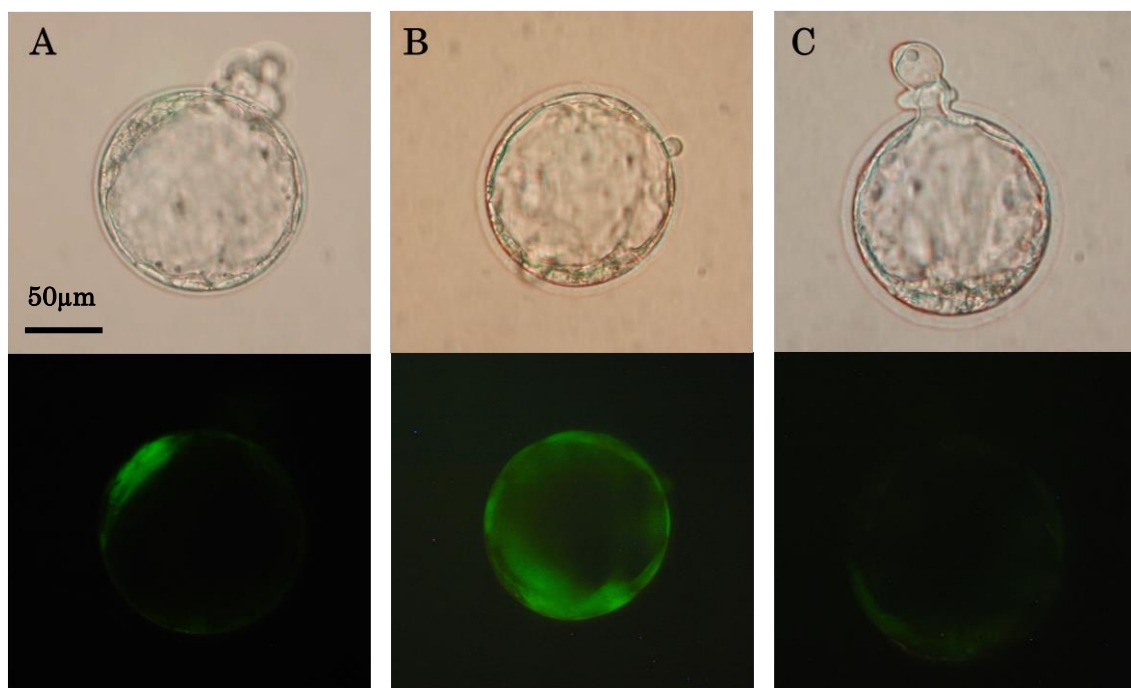


図 12. Nanog - GFP 核移植胚の胚盤胞での蛍光様式

- A) ICM のみに発現 (I)、B) ICM、TE 両方で発現 (IT)、
 C) 低発現 (L)

実験 2 : day6 胚盤胞における発現様式の観察

実験 1 では選別と胚移植を day5 で行ったが、その時の発現様式が今後どのように変化していくのかを検討するため、実験 2 では day5 で発現様式を観察した後さらに 24 時間培養して day6 での発現様式を観察した。day5 での発現様式を観察する際は、ミネラルオイル下に作成した 1 μ l の KSOM 培地に胚盤胞を移して行い、撮影終了後はそのまま培養器内で培養した。24 時間後、同様の条件で発現様式を撮影した。

実験 3 : 脾臓細胞を用いた場合の Nanog の発現様式と発生能に及ぼす影響

卵丘細胞以外の体細胞をドナーとして作出した核移植胚の、胚盤胞期における遺伝子発現様式と発生率との関連性を検討した。本実験では、脾臓細胞をドナーとして核移植を行った。

統計解析

得られた実験結果は、体外発生率、着床率、胎子率、発現様式の割合に関しては χ^2 検定、胎盤及び胎子重量に関しては t 検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判断した。

第3節 結果および考察

実験1ではまず、本実験で用いたTGマウス由来の卵丘細胞をドナーとした核移植胚が、胚盤胞、そして胎子まで発生するかどうかを最初に検討した。Oct4 - GFP核移植胚の胚盤胞への発生率は61.3% (表14)、Nanog - GFP核移植胚の胚盤胞への発生率は、49.8% (表15)と、どちらのドナー細胞でも高率に胚盤胞を得ることができた。また、これらの胚盤胞をレシピエントマウスに胚移植した結果、それぞれ0.4%、1.2%と低率ながらも満期胎子を得ることができた (表16、17)。このことから、これらのTgマウス由来の卵丘細胞を選別の実験に用いることができると判断した。マウスの核移植効率は、ドナーやレシピエント卵子に用いるマウスの系統によって大きく左右される[101,102]。本実験では、BDF1系統の雌マウスと、C57BL系統の雄マウスを交配して得られた雌マウス由来の卵丘細胞を用いている。低発生能であった理由は本実験で用いたドナー細胞の系統が原因であると考えられる。

続いて、胚盤胞での遺伝子発現観察後に胚移植を行い、各遺伝子の発現様式と胎子への発生能との関連性を検討した。まず、Oct4の発現様式での選別を検討した。Oct4は胎子の発生に必要な不可欠であるが、近年、マウスの受精卵ではOct4の発現はICMだけではなくTEでも発現しており、胚盤胞の細胞が120~140個になる段階でもTEでのOct4の発現が見られることが明らかとなった[103]。このことから、本実験では胚盤胞全体でのOct4の発現レベルによって3つのグループに分類した。すなわち、強発現胚(++)、中発現胚(+)、低発現胚(±)に分類した (図11)。胚盤胞における各発現様式の割合は、++が37.5%、+が38.7%、±が23.8%であった (表18)。これらのグループをレシピエントマウスに胚移植したところ、妊娠19.5日目における満期胎子は全てのグループで得ることはできなかったため (表19)、妊娠中期である妊娠12.5日目での開腹検査を行った。着床率では、++グループで±グループよりも有意に高かった (表20)。さらに、++グループでのみ1匹の生存胎子を得ることができ、その率は1.5%であった (表20)。また死亡胎子も++グループでのみ得られた。このことから、Oct4が胚盤胞で高レベルに発現している核移植胚は、高い着床能、胎子への発生能を有していることが明らかとなった。

次にNanogの発現様式と核移植胚の発生との関連性を検討した。通常、受精卵において、Nanogは桑実胚では胚全体で発現しているが、胚盤胞ではその発現はICMのみに局在するようになる[95]。しかし、核移植胚の胚盤胞ではICMのみならず本来発現が見られないTEにまでNanogが発現している胚が存在し

表14. Oct4-GFP細胞をドナーとした核移植胚の発生能

供試卵数	活性化卵数	培養卵数	胚発生数 (%)			
			2細胞期	4-8細胞期	桑実胚	胚盤胞
803	581	465	454 (97.6)	434 (93.3)	324 (69.7)	285 (61.3)

表15. Nanog-GFP細胞をドナーとした核移植胚の発生能

供試卵数	活性化卵数	培養卵数	胚発生数 (%)			
			2細胞期	4-8細胞期	桑実胚	胚盤胞
427	331	297	288 (97.0)	258 (86.9)	211 (71.0)	148 (49.8)

表16. Oct4-GFP核移植胚の満期発生能

移植胚数	着床数(%)	胎子数 (%)		胎盤数	重量(g)	
		生存	死亡		胎子	胎盤
255	131 (51.4)	1 (0.4)	0	1	1.536	0.286
				1	—	0.197*

* : 胎盤だけ得られた場合の胎盤重量

表17. Nanog-GFP核移植胚の満期発生能

移植胚数	着床数(%)	胎子数 (%)		胎盤数	重量(g,平均±標準偏差)	
		生存	死亡		胎子	胎盤
85	47 (55.3)	1 (1.2)	0	1	1.419	0.295
				2	—	0.150±0.009*

* : 胎盤だけ得られた場合の胎盤重量

表18. Oct4-GFPマウス由来体細胞をドナーとした核移植胚の体外発生能

供試卵数	活性化卵 ¹ 培養卵数	胚発生数 (%)				各発現レベルの胚数 (%)			
		2細胞期	4-8細胞期	桑実胚	胚盤胞	++	+	±	
1598	1199	935	911 (97.4)	722 (77.2)	576 (61.6)	413 (44.2)	155 (37.5)	160 (38.7)	98 (23.8)

表19. Oct4-GFP核移植胚の選別後の満期発生能

グループ	移植胚数	着床数(%)	胎子数 (%)		合計	胎盤数
			生存	死亡		
++	51	26 (51.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
+	47	28 (59.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
±	21	8 (38.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0

表20. Oct4-GFP核移植胚の選別後の体内発生能

グループ	移植胚数	着床数(%)	胎子数 (%)			胎盤数
			生存	死亡	合計	
++	67	50 (74.6) a	1 (1.5)	1 (1.5)	2 (3.0)	2
+	64	41 (64.1)	0	0	0	0
±	48	22 (45.8) b	0	0	0	0

妊娠12.5日目で開腹

a,b : 異符号間に有意差あり (p<0.05)

ていた (図 12)。このことから、Nanog の発現様式のグループ分けは、ICM のみで発現している胚 (I)、ICM、TE 両方で発現している胚 (IT)、低発現胚 (L) の 3 グループに分類した (図 12)。胚盤胞期での各グループの割合は、I が 32.4%、IT が 39.5%、L が 28.2%であった (表 21)。続いて、これら 3 グループを胚移植し胎子への発生能を検討した。その結果、着床率は Oct4 同様、低発現胚 (L) で他 2 グループと比較し有意に低かった (表 22)。そして、興味深いことに満期胎子は IT グループでのみ得ることができた (1.7%) (表 22)。I、L グループからは死亡胎子も得ることはできなかった。IT グループの発生能が最も高かったことから、本来異所発現である TE での Nanog の発現が核移植胚では重要であると考えられる。上記の結果から、Oct4、Nanog の胚盤胞での各々の発現様式によって核移植胚の胎子への発生能は大きく異なり、本方法での遺伝子発現様式による胚移植前選別が可能であることが明らかとなった。

