

学位論文審査結果の報告書

氏 名 東 里香

生 年 月 日 昭和(平成)4 年 1 月 5 日

本 籍 (国籍) 和歌山県

学位の種類 博 士 (工 学)

学位記番号 生 第 56 号


学位授与の条件 学位規程第5条該当
(博士の学位)


論 文 題 目 マウス卵子を用いた
体細胞核移植胚の発生能に
関する研究


学位論文受理日 令和 2年 1 月 24日

学位論文審査終了日 令和 2年 2 月 6 日


審 査 委 員

(主 査) 三谷 匡 

(副主査) 宮本 裕史 

(副主査) 大和 勝幸 

(副 査) _____ 

指 導 教 員 松本 和也 

論文内容の要旨

個体発生は、1つの精子と1つの卵子の受精に始まる。受精卵は、個体を構成するすべての細胞にも分化可能な全能性を有する。その後、細胞分裂を経ることによりその能力を失うと共に様々な細胞への分化が進行し、それぞれの機能を獲得し個体を構成する。体細胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer: SCNT) は、この分化した細胞を除核卵子へ直接的に注入することによって個体作出を可能にする技術である。このSCNT技術を用いて作出された体細胞クローン動物は、現在までに家畜動物から愛玩動物まで20種余りの生物に及ぶ。さらに、このSCNT技術を用いた研究の発展は、核のリプログラミングや全能性の再獲得に関する研究や、刷り込み遺伝子の機能解析や細胞の発生と分化の制御機構に関する研究などの基礎生物学分野における生命現象の解明のみならず、希少動物や畜産動物の人工繁殖分野、さらにはミトコンドリア病の伝播を回避するための臨床応用などの医学分野を含め多岐にわたる研究分野に貢献している。しかしながら、このように広範な研究への可能性があるものの、SCNT技術が実用的な研究ツールとして適用された研究は少ない。その理由は、得られる再構築胚の発生率や個体作出効率が数%と非常に低いことが挙げられる。近年、Miyamotoらは、deionized Bovine Serum Albumin (d-BSA)存在下で、Trichostatin (TSA)およびVitamin C (VC)をSCNT後の培養培地へ添加することによって胚盤胞期への発生率および産子作出効率の大幅な改善に成功した (Miyamoto et al., 2017)。そこで、本研究では、この新しいSCNT技術に着目して、その精査・改善とその応用を目的に、以下の実験を行った。まず、第2章において、この2017年に報告された効率的かつ簡易化したSCNT技術の有効性を再検討し、詳細を公開することにした (Azuma et al., 2018)。次に、第3章では、このSCNT技術を応用した遺伝資源の活用方法を実証展示するために、環境指標モデル動物のアカネズミについて、マウス卵子を代用卵子としたアカネズミ尾部由来線維芽細胞の異種間核移植 (interspecies SCNT: iSCNT) による胚発生能を検討した。最後に、第4章では、生殖能力を喪失した高齢な動物からのSCNT技術を用いた個体作製を目的として、27ヵ月齢マウス由来線維芽細胞のSCNT後の発生に与える影響を検討した。

第2章では、前述したd-BSA存在下でTSA/VCを用いた組み合わせ処理によるSCNT技術の再検討を行った。卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) をドナー細胞として除核卵子へ不活化センダイウイルスを用いた細胞融合法により移植し、再構築卵子の作製効率および胚盤胞期への発生能を調べた。移植後、融合した卵子は、卵丘細胞およびMEFのいずれにおいても高効率で早期染色体凝集 (Premature chromosome condensation: PCC) を形成し (100%、92%)、活性化処理後においても偽前核の形成率および

2細胞期胚への発生率は、TSA/VCの処理にかかわらず非常に高かった。また、胚盤胞期への発生において、卵丘細胞およびMEFのどちらの細胞を用いて作製されたSCNT胚でも、TSA/VC処理した区において、未処理区と比較して有意に高い発生率が示された(卵丘細胞: 89%(135/152) vs 39%(32/83), MEF: 71%(88/124) vs 27%(29/109))。さらに、卵丘細胞に由来するTSA/VC処理区の再構築2細胞期胚をレシピエントマウスに胚移植した結果、移植した胚のうち、7.8%で生存産子を得ることが可能であり、それら産子の胎盤は過形成が認められ、これまでに報告されるクローンマウスの形態的特徴と一致した。これらの結果から、新しく開発されたSCNT法は、技術的に簡易であり、非常に高い効率で胚盤胞期胚および産子を得ることが示された。このSCNT法の詳細なプロトコールのWEBへの公開は、SCNTを用いた発生・生殖生物学分野への研究に貢献することが期待される。

第3章では、第2章で示したSCNT法を用いた遺伝資源の保全法の構築のために、アカネズミマウスiSCNT胚の発生能を検討した。アカネズミは、日本固有の普通種であり、古くから地理的な条件による遺伝的多様性の解析に用いられる小型の齧歯類であるが、近年、放射能による生殖機能への影響を評価するための環境指標動物として用いられている。この動物は、飼育下における繁殖能が低く、また体外受精による胚発生もほとんど得られていないため、マウス卵子を代用したiSCNT技術の開発が望まれる。そこで、本実験では、SCNT法を応用したアカネズミマウスiSCNT胚の発生能を検討した。アカネズミの尾部組織から樹立した線維芽細胞をドナー細胞としてiSCNTを行った結果、TSA/VC処理の有無にかかわらず、2細胞期へ発生することが示された(処理区: 93%(79/85), 未処理区: 64%(34/53))。さらに、iSCNT胚におけるエピジェネティックな動態に関する解析を行った。受精卵ではヒストンH3の9番目のリジンのトリメチル化(H3K9me3)の低下が胚発生で重要であり、マウスSCNT胚ではTSAによりH3K9me3レベルが低下することが示されている。しかしながら、iSCNT由来2細胞期胚では、H3K9me3の著しい低下が観察されたものの、4細胞期以降への発生は著しく低下した(処理区: 2%(2/85), 未処理区: 0%(0/53))。また、胚性遺伝子の活性化(Zygotic genome activation: ZGA)に関与するヒストン修飾(H3K4me3)を調べた結果、2細胞期胚において未処理区と同様のメチル化状態にあることが示された。そこで、iSCNT胚の発生能を改善するために、ドナー細胞への2つの条件について検討した。(1)ドナー細胞の卵細胞質内への曝露する時間がiSCNT胚の発生能へ与える効果を調べた。その結果、曝露時間を1時間区と3時間区に分けて検討したところ、3時間の曝露により4細胞期への発生がわずかではあるが認められた(4%(5/139))。(2) iSCNT前のドナー細胞に対するVC処理によるH3K9me3の低下が発生能へ与える効果を検討した。VCをアカネズミ

H3K9me3の低下が発生能へ与える効果を検討した。VCをアカネズミ線維芽細胞の培養下へ添加すると、時間依存的にH3K9me3が低下し、さらに、25 μ g/mLの濃度条件において最も低メチル化状態になることが明らかとなった。したがって、VCがアカネズミ線維芽細胞のH3K9me3を低下させる最適な条件として25 μ g/mL VC・72時間処理を設定した。しかしながら、この低メチル化処理を施したアカネズミドナー細胞を用いてiSCNTを行い、さらに卵細胞質内で3時間曝露後活性化させた場合においても、再構築卵子の4細胞期以降への発生は認められないことが示された。これらのことから、アカネズミ尾部由来細胞は、iSCNT後の3時間の卵細胞質内曝露処理とTSA/VC処理の併用をベースに改善を加えることにより、2細胞期を超えて発生が促進される可能性を示した。

第4章では、老齢動物からの遺伝資源保存を目的として、ライフスパンの短いマウスの老齢個体(27ヵ月齢)から樹立した耳介由来培養細胞の老化状態を評価し、SCNTによる再構築胚の発生能を検討した。まず、供試した27ヵ月齢マウスの生殖能力を調べた結果、発情周期は常に発情休止期にあり、過剰排卵処置による排卵誘起しても排卵卵子は得られず、卵巣内には2個の卵胞形成のみが観察され、組織の著しい線維化が認められた。さらに、樹立した細胞においても、細胞老化マーカーのSA- β -Gal活性および細胞周期の停止と関連するmicroRNA34a遺伝子の発現量がコントロールとして用いた10週齢マウス由来細胞と比較して上昇を示した。しかしながら、テロメア長は10週齢マウス由来細胞と同等であることが示された。これは、マウスではヒトと異なり、成体の体細胞でもテロメラーゼ活性が維持されており、樹立した細胞ではテロメア長の短縮を確認することができなかったと考えられる。この27ヵ月齢マウス由来細胞を用いてSCNT胚を作製した結果、10週齢マウス由来細胞の初期発生と比較して、同程度の発生能を有することが明らかとなった。このことから、ドナー細胞の老化状態はSCNT後の初期胚発生に影響を与えないことが示唆された。これらのことから、生殖能を喪失し次世代を残すことが難しい個体からのSCNT技術を応用した人工繁殖技術の開発は遺伝資源の保存において大いに意義があると考えられる。