実験 2 では、胚盤胞での継時的な Oct4、Nanog の発現様式の変化を観察した。実験 1 と同様に Day5 胚盤胞の Oct4、Nanog の発現様式を観察した後、胚移植をせずにそのままさらに 24 時間培養した。培養は、1 つ 1 つの胚盤胞の追跡ができるように、1 つに培養ドロップで 1 つの胚盤胞を培養した。まず Oct4 - GFP 核移植胚での結果を表 23 に示した。Day5 - ++グループの胚盤胞は、Day6 で発現が±にまで低下する割合は 11.8%であったが、Day5 - +、±グループではその割合はそれぞれ 54.8%、85.2%と有意に高かった。この結果は体内受精卵でも同様の傾向であった。このことから、Day5 胚盤胞で Oct4 が強発現している場合はその発現が長期間維持されていることが明らかとなった。各発現様式の Day5 胚盤胞におけるハッチング胚盤胞 (胚を包む透明帯から孵化し始めた胚盤胞) 率は、有意差はなかったものの±グループで低い傾向にあった (表 24)。

続いて、Nanog - GFP 核移植胚での結果を表 25 に示した。核移植 Day5 - I グループでは 24 時間培養後、約 60%の胚は ICM のみ、もしくは ICM、TE 両方での発現が確認された。しかし、約 40%の胚盤胞は 24 時間後に Nanog の発現が消失してしまうことが明らかとなった。一方で、Day5 - IT グループでは、約 90%の胚盤胞で Nanog の発現が少なくとも ICM で 24 時間後も維持されており、Day5 - I グループと比較して有意に多かった。Day5 - L グループに関しては、24 時間培養しても Nanog が新たに発現してくることはなく、ほとんどが低発現のままであり、胚盤胞が退行 (変性) してしまう割合も高かった。この結果から、核移植胚では Day5 の段階で ICM、TE 両方で Nanog が発現していれば、その発現が ICM で長期間維持されるため、着床後の発生能が良かったのだ

表21. NanogGFP細胞をドナーとした核移植胚の発生能

供試卵数	活性化卵数	培養卵数	胚発生数 (%)				Nanog発現(%)		
			2細胞期	4-8細胞期	桑実胚	胚盤胞	I	IT	L
1108	810	689	676 (98.1)	640 (92.9)	553 (80.3)	380 (55.2)	123 (32.4)	150 (39.5)	107 (28.2)

表22. NanogGFP核移植胚の選別後の満期発生能

移植胚数	着床数(%)	胎子数 (%)			胎盤数	重量(g, 平均±標準偏差)	
		生存	死亡	合計		胎子	胎盤
I	104	67 (64.4) a	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
IT	115	64 (55.7) a	2 (1.7)	1 (0.9)	3 (4.7)	3	1.43±0.375 0.184±0.034
L	106	46 (43.4) b	0 (0)	0 (0)	0 (0)		

表23. Day6胚盤胞でのOct4遺伝子の発現様式

	Day5胚盤胞の グループ (%)	Day6胚盤胞数 (%)				退行
		++	+	±	+	
核移植胚						
	++	34 (37)	21 (61.8) a	9 (26.5) a	4 (11.8) a	0 (0)
	+	31 (33.7)	4 (12.9) b	10 (32.3) b	17 (54.8) b	0 (0)
	±	27 (29.3) a	0 (0) b	2 (7.4) a	23 (85.2) c	2 (7.4)
体内受精卵						
	++	21 (55.3) a	18 (85.7) a	1 (4.8) b	2 (9.5) a	0 (0)
	+	13 (34.2) a	6 (46.2) c	2 (15.4) b	5 (38.5) b	0 (0)
	±	4 (10.5) b	0 (0) c	0 (0)	4 (100) c	0 (0)

a-c: 同列内の異符号間に有意差あり (p<0.05)。核移植胚、体内受精卵間には同グループ間でのみ統計処理した。

表24. 各Oct4発現様式のハッチング胚盤胞率

グループ	胚盤胞数	ハッチング胚盤胞数 (%)
++	34	10 (29.4)
+	31	8 (25.8)
±	27	3 (10.7)

表25. Day6胚盤胞でのNanog遺伝子の発現様式

	Day5胚盤胞のグループ (%)		Day6胚盤胞数 (%)			
	I	L	I	IT	L	退行
核移植胚	I	61 (33) a	29 (47.5)a	7 (11.5)a	24 (39.3)a	1 (1.6)
	IT	78 (42.2) a	24 (30.8)b	48 (61.5)b	6 (7.7)b	0 (0)
	L	46 (24.9) a	2 (4.4)c	0 (0)c	41 (89.1)c	3 (6.5)
体内受精卵	I	29 (63) b	27 (93.1)d	0 (0)a	2 (6.9)d	0 (0)
	IT	15 (32.6) a	9 (60)e	2 (13.3)d	4 (26.7)e	0 (0)
	L	2 (4.3) c	0 (0)c	0 (0)c	2 (100)c	0 (0)

a-e: 同列内の異符号間に有意差あり (p<0.05)。核移植胚、体内受精卵間には同グループ間でのみ統計処理した。

と考えられる。体内受精卵では、Day5 で ICM のみに Nanog が発現していた場合、day6 においても 90%以上の胚盤胞が ICM に発現が局在したままであり、核移植胚と比較して有意に多かった(表 25)。本来異所発現とされる TE での発現が見られる体内受精卵では、Day6 では 26.7%の胚盤胞でその発現が低下しており核移植胚と比較すると有意に多かった。すなわち、体内受精卵では異所発現とされる TE での Nanog の発現は、核移植胚では逆に胚発生能を支持する働きがあることが明らかとなった。

また、Day5 胚盤胞の発現様式とハッチング胚盤胞率の相関を見ると、IT グループでは他の 2 グループと比較して有意に高いハッチング率となった(表 26)。この高いハッチング率も、IT グループの胎子形成率が高かった一因であると考えられる。

実験 1、2 では、Oct4 と Nanog の胚盤胞での発現様式によって核移植胚を選別し、胎子への発生能を比較した。その結果どちらの実験においても 3 グループに分類した内の 1 つのグループのみで胎子を得ることができた。Oct4 の発現様式による選別では、強発現グループでのみ満期胎子を得ることができた。Oct4 は ICM の着床前後の発生に必要不可欠でありことから[42]、中、低発現グループでは ICM の着床以降の発生が阻害されたものと考えられる。Boiani らは Oct4 - GFP 核移植胚を胚盤胞の時期で Oct4 の発現様式によって分類し、ES 細胞の樹立効率を比較した結果、Oct4 強発現核移植胚のみで ES 細胞が樹立できたと報告している[104]。この結果は本実験での結果と一致し、核移植胚盤胞の ICM の発生には Oct4 が強発現していることが必要であると考えられる。

一方、Nanog の発現様式を指標とした選別では、本来異所発現とされる TE での発現が見られる核移植胚でのみ満期胎子を得ることができた。Nanog は胚盤胞の ICM で発現し、着床後の胎子形成を支持しているが[95]、本実験で得られた結果は、核移植胚が胎子まで発生するには少なくとも Nanog が TE にも発現していることが重要であることを示している。継時的な Nanog 発現様式の観察の結果から、Nanog が ICM、TE 両方で発現している Day5 核移植胚では、その発現が 24 時間後も ICM で維持されていることが明らかとなった。Nanog は着床後のエピブラスト形成に必須の遺伝子であり[94]、ICM での着床前後での Nanog の発現の維持は必須である。胚盤胞の ICM のみをフィーダー細胞上で培養すると ES 細胞を樹立することができるが[105]、Nanog - GFP ES 細胞において、Nanog 高発現 ES 細胞では、低発現 ES 細胞よりもコロニー形成率が高いことや[106]、Nanog 欠損 ES 細胞では増殖効率が極めて悪いことが明ら

表26. 各Nanog発現様式のハッチング胚盤胞率

グループ	胚盤胞数	ハッチング胚盤胞数 (%)
I	61	13 (21.3) a
IT	78	26 (33.3) b
L	46	10 (21.7) a

a,b : 異符号間に有意差あり (p<0.05)

かとなっている[94]。これらのことから、Day6 胚盤胞で Nanog の発現が低下する、Day5 で I グループの核移植胚は、胚移植後の発生能が低かったものと考えられる。

最後に、実験 3 ではドナー細胞として卵丘細胞以外の細胞を用いた場合の、胚盤胞での遺伝子の発現様式と胎子への発生能との関連性を検討した。マウス核移植胚の発生能は、用いるドナー細胞によって大きく異なることが明らかとなっている[32]。このことから、ドナー細胞の種類によって初期化状態は大きく異なり、各ドナー細胞に適した遺伝子発現様式があるのかもしれない。このことを確認するために、本実験では脾臓細胞を用いて核移植を行った。脾臓細胞は、比較的簡単に採取することができ、核移植のドナー細胞として用いた場合、個体への発生も確認されている[102]。また、Nanog - GFP 卵丘細胞をドナーとした実験で、高率に胎子まで発生したため本実験では Nanog - GFP マウスから得ることとした。その結果、胚盤胞への発生率は 21.4%と、卵丘細胞をドナーとした場合よりも低かった(表 14、15、27)。胚盤胞での Nanog の各発現様式の割合は、I グループが 32.8%、IT グループが 38.1%、L グループが 29.1%となり、卵丘細胞の場合と同じような結果となった(表 15、27)。続いて、選別した胚盤胞の移植試験を行い妊娠中期(12.5 日目)で着床、胎子への発生能への影響を検討した。着床率は I、IT グループと比較して L グループで有意に低い結果となった(それぞれ 69.4%、65.3%、54.5%、表 28)。そして、生存胎子は I グループのみで得ることができた(表 28)。生存、死亡を合わせた合計の胎子数も I グループが最も多く、L グループで最も少なかった。このことから、卵丘細胞をドナーとした場合は IT 胚盤胞の発生能が最も良かったが、脾臓細胞をドナーとした核移植胚ではそれとは異なり、I 胚盤胞の発生能が良いことが明らかとなった。ドナー細胞によって核移植胚の発生能が異なることは、マウスだけではなく、その他の実験動物や家畜でも明らかとなっている[107]。また、核移植胚の胚盤胞期までの初期胚でのいくつかの遺伝子の発現レベルは、用いるドナー細胞で異なることが報告されている[41,50]。さらに、着床後胚の胎子を形成する組織での遺伝子の発現レベルは、ドナー細胞種によって大きく異なることも明らかとなっている[108]。これらの報告と本実験の結果より、ドナーとする体細胞の種類によって、胚盤胞での Nanog の適切な発現様式は異なるが、それぞれのドナー細胞由来の核移植胚に適した遺伝子発現様式により選別が可能であると考えられる。