以上のことから、従来、習得が難しい手技を必要としてきたマウスSCNT技術について、細胞融合工程の簡易化ならびに再構築胚およびクローンマウス作製の効率化を同時に達成することに成功し、汎用性の高い技術開発への可能性が拓がった。SCNT技術の汎用化は、核のリプログラミング研究のみならず、遺伝資源保全を目的とした新しい人工繁殖技術の開発や新奇の医療技術の開発の糸口につながる新しい知見を提供するツールとして期待される。本研究の知見を基盤にさらなるSCNT技術の開発が求められる。

論文審査結果の要旨

哺乳類において、体細胞を除核した卵子へ直接的に注入することによって、分化した体細胞から個体を再構築することが可能になっている。これまでに、体細胞核移植(Somatic cell nuclear transfer: SCNT)技術を用いて、家畜動物から愛玩動物まで広く体細胞クローン動物が作製されている。さらに、SCNT技術は、生物現象を科学的に探究する基礎生物学から野生動物学分野や臨床応用のための医学分野まで幅広く利用が期待されている。特に、SCNT技術を用いれば、遺伝的に均一な系統が短期間で得られるため、実験動物として様々な研究に使われるマウスにおける利点は大きい。しかしながら、様々な哺乳類において体細胞クローン動物の作出報告があるものの、世界で初めてのクローン羊「Dolly」から20年が経過する今でも成功効率は低く、特に、マウスSCNT技術においては依然として高度な操作技術が要求される。本研究は、マウスにおいてSCNT工程の簡易化を図るとともに、SCNT技術を用いて作製される再構築胚の発生成の改善を目的としている。第2章では、deionized Bovine Serum Albumin(d-BSA)存在下でTrichostatin A(TSA)およびVitamin C(VC)を組み合わせた、新たに開発されたSCNT技術(TSA/VC法)について、再構築胚の発生成を再検討するとともに、その詳細なプロトコールの確立と公開を行っている。さらに、第3章では、SCNT技術を利用した遺伝資源の活用の応用事例として、アカネズミのモデル動物化を目的としてマウス卵子を用いたアカネズミ尾部由来線維芽細胞からの異種間体細胞核移植(interspecies somatic cell nuclear transfer: iSCNT)を行い、第2章で確立したTSA/VC法を用いたiSCNT胚の発生成を検証している。最後に、第4章では、生殖能力を失った高齢な動物からの次世代個体の作出を目的として、27ヵ月齢の加齢マウス由来線維芽細胞からTSA/VC法で作製した再構築胚の発生成について検証している。本研究で得られた成果は、以下のようにまとめることができる。

第2章では、d-BSA+TSA/VCの組み合わせ処理による新たに開発されたマウスSCNT技術(TSA/VC法)を用いて、卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞(MEF)をドナー細胞として再構築胚の作製を再検討している。ドナー細胞をHemagglutinating virus of Japan Envelope(HVJ-E)を用いて移植後、活性化処理による偽前核の形成率および2細胞期胚への発生成率は、TSAおよびVCの処理にかかわらず高いことを示している。さらに、TSAおよびVC処理により、2細胞期以降、胚盤胞期への発生成は、卵丘細胞およびMEFいずれの細胞を用いた場合もSCNT胚の発生成率は未処理区と比較して有意に高いことを認めている。さらに、作製された2細胞期胚をレシピエントマウスへ移植することによって高率にクローンマウスの作出に至っている。得られたクローンマウスの胎盤はこれまでに報告される形態的特徴である胎盤肥大を有していた。また、本研究のHVJ-Eを用いた細胞融合法は、SCNT卵子の作製効率の大幅な改善と手順の簡易化を実現している。総じて、新しく開発されたSCNT法が技術的に簡易でかつ高効率で胚盤胞期胚およびクローンマウスを作出可能であることを示している。さらに、このSCNT技術の普及に努めるために、その詳細なプロトコールのWEB公開に至っており、発生・生殖生物学分野への研究に寄与するところが大きいと評価できる。