表27. Nanog-GFP 脾臓細胞をドナーとした核移植胚の発生能

供試卵数	活性化卵数	培養卵数	胚発生数 (%)				Nanog発現(%)		
			2細胞期	4-8細胞期	桑実胚	胚盤胞	I	IT	L
1082	945	882	855 (96.9)	581 (65.9)	382 (43.3)	189 (21.4)	62 (32.8)	72 (38.1)	55 (29.1)

表28. Nanog-GFP 脾臓細胞核移植胚の選別後の体内発生能

グループ	移植胚数	着床数(%)	胎子数 (%)			胎盤数
			生存	死亡	合計	
I	62	43 (69.4) a	2 (3.2)	3 (4.8)	5 (8.1)	3
IT	72	47 (65.3) a	0 (0)	3 (4.2)	3 (4.2)	2
L	55	30 (54.5) b	0 (0)	1 (1.8)	1 (1.8)	1

異符号間に有意差あり (p<0.05)
 妊娠12.5日目で開腹

本章では、Oct4、Nanog の胚盤胞での遺伝子発現様式で核移植胚を選別し、胎子まで発生する核移植胚の胚移植前選別が可能かどうかを検討した。その結果、両遺伝子の胚盤胞での発現様式は胎子までの発生に影響し、それによって核移植胚の選別が可能であることを明らかとした。本実験の結果は、遺伝子発現様式によって核移植胚を選別し、胎子までの発生能を検討した初めての成果である。また、胎子まで発生する核移植胚の遺伝子発現様式は、ドナー細胞種によって異なることも明らかとなった。Oct4、Nanog 両遺伝子は、それぞれ単独で機能している訳ではなく、同じような働きを持つその他多くの遺伝子と協調して機能し、発現の調節をしている[46,109–113]。しかし、Oct4 と関わりの深い遺伝子である Dppa1 などの発現が核移植胚では乱れていることも明らかとなっている[97]。また、Oct4、Nanog と共に ICM、TE 分化に関わる FGF4[114]も核移植胚では抑制されている[41]。胚盤胞以降のダイナミックな細胞分化は、分化に関連する遺伝子が厳密に制御されているため、本実験で胎子が得られなかったグループでは、連鎖的に他の遺伝子の発現にも影響を与えることで、着床後の発生が阻害されたものと考えられる。また、胚盤胞での細胞分化や胚発生に関連する遺伝子の発現様式は動物種によって異なることが明らかとなっている[115,116]。そのため、他の動物種においても詳細な検討が必要である。今後はより多くの遺伝子に焦点を当て検討していく必要があるが、本実験では Oct4、Nanog の発現様式を指標とした、核移植胚の選別法を確立することができた。

第5章 新たな選別法がマウスクローン作出効率に及ぼす影響

第1節 目的

学位申請者は、胎子まで正常に発生する核移植胚の選別について研究を行ってきた。前章までの実験で、twin、intact 核移植胚で胚移植前の選別が可能かどうかを検討してきた。その結果、twin 核移植胚での選別は困難であったものの、intact 核移植胚での2細胞期の形態、胚盤胞期での遺伝子発現様式によって、高発生能を有する核移植胚の選別が可能であることが示唆された。

前章までの検討において、2細胞期の割球サイズ、胚盤胞での Oct4、Nanog の発現様式で高発生能を有する核移植胚の選別が可能であることが明らかとなった。また学位申請者は修士論文において、体内受精卵と核移植胚を同一の培養液内で培養すると、核移植胚の発生能が向上することを明らかとした。そこで本章では、これまで重ねてきた検討の内、有用であると考えられる核移植胚の培養法（体内受精卵との共培養）、選別法（2細胞期胚の形態、胚盤胞期での遺伝子発現による選別法）を組み合わせた新たな手法によってマウスクローン効率を改善することができるかどうかを検討した（図13）。

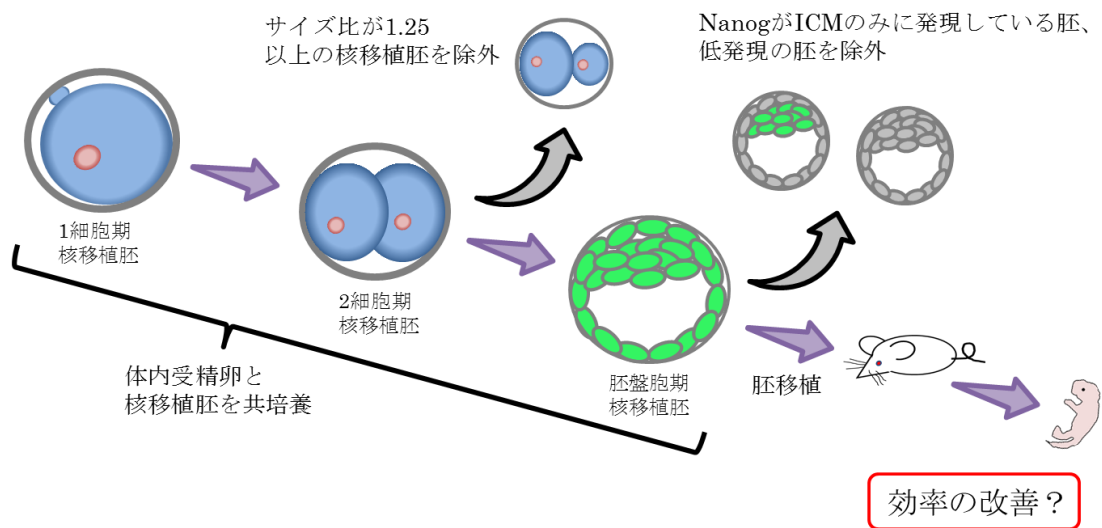


図 13. 本章における核移植胚の培養法と選別法

第 2 節 材料および方法

体内受精卵の回収

体内受精卵は ICR 系雌マウスから、第 2 章と同様の方法で回収した。

体細胞核移植

体細胞核移植は第 2 章、第 4 章と同様の方法で行った。ドナー細胞には Nanog - GFP 雌マウスから得られた卵丘細胞を用い、レシピエント卵には BDF1 系雌マウスから回収した MII 期卵を用いた。

体外培養

KSOM ドロップ 15 μ l 中で核移植胚 10 個と体内受精卵 5 個を共培養した。1 つの培地ドロップで体内受精卵、核移植胚を培養したため、見分けが付くように体内受精卵は WID 法で培養した (図 14)。

2 細胞期胚の選別

hCG 後 45 時間目で、核移植胚を 1 つずつ写真撮影し、第 3 章と同様の方法で割球のサイズを測定した。そして、割球サイズ比が 1.25 未満の 2 細胞期核移植胚のみを、再び体内受精卵との共培養によって胚盤胞期まで培養した。

胚盤胞の選別

胚盤胞期まで発生した核移植胚は、hCG 後 116 時間目に第 4 章と同様の方法で GFP の蛍光を観察し、胚盤胞を 3 グループ選別した。

胚移植

第 2 章の方法に従って、Nanog が ICM、TE で発現している胚盤胞のみ、1 つの卵管に対して 10~15 個を ICR 系雌マウスへ胚移植した。開腹検査は偽妊娠 12.5 日目、18.5 日目で行った。

対照区の設定

対照区として、体内受精卵との共培養および 2 細胞期、胚盤胞期での選別を全く行わない区を設けた。得られた胚盤胞は、全て胚移植した。核移植のドナー細胞およびレシピエント卵子は選別区と同じ種類の細胞、卵子を用いた。

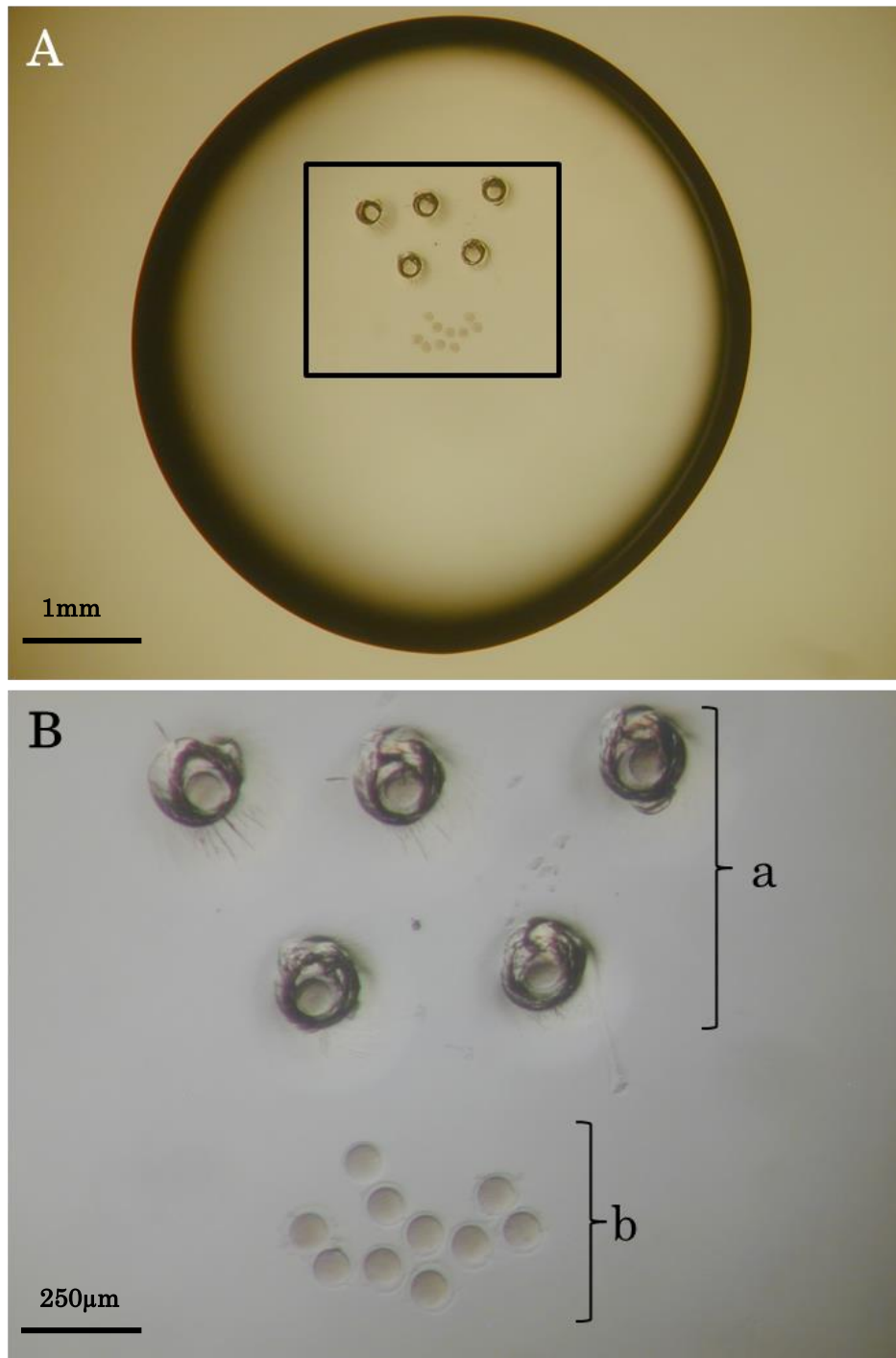


図 14. 本章における核移植胚の培養方法
 A) ドロップ全体の写真 (ドロップ量 : 15 μ L)
 B) A の四角内の領域を拡大した写真
 (a : WID 法で培養している体内受精卵、b : 核移植胚)