第3章では、第2章で示したSCNT法を用いた遺伝資源の活用法の構築を目的として、アカネズミ尾部由来線維芽細胞をマウス除核卵子へ細胞融合することにより作製したiSCNT胚の発生成について検討している。日本固有種であるアカネズミは、国内に広く生息する小型げっ歯類であり、原子力発電所からの放射線および放射性物質が哺乳類へ与える影響の評価などで利用され環境指標動物に指定されている。そうした背景から、アカネズミの環境モデル動物化に対するニーズが高まっているが、飼育下における繁殖能が低く、さらには体外受精による発生胚の確保も難しい状況にある。そのため、マウス卵子を代用したiSCNT技術の開発はその解決手段のひとつ

つとして挑戦的であり新規性が高いと評価できる。アカネズミ由来線維芽細胞を用いて作製したiSCNT卵子は、TSA/VC法の有無に関わらず、高率に2細胞期へと発生することが示されている。さらに、本研究ではiSCNT胚におけるエピジェネティックな動態に関する解析を行っている。受精卵ではヒストンH3の9番目のリジンのトリメチル化(H3K9me3)の低下が胚発生で重要であることが明らかとなっており、マウスSCNT胚ではTSAによりH3K9me3レベルが低下することが示されている。本章で得られたiSCNT2細胞期胚においてもTSA/VC法によりH3K9me3レベルの低下を認めている。また、H3K4me3は遺伝子発現促進型のヒストン修飾であると考えられているが、TSA/VC処理の有無にかかわらずマウスSCNT胚と同様に維持されていることを示すなど、iSCNTにおける分子生物学的なエビデンスを提供する貴重な情報であると評価できる。しかし、4細胞期以降の胚発生については著しく低下することから、TSA/VC法のみではiSCNT胚の胚発生を支持できないことが示された。そこで、iSCNT胚の発生能を改善するために、アカネズミドナー細胞の卵細胞質内曝露時間が発生能へ与える効果ならびに、低H3K9me3レベルに誘導したアカネズミドナー細胞が発生能へ与える効果について検討している。その結果、SCNT後、活性化処理まで卵細胞質への曝露を3時間まで延長することにより、4細胞期への発生率がわずかながら増加すること、ドナー細胞に対してVC処理をSCNT前に施すことによりH3K9me3レベルの低下を誘導することは可能であるがiSCNT胚の発生能には変化がないことが示されている。これらの結果は、アカネズミーマウスiSCNT胚の発生能の改善には至らなかったが、一部のiSCNT胚で発生能がわずかに向上したことを示している。この成果は、マウス卵子を用いたアカネズミーマウスiSCNT胚の発生能を評価した初めての報告であり、SCNTを用いた遺伝資源の活用への取り組みとして高く評価できる。

第4章では、老齢個体からの遺伝資源の次世代への継承を目的として、27ヵ月齢マウスの老化状態を評価し、老化個体に由来するドナー細胞のSCNT後の胚発生に与える影響を検討している。27ヵ月齢マウスでは、発情周期が認められないこと、過剰排卵処置後の卵巣の組織学的解析で卵子がほとんど消失していることから、生殖機能はすでに喪失していることが確認された。さらに、耳介から樹立した線維芽細胞は、細胞老化マーカーのSA- β -Gal活性が上昇し、細胞周期と関連するmicroRNA34a遺伝子発現が増加していることを認めている。しかし、老齢マウス由来線維芽細胞では、対照区の10週齢マウス由来線維芽細胞と比較してテロメア長の短縮はみられないことが示されている。この細胞をドナーとして作製した再構築胚では、10週齢マウス由来線維芽細胞を用いた場合と比較して、その発生率はほぼ同じであることが示されている。このことは、初期胚発生において老齢マウス由来細胞の発生率への影響はないことが示唆されている。ただし、本研究で提供された老化マウスの遺伝的バックグラウンドはC57BL/6系統であり、同系統からのクローンマウスの作出は報告されていないことから、クローン個体の作出には至っていない。しかし、胚移植後の成績において妊娠満期まで対照区と同様の胎子発生を示すなど、発生能の顕著な低下は示されていない。これらの結果から、生殖能を持たない次世代を残すことが難しい個体からのSCNT技術を応用した遺伝資源保全に関する知見は評価できる。

これらの研究によって得られた様々な知見、新たに技術開発されたより簡便なSCNT技術は、生殖工学技術の基盤となる。遺伝資源の活用方法の探索および開発を進めることは、今後、希少な動物種あるいは絶滅危惧種への適用へも重要な意味を持つと考えられる。以上のように、本論文は博士(工学)論文として価値のあるものと認める。