統計解析

体外発生率、着床率、胎子率に関しては χ^2 検定によって、胎子、胎盤の重量に関してはt検定によって、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判断した。

第3節 結果および考察

本実験では、現在までの検討において有用であると判断した核移植胚の培養法、選別法を組み合わせることで、マウスクローン効率を改善することはできるかどうかを検討した。前章での検討の結果、Oct4 - GFP の体細胞からは、満期胎子を得ることはできなかつたため、本実験では Nanog - GFP の体細胞をドナーとした。まず、胚盤胞への発生率を比較した。2細胞期胚当たりの胚盤胞率は、体内受精卵と共培養し、2細胞期胚の割球サイズ比が 1.25 以上の核移植胚を除外した選別区で、通常の方法で培養した核移植胚（対照区）と比較して有意に高かった（それぞれ 59%、49%）（表 29）。これは、胚盤胞期へ発生することのできない核移植胚を 2細胞期の時期で選別できたことが 1つの理由である。また、胚は発生中に自身の代謝産物を培養液中に放出している。その代謝産物中には、胚発生を促進するインスリン様成長因子（IGF）[117,118]や上皮成長因子（EGF）[119]など多くの成長因子が含まれており、別の胚はそれらを受け取り自身の代謝に利用している（パラクライン効果）[120,121]。すなわち、高発生能を有する体内受精卵では代謝が活発に行われ、このような成長因子を多く放出することで、同じ培養液内で培養した核移植胚の発生を促進したものと考えられる。また、発生能が低い胚からは、発生に悪影響を与える因子を放出している可能性もある。そのため、2細胞期という早い段階で、胚盤胞へ発生しない胚を除去できたことも一つの要因であると考えられる。

続いて、遺伝子の発現様式によって選別した胚盤胞と、選別をしなかつた胚盤胞の移植試験を行った。まず、妊娠中期（12.5 日目）までの発生能を検討したところ、生存胎子率は選別区が 8.2%、対照区が 3.3%であり、選別することによって約 2.5 倍向上した（表 30）。さらに、満期胎子への発生率はそれぞれ 3.3%、1.5%であり、2倍以上向上させることができた（表 31）。得られた 12.5 日目、18.5 日目の胎子は図 15 に示した。この結果から、本実験で検討した選別法によって、胎子まで高率に発生する核移植胚の選別が可能であり、マウス核移植胚の新たな選別法を確立することができたと言える。

クローン研究において、胎子まで正常に発生する核移植胚の選別を行うという試みはほとんど行われてはいない。胚移植前の選別法が確立できれば、移植当たりのクローン効率は向上すると考えられるため、非常に有用な手段となる。前章までの実験で、核移植胚の胚移植前選別を試み、胚盤胞までの発生能が高い胚、胎子まで発生する核移植胚の選別をすることができた。そして本実験では、それらを組み合わせることによって胚盤胞率、妊娠中期、満期での生存胎

表29. 複合条件で培養、選別したマウス核移植胚の体外発生成績

	供試卵数		活性化卵数		培養卵数		卵割		胚発生数 (%)				各発現様式の胚数 (%) ***				
							正常2細胞期*	4-8細胞期**	桑実胚**	胚盤胞**	I	IT	L				
複合区	1156	972	819	797 (97.3)	761 (95.5)	731 (96.1)	605 (79.5)	451 (59.3) a	147 (32.6)	153 (33.9)	151 (33.5)						
対照区	366	309	261	256 (98.1)	-	231 (90.2)	184 (71.9)	126 (49.2) b	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* : 分母は卵割胚数

** : 選別区のみは正常2細胞期胚数、対照区のみは卵割胚数

*** : ICMのみに発現 (I)、ICM、TE両方に発現 (IT)、ほぼ発現なし (L)

a,b : 異符号間で有意差あり (p<0.05)

表30. 複合条件で培養、選別したマウス核移植胚の選別後の体内発生能

	移植胚数	着床数(%)	胎子数 (%)		胎盤数
			生存	死亡	
複合区	61	34 (55.7)	5 (8.2)	3 (4.9)	6
対照区	60	31 (51.7)	2 (3.3)	2 (3.3)	2

妊娠12.5日目で開腹

表31. 複合条件で培養、選別したマウス核移植胚の選別後の体内発生能

	移植胚数	着床数(%)		胎子数 (%)		胎盤数	重量(g, 平均±標準偏差)*	
		生存	死亡	生存	死亡		胎子	胎盤
複合区	92	55 (59.8)	3 (3.3)	2 (2.2)	5	1.463±0.293	0.221±0.041	
対照区	66	35 (53.0)	1 (1.5)	0 (0)	1	1.333	0.249	

妊娠18.5日目で開腹

* : 胎盤のみ、および死亡胎子とその胎盤の重量は含めていない

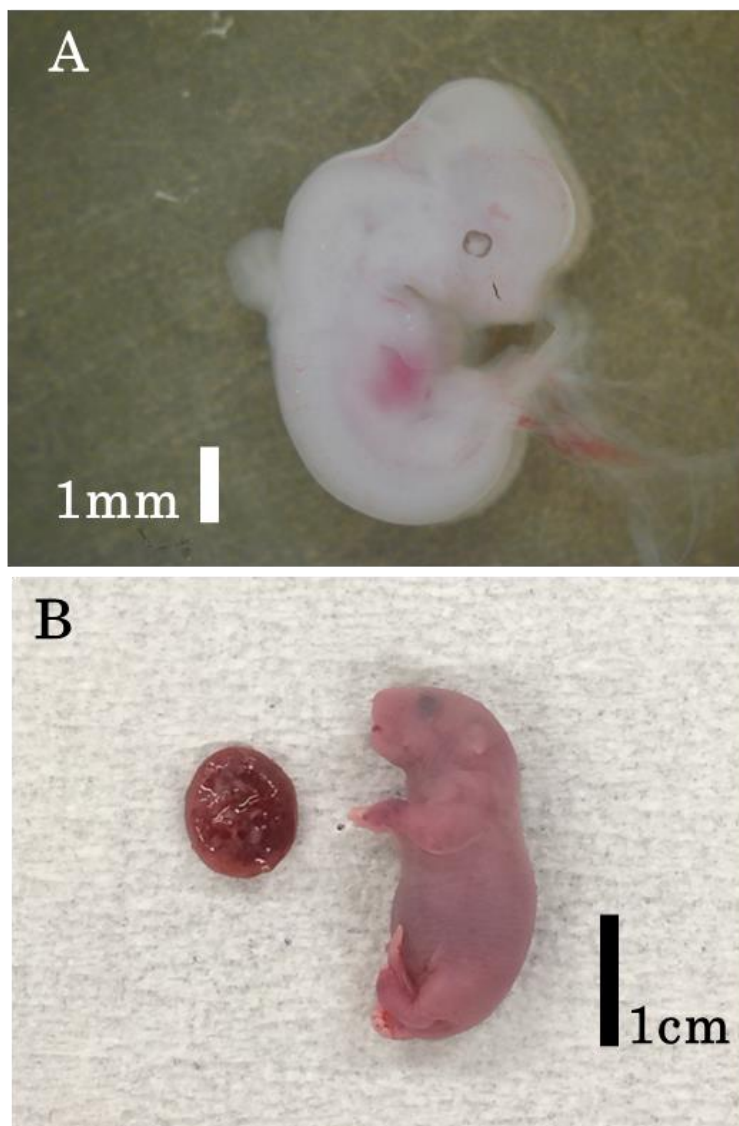


図 15. 本章の選別区で得られた妊娠中期胎子（12.5 日目）（A）と満期胎子および胎盤（B）

子率を向上させることができた。しかし、満期胎子率は依然として低く、本研究で選別の指標とした形態や遺伝子は、核移植胚の低発生能の原因の 1 つにし
かすぎず、根本的な原因ではないと考えられる。今後は核移植胚の特徴をより
詳細に検討し、発生の鍵となる因子を同定していく必要がある。

第6章 総合考察

実験動物、家畜の体細胞核移植胚の発生の特徴として共通しているのは、着床直前の胚である胚盤胞までは数十%と高率に発生するものの、胚移植後の体内発生中にほとんどが発生を停止し、妊娠満期まで発生する核移植胚は移植した胚の～10%と非常に低いことである[31]。本研究で実験対象としたマウスにおいても、初期胚で核移植胚特有の異常が見られるが、それらを改善することによって発生能は向上してきている[32,33]。すなわち、初期胚で見られる異常は、胎子への発生能と深く関連していると考えられる。そこで学位申請者は、胎子まで正常に発生すると推測できる核移植胚を、初期胚の段階で選別できないかと考えた。高発生能を有する核移植胚のみを胚移植することができれば、胚移植当たりのクローン効率向上が見込めると共に、使用する代理母も削減することができる。また、胎子へ発生する核移植胚とそうでない核移植胚の特性を明らかとすることができれば、クローン研究における重要な知見となる。このことから、最終的には家畜胚への応用を目的として、本研究では実験の利便性からマウスをモデルとして体細胞核移植胚の胚移植前での選別が可能かどうかを検討した。

マウス核移植胚に見られる異常の1つに初期胚での遺伝子発現がある。用いるドナー細胞に限らず、核移植胚での全体的な遺伝子発現レベルは体内受精卵と比較して、大きくばらついていることが報告されている[40,122]。このような遺伝子の発現異常を改善することによって、核移植胚の発生能は向上することが明らかとなっており[123–125]、初期胚での遺伝子発現様式はその後の発生能と深く関わっていることが分かる。そこで第2章では、遺伝子発現様式による核移植胚の選別を試みた。着床前後の胚発生に重要である Oct4、Sox2 の発現様式を選別の指標とした。遺伝子発現の解析と胚移植を同一胚で行うため、twin胚を作出する方法を新たに確立し、得られた双子胚盤胞の片方を遺伝子解析、もう片方を胚移植するという実験系を構築した。核移植双子胚の胚盤胞期を遺伝子解析した結果、Oct4、Sox2 共に核移植双子胚では発現が大きくばらついていたものの、体内受精卵と同程度の発現レベルを示す胚も存在し、そのような胚は高発生能を有していると考えられる。しかし、それとペアになる核移植双子胚を胚移植したところ、妊娠満期、妊娠中期どちらにおいても胎子を得ることはできなかった。体内受精卵由来の双子胚は比較的高率に胎子まで発生し[66]、確立された技術であるが、核移植由来の双子胚の発生能は非常に低く、双子胚を用いた選別は困難であると判断した。このことから、以降の実験では intact

核移植胚で検討した。

第 3 章では、intact 胚での選別方法として最も簡便な方法である形態的特徴での選別を試みた。まず、胚盤胞の形態に着目したが、体内受精卵と核移植胚で胚盤胞の形態には全く差はなく、胚盤胞の形態で発生能を推測することは困難であることがあらためて確認された。そこで核移植胚の胚盤胞までの発生を注意深く観察したところ、核移植胚では第一卵割において、不等分裂する胚が多く見られることを見出し、2 細胞期胚の 2 つの割球のサイズ比を指標として核移植胚を選別した。その結果、胚盤胞への発生率は等分裂胚で有意に高かったものの、胚移植後の満期胎子への発生能には影響しなかった。そこで、割球サイズ比と胚盤胞への発生能との関連を詳細に検討すると、サイズ比が 1.25 を超えると胚盤胞へ全く発生しないことが明らかとなった。このことから、2 細胞期の割球サイズ比によって、胚盤胞まで発生することができる核移植胚の選別は可能であることが明らかとなった。細胞の分裂には主にアクチンなどの細胞骨格タンパク質が関わっているが、核移植胚ではこのようなタンパク質が異様な動態を示すことが報告されていることから[87,88]、アクチン重合阻害剤の種類やドナー細胞を注入する位置で不等分裂が改善できるか検討したが、改善することはできなかった。また、このような細胞骨格タンパク質は染色体の分離にも関与しており、Mizutani らは、核移植胚において 8 細胞期以前で染色体の分離異常が起きると胎子まで発生できないことを報告している[39]。本実験において不等分裂は満期発生能に影響を及ぼさなかったものの、染色体分離異常を起こしているかどうかは不明であり、核移植胚の第一卵割の不等分裂に関してはより詳細な検討が必要である。

形態的な特徴は満期胎子までの指標とはならなかったことから、より発生能と密接に関連した因子を指標とする必要がある。そこで第 4 章では、遺伝子発現様式を指標とした選別を intact 核移植胚で検討した。遺伝子発現様式の観察と胚移植を同一胚で行うため、本実験では指標遺伝子に GFP を融合させた Tg マウス由来のドナー細胞を用いて核移植を行い、その蛍光様式によって核移植胚を胚盤胞の段階で選別した。指標とした遺伝子は Oct4、Nanog であり、これらは ICM、TE 分化、さらに着床後の ICM の発生に重要なため[47,48,94,96]、核移植胚の胎子への発生を大きく左右すると考えられる。胚盤胞期において、Oct4 および Nanog の発現様式によってそれぞれ 3 つのグループに選別し胚移植を行った結果、Oct4 が強発現しているグループ、そして Nanog が胚盤胞の ICM、TE 両方で発現しているグループでのみ胎子を得ることができた。このことから、これらの遺伝子の胚盤胞における発現様式によって、胎子まで発生す

る核移植胚を選別することが可能であることが明らかとなった。Nanog は体内受精卵では胚盤胞の ICM のみで発現するが[95]、本来異所発現とされる TE で Nanog が発現する核移植胚でのみ胎子まで発生した。day5 で Nanog が ICM のみに発現している胚盤胞は、24 時間後にその発現が低下している割合が多かったが、ICM、TE 両方で発現している胚盤胞は、ほぼ全てが 24 時間後も Nanog の発現が維持されていることが明らかとなった。TE でも発現することによって長期間 Nanog の発現が ICM で維持されることが 1 つの理由であると考えられる。また、核移植に用いるドナー細胞によって核移植胚の遺伝子発現様式や、発生能が異なることが報告されているため[41,50]、Nanog - GFP 脾臓細胞を用いて核移植を行い、同様に選別、胚移植した。その結果、卵丘細胞の結果とは異なる発現様式を示す胚盤胞から胎子が得られ、用いるドナー細胞によって適する遺伝子発現様式は異なる可能性があり、各々のドナー細胞に適した手法で選別できる可能性が示唆された。

第 2 章から第 4 章までの実験において、核移植胚の胚移植までの選別が可能かどうかを検討してきた。第 5 章では、これまでの検討で有用であった核移植胚の培養法および選別法を組み合わせることによって、マウスクローン効率を改善することができるかどうかを検討した。まず、核移植胚の体外培養は体内受精卵と一緒にを行い、2 細胞期の形態、さらに胚盤胞期で Nanog の発現様式で選別し、最終的に残った胚盤胞のみを胚移植した。その結果、胚盤胞率、そして妊娠中期、妊娠満期における生存胎子率は、選別を行わなかった対照区と比較して 2 倍以上向上した。すなわち、本研究で検討した選別法によって、胎子まで正常に発生する核移植胚のみを選別することが可能であることが明らかとなった。

体細胞クローン個体が初めて誕生してから 20 年近く経とうとしているが、未だに、分化した体細胞情報の初期化、そして最終的に非常に低率ながらも個体まで発生する詳細な機構は明らかとはなっていない。この効率を向上させるため、現在までに多くの研究が行われてきた。その結果、核移植胚と体内受精卵では遺伝子やタンパク質の発現レベル、局在など非常に多くの点で異なっていることが明らかにされ、低発生能の原因であると考えられている。そして、そのような点を改善することによって、クローン効率はわずかながら向上してきた[32,33]。しかし、どのような特徴を持つ核移植胚が最終的に個体まで発生するのかについては明らかとなっておらず、個体まで正常に発生する核移植胚と、胚移植後に発生を停止する核移植胚の詳細な特徴は不明である。

本研究では、高発生能を有する核移植胚の選別が可能かどうかを検討した結果、胚移植前にそのような核移植胚の選別は可能であることを明らかとした。選別後のクローン効率も向上させることができ、マウス核移植胚の胚移植前選別法を確立できたといえる。本研究では、選別のために Tg 動物を用いたため、家畜へ応用するためには実験系の改善が必要ではあるが、マウスクローン作出効率向上に向けた研究においては大きく貢献できたと考えられる。

近年、核移植胚の低発生の原因と推測される因子が少しずつではあるが同定されてきた。X 染色体の不活化に関わる Xist と呼ばれる遺伝子が、核移植胚では、異常に高発現しており、全体的な遺伝子の発現レベルも大きく低下していることが明らかにされた[123]。核移植胚で Xist の発現を抑制することによって、クローン効率は大きく向上している。また、ZGA の引き金となる遺伝子である Spi-C が核移植胚では抑制されており、ZGA の時期に起こる新規遺伝子発現が不十分であることも報告されている[126]。受精卵とは異なり、核移植胚では卵子、精子とは全く異なる、体細胞の情報を初期化することによって発生する。しかし、精子から転写される数種類の遺伝子が、胚発生には非常に重要であることが明らかとされている[127]。精子が侵入せずに発生する核移植胚では、このような精子由来因子を欠いていることも、低発生能の原因であると考えられる。このように、体内受精卵と核移植胚を比較して、大きく異なっている点を詳細に検討し、そのメカニズム、原因を究明していくことは、核移植胚の発生能向上のための大きな手がかりとなるだろう。

要約

体細胞核移植胚は、着床直前の胚である胚盤胞までは高率に発生するものの、胚移植後の体内発生中にそのほとんどが発生を停止し、妊娠満期まで発生する核移植胚は移植した胚の～10%と非常に低い。着床前の核移植胚では、核移植胚特有の異常が見られるが、それらの異常を改善することによって発生能は向上してきている。すなわち、初期胚で見られる異常は、胎子への発生能と深く関連していると考えられる。このことから、胎子まで正常に発生すると推測できる核移植胚を、初期胚の段階で選別できないかと考えた。高発生能を有する核移植胚のみを胚移植することができれば、胚移植当たりのクローン効率向上が見込める。また、胎子へ発生する核移植胚とそうでない核移植胚の特性を明らかとすることができれば、クローン研究における重要な知見となる。そこで、本研究ではマウス体細胞核移植胚の胚移植前での選別が可能かどうかを検討した。

I) twin 胚を用いた検討：Oct4、Sox2 遺伝子の発現様式による選別

本実験では、核移植由来の一卵性双子 (twin) 胚を用いた選別法を検討した。核移植胚では、個々の胚でドナー細胞の初期化状態が異なるが、twin 胚を用いることにより同じ初期化状態を持つ胚を 2 つ得ることができる。そこで本実験では得られた twin 胚盤胞の内、片方は、Oct4、Sox2 遺伝子の発現レベルを解析し、もう片方を胚移植した。核移植胚由来の twin 胚盤胞では、これらの遺伝子の発現は体内受精卵と比較して大きく異なっていたが、twin 胚盤胞の約 22%は、Oct4、Sox2 共に体内受精卵と同程度発現していた。しかし、核移植由来 twin 胚の体内発生能は非常に低く、解析した胚盤胞と対となる胚盤胞から胎子を得ることはできなかった。このことから、twin 胚を用いた選別はより一層の改善が必要であり、現段階では困難であると示唆された。

II) intact 胚を用いた検討：胚の形態的特徴による選別

I) の結果から、本実験では 2 つに分けない (intact) 胚での選別法を検討した。まず、胚盤胞の形態的特徴による選別を試みた。通常、受精卵では胚盤胞の形態でその後の発生能を推測できる。しかしながら、核移植胚では、受精卵と異なり胚盤胞の形態で発生能を推測することはできなかった。そこで、核移

植胚の初期発生を注意深く観察すると、2細胞期核移植胚では2つの割球サイズが異なる胚が多く存在していることを見出した。このため核移植胚の2細胞期の割球サイズを指標として、選別後の胚発生能を検討した。体内受精卵と比較すると、核移植胚では割球サイズ比が有意に大きいことが明らかとなった。さらに核移植胚では、胚盤胞まで発生した胚の2細胞期での割球サイズ比は、胚盤胞まで発生しなかった胚よりも有意に小さかった。そこで、後者のサイズ比を基準に核移植胚を2細胞期で選別したところ、この値未満の胚で胚盤胞率は有意に高かった。しかしこれらの胚を胚移植したところ、胎子率には影響を及ぼさなかった。続いて、胚盤胞への発生率とサイズ比との詳細な相関をみると、サイズ比が1.25を超えると、胚盤胞へ全く発生しなくなることが明らかとなった。本実験の結果から、核移植胚において2細胞期胚の割球サイズ比は、胎子への発生能の指標にはならないものの、胚盤胞への発生能の指標になることが明らかとなった。

III) intact 胚を用いた検討：Oct4、Nanog 遺伝子の発現様式による選別

本実験では、Oct4、Nanog の胚盤胞での発現様式を指標とした、intact 胚での遺伝子発現による選別法を検討した。遺伝子発現の観察と胚移植を同一胚で行うため、これらの遺伝子に GFP を融合させた遺伝子改変マウス由来のドナー細胞を用いて核移植を行った。Oct4 又は Nanog - GFP マウス卵丘細胞を核移植した胚を、胚盤胞期での発現様式によって3グループに分け、それぞれを胚移植した。その結果、Oct4、Nanog が低発現のグループでは着床率は有意に低かった。そして、Oct4 が強発現している胚、Nanog が ICM、TE 両方で発現している胚のみで生存胎子を得ることができた。さらに、これらの発現様式の胚盤胞では、その他の発現様式と比較して長期間その遺伝子の発現が維持されることも明らかとなった。

このことから、胚盤胞での遺伝子発現様式によって胚移植後の発生能は異なり、遺伝子発現様式による核移植胚の選別が可能であることが示唆された。また、Nanog の発現様式においては、本来異所発現とみなされる TE での発現が核移植胚では必要であり、体内受精卵の発現様式とは異なることを発見した。

IV) 新たな選別法がマウスクローン作出効率に及ぼす影響

本実験では、これまで検討してきた方法の内、核移植胚の発生に有効であった培養法、選別法を組み合わせる実験を行い、クローン効率が向上するかどうかを検討した。すなわち、核移植胚と体内受精卵を共培養し、2細胞期での割球サイズ比が1.25以上の胚を除外した後、胚盤胞でICM、TE両方にNanogが発現している胚のみを胚移植した。その結果、胚盤胞への発生率は有意に向上した。さらに、妊娠中期での生存胎子率は8.2%であり、選別をしなかった対照区(3.3%)と比較して約2.5倍向上した。さらに満期胎子率もそれぞれ3.3%、1.5%と2倍以上向上させることができた。このことから、本研究で有効であった選別法、培養法を組み合わせることでマウスクローン効率を向上させることができ、マウス核移植胚の胚移植前選別法を確立することができた。

本研究では、満期胎子まで発生可能であるマウス体細胞核移植胚を、胚移植前に選別可能かどうかを検討した。その結果、培養法の改善や、2細胞期の形態、胚盤胞での遺伝子発現様式によって、選別が可能であることが明らかとなった。そして、妊娠中期、妊娠満期の生存胎子率を2倍以上向上させることができ、マウス体細胞核移植胚の胚移植前選別法を確立できた。また、本研究で選別の指標とした要因は、核移植胚の発生を左右するものであることが明らかとなったため、今後のクローン研究に大きく貢献できたと考えられる。今後より詳細に検討していくことで、核移植胚の発生能改善の手がかりになると考えられる。

SUMMARY

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos have high developmental potential during early developmental stages, but almost all SCNT embryos die after embryo transfer. SCNT embryos have many abnormalities compared to in vivo-fertilized embryos. Reversing these abnormalities improves the developmental potential of SCNT embryos. Abnormalities in the early developmental stage are related to poor potential to develop to a fetus, and selecting good quality SCNT embryos before embryo transfer can improve developmental potential. Establishing methods of to select high-quality SCNT embryos will improve cloning efficiency. In this thesis, I examined whether mouse SCNT embryos can be selected before embryo transfer.

I) Examination of monozygotic twin embryos:

SCNT embryo selection based on Oct4 and Sox2 gene expression patterns.

In Experiment I, I evaluated a selection method using monozygotic twin embryos. The reprogramming differs among SCNT embryos. To obtain embryos in the same reprogramming state, we produced monozygotic twin embryos by splitting 2-cell SCNT embryos. One of the twin blastocysts was used for gene expression analysis and the other was transferred to a recipient mouse. In this experiment, I sorted the SCNT embryos based on Oct4 and Sox2 genes that are important for embryo development and pluripotency. The gene expression levels in SCNT twin blastocysts differed markedly from those in vivo-fertilized embryos, but 22% of SCNT twin blastocysts had expression levels of Oct4 and Sox2 similar to those of in vivo-fertilized embryos. SCNT twin embryos had very low potential to develop into fetuses, and no fetuses developed. Selecting SCNT embryos by splitting 2-cell embryos, therefore, was not effective.

II) Examination of intact SCNT embryos:

SCNT embryo selection based on morphological features at the 2-cell stage.

The monozygotic twin method is not suitable for embryo selection. In Experiment II, I examined selecting methods using intact embryos. First, we attempted to select SCNT blastocysts based on their morphology. The morphology of SCNT blastocysts did not differ from that of in vivo-fertilized embryos, however, making it difficult to select high-quality SCNT embryos at the blastocyst stage. I then observed early SCNT embryos in detail, and discovered many SCNT embryos in which the blastomere size differed among 2-cell embryos. Therefore, the blastomere size ratio of 2-cell embryos was used as indicator of developmental potential. The size ratio of SCNT embryos was significantly higher than that of in vivo-fertilized embryos. Moreover, in the SCNT embryos, the size ratio of embryos that did not develop into blastocysts was significantly higher than that of embryos that developed into blastocysts. Next, I selected the SCNT embryos by the blastomere size ratio at the 2-cell stage. The SCNT embryos with a size ratio smaller than that of the index value had a significantly higher blastocyst development rate compared with those with a value higher than the index value. These two SCNT embryo groups, however, had the same potential to develop into fetuses. Finally, I examined the correlation between the size ratio of 2-cell embryos and the developmental potential of SCNT embryos. When the size ratio was greater than 1.25, no SCNT embryos developed into blastocysts. Thus, the size ratio of 2-cell blastomeres is an indicator of potential successful development of SCNT embryos to blastocysts.

III) Examination of intact SCNT embryos:

SCNT embryo selection based on the gene expression pattern at the blastocyst stage.

In Experiment III, I selected intact SCNT embryos based on their gene expression patterns. Oct4 and Nanog genes were used as indicator genes. These genes work cooperatively and are essential for inner cell mass (ICM) development. To perform embryo transfer and observe gene expression patterns, I used donor somatic cells derived from transgenic mice in which the Oct4 or Nanog gene was fused with a GFP gene. At the blastocyst stage, SCNT embryos were sorted into three groups based on the expression pattern of these genes, and each blastocyst group was transferred to recipient mice. Live fetuses were obtained from blastocysts with either strong Oct4 expression group or strong Nanog expression in the ICM and TE. Oct4 or Nanog expression was maintained after blastocyst formation in those groups, and thus these blastocyst groups had high developmental potential. In contrast, Oct4 or Nanog expression was decreased in other group.

These findings demonstrated that the developmental potential of SCNT embryos differs based on gene expression pattern, and this method can contribute to determining good quality SCNT embryos.

IV) Effect of the new selecting method on mouse cloning efficiency.

In Experiments I–III, I examined various methods of selecting SCNT embryos before embryo transfer. In Experiment IV, I examined whether a combination of these selecting methods can be used to improve mouse-cloning efficiency. Briefly, SCNT embryos were cultured with in vivo-fertilized embryos. At the 2-cell stage, SCNT embryos with a blastomere size ratio greater than 1.25 were removed from the culture media. At the blastocyst stage, only blastocysts expressing Nanog in the ICM and TE were transferred to recipient mice. The developmental potential to midgestation was improved by 8.2% compared with the non-selected group (3.3%). The full-term developmental potential was also improved (3.3% vs 1.5%,

respectively). I therefore established a new method of selecting mouse SCNT embryos at the preimplantation stage.

In the present study, I examined several methods of culturing and selecting mouse SCNT embryos before embryo transfer. Culturing SCNT embryos with in vivo-fertilized embryos in the same culture media drop, and selecting them based on morphology at the 2-cell stage and the gene expression pattern of the blastocyst increased their developmental potential to fetuses. Further, cloning efficiency was improved by more than 200% by selecting SCNT embryos. Based on these results, I established methods of selecting good-quality mouse SCNT embryos.

発表論文

Kazuki Ohata, Yoko Kato. Estimating the survival probability of nuclear-transfer embryos before embryo transfer by a novel biopsy: Oct4 and Sox2 gene expression patterns of a monozygotic twin blastocyst separated at the 2-cell stage of nuclear-transfer embryos. *Journal of Mammalian Ova Research*, accepted on October 29th, 2015.

附表

附表1. KSOM、M2培地及びPBS(-)の組成

成分	濃度		
	KSOM	M2	PBS(-)
NaCl	95 mM	94.66 mM	1370 mM
KCl	2.5 mM	4.78 mM	27 mM
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	-	-	81 mM
KH ₂ PO ₄	0.35 mM	1.19 mM	14.7 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 mM	1.19 mM	—
Sodium Lactate	10 mM	23.28 mM	—
D (+) glucose	0.2 mM	5.56 mM	—
Penicillin-G potasium salt	60 mg/L	60 mg/L	—
Streptomycin sulfate salt	50 mg/L	50 mg/L	—
NaHCO ₃	25 mM	4.15 mM	—
Sodium Pyruvate	0.2 mM	0.33 mM	—
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.71 mM	1.71 mM	—
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.01 mM	—	—
Glutamine	1 mM	—	—
HEPES *	—	20.85 mM	—
Phenol red	—	10 mg/L	—
BSA **	0.4 g/L	0.4 g/L	—
pH	7.4±0.1	7.4±0.1	7.4±0.1

* 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

** Bovine surum albin

付表2. DMEMの組成

成分	濃度 (mg/L)
CaCl ₂ (anhyd.)	200
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.1
KCl	400
MgSO ₄ (anhyd.)	97.7
NaCl	6,400
NaHCO ₃	1.5
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	125
L-Arginine HCl salt	84
L-Cystine 2HCl salt	62.6
L-Glutamine	584
Glycine	30
L-Histidine · H ₂ O HCl salt	42
L-Isoleucine	104.8
L-Leucine	104.8
L-Lysine HCl salt	146.2
L-Methionine	30
L-Phenylalanine	66
L-Serine	42
L-Threonine	95.2
L-Tryptophan	16
Na ₂ L-Tyrosine	89.5
L-Valine	93.6
D-1/2Ca Pantothenate	4
Folic Acid	4
Thiamine HCl	4
Niacinamide	4
Pyridoxine HCl	4
Riboflavin	0.4
Choline Bitartrate	7.2
i-Inositol	7.2
D-Glucose	1,000
Phenol Red	5
Sodium Pyruvate	110

付表3. KSOM濃縮ストック溶液の組成

Stock (濃縮倍率)	成分	濃度
A (x10)	NaCl	950 mM
	KCl	25 mM
	KH ₂ PO ₄	2.5 mM
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mM
	Sodium Lactate	100 mM
	D (+) glucose	2 mM
	Penicillin-G potasium salt	0.6 g/L
	Streptomycin sulfate salt	0.5 g/L
B (x10)	NaHCO ₃	250 mM
C (x100)	Sodium Pyruvate	20 mM
D (x100) *	CaCl ₂ · 2H ₂ O	17.1 mM
F (x10,000) **	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mM
G (x250)	Glutamine	200 mM

各濃縮ストックを上記の倍率で滅菌水に添加する。
最後にBSAを0.4g/Lの濃度で加え、フィルター滅菌する。

* Ca不含KSOMには加えない。

** Ca不含KSOMの場合は、x 2,500で添加する。

引用文献

1. Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1952 ; 38 : 455–63.
2. GURDON JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* 1962 ; 4 : 256–73.
3. Laskey RA, Gurdon JB. Genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cells. *Nature.* 1970 ; 228 : 1332–4.
4. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science.* 1983 ; 220 : 1300–2.
5. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.* 1986 ; 320 : 63–65.
6. Robl JM, Gilligan B, Critser ES, First NL. Nuclear transplantation in mouse embryos: assessment of recipient cell stage. *Biol. Reprod.* 1986 ; 34 : 733–9.
7. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eystone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 1987 ; 37 : 859–66.
8. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 1988 ; 39 : 657–64.
9. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 1989 ; 41 : 414–8.
10. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997 ; 385 : 810–3.
11. Wakayama T, Perry a C, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.* 1998 ; 394 : 369–74.

12. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*. 1998 ; 282 : 2095–8.
13. 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, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 1999 ; 17 : 456–61.
14. Polejaeva I a, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman a, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 2000 ; 407 : 86–90.
15. Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*. 2000 ; 2 : 79–90.
16. Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 2001 ; 19 : 962–4.
17. Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard J-P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 2002 ; 20 : 366–9.
18. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 2002 ; 415 : 859.
19. Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li G-P, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*. 2003 ; 301 : 1063.
20. Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*. 2003 ; 424 : 635.

21. Zhou Q, Renard J-P, Friec G Le, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*. 2003 ; 302 : 1179.
22. Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*. 2004 ; 6 : 247–58.
23. Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*. 2005 ; 436 : 641.
24. Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod*. 2007 ; 77 : 285–91.
25. Berg DK, Li C, Asher G, Wells DN, Oback B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol. Reprod*. 2007 ; 77 : 384–94.
26. Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*. 2007 ; 9 : 130–7.
27. Folch J, Cocero MJ, Chesné P, Alabart JL, Domínguez V, Cognié Y, Roche a, Fernández-Arias a, Martí JI, Sánchez P, Echegoyen E, Beckers JF, Bonastre a S, Vignon X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*. 2009 ; 71 : 1026–34.
28. Wani N a, Wernery U, Hassan F a H, Wernery R, Skidmore J a. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod*. 2010 ; 82 : 373–9.
29. Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M, Nishida A, Ogura A. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet*. 2002 ; 30 : 253–4.
30. Wilmut I. Are there any normal clones? *Methods Mol. Biol*. 2006 ; 348 : 307–18.

31. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin H a, Renard J-P, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 2007 ; 39 : 295–302.
32. Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2013 ; 368 : 20110329.
33. Thuan N Van, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J. Reprod. Dev.* 2010 ; 56 : 20–30.
34. Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2006 ; 74 : 1083–9.
35. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan N Van, Wakayama S, Bui H-T, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006 ; 340 : 183–9.
36. Amarnath D, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of the timing of first cleavage on in vitro developmental potential of nuclear-transferred bovine oocytes receiving cumulus and fibroblast cells. *J. Reprod. Dev.* 2007 ; 53 : 491–7.
37. Kawakami M, Kato Y, Tsunoda Y. The effects of time of first cleavage, developmental stage, and delipidation of nuclear-transferred porcine blastocysts on survival following vitrification. *Anim. Reprod. Sci.* 2008 ; 106 : 402–11.
38. Kobayashi T, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of the timing of the first cleavage on the developmental potential of nuclear-transferred mouse oocytes receiving embryonic stem cells. *Theriogenology.* 2004 ; 62 : 854–60.
39. Mizutani E, Yamagata K, Ono T, Akagi S, Geshi M, Wakayama T. Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. *Dev. Biol.* 2012 ; 364 : 56–65.
40. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived

- from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002 ; 99 : 12889–94.
41. Li X, Kato Y, Tsunoda Y. Comparative studies on the mRNA expression of development-related genes in an individual mouse blastocyst with different developmental potential. *Cloning Stem Cells.* 2006 ; 8 : 214–24.
 42. Ovitt CE, Schöler HR. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 1998 ; 4 : 1021–31.
 43. Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* 1989 ; 8 : 2543–50.
 44. Avilion A a, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 ; 17 : 126–40.
 45. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 ; 126 : 663–76.
 46. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell.* 2005 ; 123 : 917–29.
 47. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998 ; 95 : 379–91.
 48. Wu G, Schöler HR. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen.* (London, England). 2014 ; 3 : 7.
 49. Keramari M, Razavi J, Ingman K a, Patsch C, Edenhofer F, Ward CM, Kimber SJ. Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. *PLoS One.* 2010 ; 5 : e13952.

50. Li X, Kato Y, Tsunoda Y. Comparative analysis of development-related gene expression in mouse preimplantation embryos with different developmental potential. *Mol. Reprod. Dev.* 2005 ; 72 : 152–60.
51. 大島一輝. マウス体細胞核移植卵の移植前診断法の開発. 近畿大学大学院農学研究科修士論文. 2013.
52. Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1982 ; 66 : 161–8.
53. Lawitts JA, Biggers JD. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol.* 1993 ; 225 : 153–64.
54. Morton HJ. A survey of commercially available tissue culture media. *In Vitro.* 1970 ; 6 : 89–108.
55. Rutzky LP, Pumper RW. Supplement to a survey of commercially available tissue culture media. *In Vitro.* 1974 ; 9 : 468–9.
56. Han Z-B, Lan G-C, Wu Y-G, Han D, Feng W-G, Wang J-Z, Tan J-H. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction.* 2006 ; 132 : 749–58.
57. Papaioannou VE, Ebert KM. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development.* 1988 ; 102 : 793–803.
58. YABUUCHI A, KATO Y, TSUNODA Y. Effects of Aggregation of Nuclear-transferred Mouse Embryos Developed from Enucleated Eggs Receiving ES Cells on In Vitro and In Vivo Development. *J. Reprod. Dev.* 2002 ; 48 : 393–397.
59. 辻優大. 核の初期化誘導処置ならびに妊娠増強処置がマウス体細胞核移植卵の発生脳に及ぼす影響. 近畿大学大学院農学研究科博士論文. 2011.

60. Seike N, Saeki K, Utaka K, Sakai M, Takakura R, Nagao Y, Kanagawa H. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. *Theriogenology*. 1989 ; 32 : 211–20.
61. Willadsen SM, Godke RA. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.* 1984 ; 114 : 240–3.
62. Tsunoda Y, Tokunaga T, Okubo Y, Sugie T. Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology*. 1987 ; 28 : 317–22.
63. Allen WR, Pashen RL. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J. Reprod. Fertil.* 1984 ; 71 : 607–13.
64. Reichelt B, Niemann H. Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J. Reprod. Fertil.* 1994 ; 100 : 163–72.
65. Mitalipov SM, Yeoman RR, Kuo H-C, Wolf DP. Monozygotic twinning in rhesus monkeys by manipulation of in vitro-derived embryos. *Biol. Reprod.* 2002 ; 66 : 1449–55.
66. TOGASHI M, SUZUKI H, MIYAI T, OKAMOTO MT. Production of monozygotic twins by splitting of 2-cell stage embryos in mice. *Japanese J. Anim. Reprod.* 1987 ; 33 : 51–57.
67. Grygoruk C, Sieczynski P, Modlinski J a, Gajda B, Greda P, Grad I, Pietrewicz P, Mrugacz G. Pressure induced nucleus DNA fragmentation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011 ; 28 : 363–8.
68. Grygoruk C, Pietrewicz P, Modlinski J a, Gajda B, Greda P, Grad I, Pietrzycki B, Mrugacz G. Influence of embryo transfer on embryo preimplantation development. *Fertil. Steril.* 2012 ; 97 : 1417–21.
69. Rybouchkin a, Heindryckx B, Elst J Van der, Dhont M. Developmental potential of cloned mouse embryos reconstructed by a conventional technique of nuclear injection. *Reproduction.* 2002 ; 124 : 197–207.

70. Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Schöler HR, McLaughlin KJ. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J.* 2003 ; 22 : 5304–12.
71. Terashita Y, Sugimura S, Kudo Y, Amano R, Hiradate Y, Sato E. Improving the quality of miniature pig somatic cell nuclear transfer blastocysts: aggregation of SCNT embryos at the four-cell stage. *Reprod. Domest. Anim.* 2011 ; 46 : 189–96.
72. Kawasumi M, Anzai M, Takehara T. Abnormal distribution of chromosomes in the first division of nuclear transferred mouse embryos. *J. Reprod. Dev.* 2007 ; 53 : 615–22.
73. Roberts RM, Katayama M, Magnuson SR, Falduto MT, Torres KEO. Transcript profiling of individual twin blastomeres derived by splitting two-cell stage murine embryos. *Biol. Reprod.* 2011 ; 84 : 487–94.
74. Sun JH, Zhang Y, Yin BY, Li JX, Liu GS, Xu W, Tang S. Differential expression of *Axin1*, *Cdc25c* and *Cdkn2d* mRNA in 2-cell stage mouse blastomeres. *Zygote.* 2012 ; 20 : 305–10.
75. Kameyama Y, Ohnishi H, Shimoi G, Hashizume R, Ito M, Smith LC. Asymmetrical allocation of mitochondrial DNA to blastomeres during the first two cleavages in mouse embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010 ; 22 : 1247–53.
76. Li L, Lu X, Dean J. The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol. Aspects Med.* 2013 ; 34 : 919–38.
77. Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 1995 ; 270 : 22077–80.
78. Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update.* n.d. ; 8 : 323–31.

79. Terashita Y, Wakayama S, Yamagata K, Li C, Sato E, Wakayama T. Latrunculin A Can Improve the Birth Rate of Cloned Mice and Simplify the Nuclear Transfer Protocol by Gently Inhibiting Actin Polymerization. *Biol. Reprod.* 2012 ; 86 : 180.
80. MacLean-Fletcher S, Pollard TD. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell.* 1980 ; 20 : 329–41.
81. Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* 1987 ; 213 : 316–8.
82. Gray D, Plusa B, Piotrowska K, Na J, Tom B, Glover DM, Zernicka-Goetz M. First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization. *Curr. Biol.* 2004 ; 14 : 397–405.
83. Azoury J, Lee KW, Georget V, Rassinier P, Leader B, Verlhac M-H. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr. Biol.* 2008 ; 18 : 1514–9.
84. Li H, Guo F, Rubinstein B, Li R. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat. Cell Biol.* 2008 ; 10 : 1301–8.
85. Simerly C, Wu GJ, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z, Asch R, Schatten G. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat. Med.* 1995 ; 1 : 47–52.
86. Terada Y, Simerly C, Schatten G. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 2000 ; 56 : 89–98.
87. Shen J, Wang Z, Shen X, Zheng Z, Zhang Q, Feng X, Hu L, Lei L. Abnormal dynamic changes in β -tubulin in somatic nuclear transfer cloned mouse embryos. *Zygote.* 2015 ; 23 : 76–82.

88. Zhang Q-H, Lei L. Dynamic changes of γ -tubulin in mouse somatic cell nuclear transferred embryos. *Sheng Li Xue Bao.* 2013 ; 65 : 158–64.
89. Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil. Steril.* 2000 ; 73 : 31–7.
90. Cooke S, Tyler JPP, Driscoll GL. Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum. Reprod.* 2003 ; 18 : 2397–405.
91. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, Tesarik J, Greco E. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum. Reprod.* 2003 ; 18 : 1289–93.
92. Yanaihara A, Iwasaki S, Negishi M, Okai T. Sperm retention site and its influence on cleavage rate and early development following intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2006 ; 23 : 63–7.
93. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997 ; 407 : 313–9.
94. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003 ; 113 : 631–42.
95. Dietrich J-E, Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development.* 2007 ; 134 : 4219–31.
96. Messerschmidt DM, Kemler R. Nanog is required for primitive endoderm formation through a non-cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* 2010 ; 344 : 129–37.
97. Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development.* 2003 ; 130 : 1673–80.

98. Li X, Kato Y, Tsuji Y, Tsunoda Y. The effects of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development-related genes in cloned mouse blastocysts. *Cloning Stem Cells*. 2008 ; 10 : 133–42.
99. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007 ; 448 : 313–7.
100. Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, Kuwana T, Kehler J, Abe K, Schöler HR, Suda T. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.* 2003 ; 258 : 209–225.
101. Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Yamamoto Y, Takano K, Kohda T, Ishino F, Ogura A. Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biol. Reprod.* 2003 ; 69 : 1394–400.
102. Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.* 2001 ; 58 : 376–83.
103. Szczepańska K, Stańczuk L, Maleszewski M. Oct4 protein remains in trophectoderm until late stages of mouse blastocyst development. *Reprod. Biol.* 2011 ; 11 : 145–56.
104. Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 2002 ; 16 : 1209–19.
105. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 ; 292 : 154–6.
106. Kalmar T, Lim C, Hayward P, Muñoz-Descalzo S, Nichols J, Garcia-Ojalvo J, Martínez Arias A. Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 2009 ; 7 : e1000149.
107. Kato Y, Tsunoda Y. Role of the donor nuclei in cloning efficiency: can the ooplasm reprogram any nucleus? *Int. J. Dev. Biol.* 2010 ; 54 : 1623–9.
108. Hirasawa R, Matoba S, Inoue K, Ogura A. Somatic donor cell type correlates with embryonic, but not extra-embryonic, gene expression in postimplantation cloned embryos. *PLoS One*. 2013 ; 8 : e76422.

109. Bessonnard S, Mot L De, Gonze D, Barriol M, Dennis C, Goldbeter A, Dupont G, Chazaud C. Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development*. 2014 ; 141 : 3637–48.
110. Lanner F. Lineage specification in the early mouse embryo. *Exp. Cell Res*. 2014 ; 321 : 32–9.
111. Schrode N, Xenopoulos P, Piliszek A, Frankenberg S, Plusa B, Hadjantonakis A-K. Anatomy of a blastocyst: cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo. *Genesis*. 2013 ; 51 : 219–33.
112. Sun LT, Yamaguchi S, Hirano K, Ichisaka T, Kuroda T, Tada T. Nanog co-regulated by Nodal/Smad2 and Oct4 is required for pluripotency in developing mouse epiblast. *Dev. Biol*. 2014 ; 392 : 182–92.
113. Takaoka K, Hamada H. Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development*. 2012 ; 139 : 3–14.
114. Rappolee D, Basilico C, Patel Y, Werb Z. Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. *Development*. 1994 ; 120 : 2259–69.
115. Kuijk EW, Puy L Du, Tol HTA Van, Oei CHY, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BAJ. Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev. Dyn*. 2008 ; 237 : 918–27.
116. Magnani L, Cabot RA. In vitro and in vivo derived porcine embryos possess similar, but not identical, patterns of Oct4, Nanog, and Sox2 mRNA expression during cleavage development. *Mol. Reprod. Dev*. 2008 ; 75 : 1726–35.
117. Harvey MB, Kaye PL. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 1992 ; 31 : 195–9.
118. Harvey MB, Kaye PL. IGF-2 stimulates growth and metabolism of early mouse embryos. *Mech. Dev*. 1992 ; 38 : 169–73.

119. Brice EC, Wu JX, Muraro R, Adamson ED, Wiley LM. Modulation of mouse preimplantation development by epidermal growth factor receptor antibodies, antisense RNA, and deoxyoligonucleotides. *Dev. Genet.* 1993 ; 14 : 174–84.
120. Adamson ED. Activities of growth factors in preimplantation embryos. *J. Cell. Biochem.* 1993 ; 53 : 280–7.
121. Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinol.* 2002 ; 172 : 221–36.
122. Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Naruse M, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Variation in gene expression and aberrantly regulated chromosome regions in cloned mice. *Biol. Reprod.* 2005 ; 73 : 1302–11.
123. 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. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science.* 2010 ; 330 : 496–9.
124. Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011 ; 108 : 20621–6.
125. Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, Zhang Y. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell.* 2014 ; 159 : 884–95.
126. Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, Nakano T, Abe K, Ogura A. Trichostatin A specifically improves the aberrant expression of transcription factor genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Sci. Rep.* 2015 ; 5 : 10127.
127. Park S-J, Komata M, Inoue F, Yamada K, Nakai K, Ohsugi M, Shirahige K. Inferring the choreography of parental genomes during fertilization from ultralarge-scale whole-transcriptome analysis. *Genes Dev.* 2013 ; 27 : 2736–48.

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、終始多大なる御指導、御助言を賜り、さらに本論文の御校閲の労を賜りました、近畿大学農学部・バイオサイエンス学科・動物発生工学研究室教授、加藤 容子 博士に深甚なる謝意を表します。

本論文を御校閲頂きました、近畿大学農学部・バイオサイエンス学科教授、重岡 成 博士、及び、同教授、佐渡 敬 博士に深く感謝の意を表します。

そして、平成 24 年度をもって御退官されました、近畿大学農学部・バイオサイエンス学科・動物発生工学研究室名誉教授、角田 幸雄 博士には有意義な御指導および御助言を賜り、深く感謝の意を表します。

また、数多くの御助言を賜りました、近畿大学農学部・バイオサイエンス学科・動物発生工学研究室講師、谷 哲弥 博士に感謝の意を表します。

本研究の遂行上、御助言や御協力を頂きました、辻 優大 博士（現・英ウィメンズクリニック）、水本 茂利 博士（現・蔵本ウィメンズクリニック）、中野 真夕 修士（現・IVF 大阪クリニック）、藤本 好美 修士（現・株式会社ソフトウェアサービス）、杉本 貴章 修士（現・府中のぞみクリニック）、辻 暖永 修士（現・浅田レディースクリニック）、松下 淳 修士（現・滋賀医科大学大学院在籍）、宮崎 翔 修士（現・ミオファティリティクリニック）、清水 聡一郎 修士（現・府中のぞみクリニック）、山口 正義氏、有福 昂平氏、秦 仁樹氏、中田 雄太氏、田口 美里氏、成宮 有里佳氏、井谷 裕紀氏をはじめ、過去に修了された動物発生工学研究室の諸先輩方や後輩達、大学院在籍中の後輩達に感謝の意を表すると共に、これからの御活躍をお祈りいたします。

そして、長年にわたり私の学生生活を支えてくださった両親には、深く感謝の意と敬意を表します。最後に、共に研究に勤しみ、励ましの言葉をかけて下さいました、学科、専攻の先輩、同輩、後輩の皆様に感謝いたします。

平成 27 年 初冬
大島 一輝