

博士學位論文

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

令和2年1月23日

近畿大学大学院
生物理工学研究科生物工学専攻
東里香

目次

第 1 章	緒論	1
第 2 章	HVJ-Envelope, Trichostatin A および Vitamin C の 組み合わせによる体細胞核移植技術の改善	6
第 1 節	緒言	6
第 2 節	HVJ-Envelope, Trichostatin A および Vitamin C の 組み合わせによる体細胞核移植技術の簡易化および 産子作出効率の改善	8
第 3 節	小括	30
第 3 章	アカネズミーマウス異種間核移植胚の発生能の検討	31
第 1 節	緒言	31
第 2 節	アカネズミーマウス異種間核移植胚におけるヒストンメチル化 修飾の局在および発生能の検討	34
第 3 節	ドナー細胞の卵細胞質内曝露が異種間核移植胚の 発生能へ与える効果	51
第 4 節	ドナー細胞の培養下への Vitamin C 添加が H3K9me3 へ 与える効果	57
第 5 節	Vitamin C 処理したアカネズミドナー細胞による 異種間核移植胚の発生能の検討	64
第 6 節	小括	70

第4章	老齡マウス由来体細胞を用いたクローンマウスの作出	72
第1節	緒言	72
第2節	老齡マウス由来初代培養細胞の老化評価	74
第3節	老齡マウス由来初代培養細胞を用いた 核移植胚の発生能の検討	89
第4節	小括	93
第5章	総括	94
	参考文献	99

謝辞

第 1 章 緒論

個体発生は、精子と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へ分化可能な全能性を有する。その後、卵割・細胞分裂を経て、その能力を失うと共に様々な細胞への分化が進行し、個体を構成する。体細胞核移植(Somatic cell nuclear transfer: SCNT)技術は、この分化した細胞と核を除いた未受精卵子（除核卵子）を用いて直接的な個体作出を可能にする。1997年、Wilmutらは6歳のヒツジの乳腺細胞をドナー細胞として、除核したヒツジ卵子へ移植することによってクローンヒツジ「Dolly」の作出に成功し、哺乳類の体細胞の分化が可逆的であることを初めて証明した(Wilmut *et al.*, 1997)。その翌年の1998年に、卵丘細胞を用いてクローンマウス「Cumulina」の作出が報告された(Wakayama *et al.*, 1998)。こののち、ウシ(Kato *et al.*, 1998)、ヤギ(Baguisi *et al.*, 1999)、ブタ(Polejaeva *et al.*, 2000)、ウサギ(Chesne *et al.*, 2002)、ネコ(Yin *et al.*, 2005)、ウマ(Galli *et al.*, 2003)、ラット(Zhou *et al.*, 2003)、ラバ(Woods *et al.*, 2003)、イヌ(Lee *et al.*, 2005)、フェレット(Li *et al.*, 2006)、バッファロー(Shi *et al.*, 2007)、ラクダ(Wani *et al.*, 2010)、サル(Liu *et al.*, 2018)などの家畜動物や実験動物から愛玩動物までの20種類にもなる多数の種で成功の報告がある(Rodriguez-Osorio *et al.*, 2012; Ogura *et al.*, 2013)。このSCNT技術は、核のリプログラミングや全能性の再獲得に関する研究、刷り込み遺伝子の機能解、細胞の発生と分化の制御機構等に関する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、さらには病の伝播を回避するための臨床応用に向けた医学研究分野などに応用されている。しかしながら、このように広い研究の可能性があるものの、SCNT技術を実用化レベルのツールやでを使用して研究した知見は少ない。その理由は、SCNT技術を用いて作製する再構築胚や個体作出に係る効率が数%と非常に低いことが挙げられる。併せて、作製された再構築胚やクローン動物には、何らかの複数の異常が報告される(Ogura *et al.*, 2013)。例えば、再構築胚に観られ

る異常としては、細胞の多能性に関わる Oct4 遺伝子を初めとする遺伝子の異常な発現が観られること (Boiani *et al.*, 2002) やドナー細胞によって持ち込まれたヒストンのメチル化異常が観られること (Matoba *et al.*, 2014) が知られている。出生後のクローンマウスにおいては、胎盤肥大 (Wakayama and Yanagimachi, 1999) や呼吸器系の異常 (Eggan *et al.*, 2001) や肥満 (Tamashiro *et al.*, 2000) が観られる (Nguyen ら、2006)。これらの異常がなぜ頻発するのかということやその原因については、体細胞クローン動物の作出に初めて成功した 1997 年から 20 年以上が経過した今でも未解明なままの部分が多く存在し、研究を進めるためにも成功効率の高い SCNT 技術の開発が望まれる。

SCNT 技術の効率改善に向けた研究は、各研究者によって長年取り組まれている。薬剤を直接的に培地へ添加する実験系において、Wakayama らは、再構築卵子の活性化培地へ 1% Dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加することによって、その後の発生能を改善できることを初めて報告している (Wakayama and Yanagimachi, 2001)。現在では、DMSO に DNA 脱メチル化作用があり、それが初期化を促したと考えられている。さらに、その後、Kishigami らによって活性化培地へのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (Histone deacetylase inhibitor, HDACi) の Trichostatin A (TSA) の添加が胚盤胞期への胚発生能だけでなく産子作出効率を改善する報告がされている (Kishigami *et al.*, 2006)。この後、TSA は、ウシ (Lee *et al.*, 2011) などの他の動物種でも効果が認められることになる。さらに、TSA 処理されて作製された再構築胚内では、ヒストンのアセチル化や DNA メチル化に関わる酵素の遺伝子群および多能性関連遺伝子群の発現量が増加していることが観察されており、これらが胚発生能を向上していると考えられている (Li *et al.*, 2008)。この TSA を添加する SCNT 技術により、それまでクローニング不可能だった非近交系 (ICR) マウスからのクローンマウスの作出が報告されている (Kishigami *et al.*, 2007)。しかし、それらの改善報告はあるものの、その成功率はいずれも 5% 程度であり実用的なレベルに達するにはさらなる研究が必要とされる。

よりクリティカルなクローン胚発生能の向上は、様々な複合要因の改善によって達成されると考えられており、近年、様々な原因解明や効率改善例が報告されている。Inoue らは、雌細胞内に発現している性染色体の1つである X 染色体にある遺伝子群が SCNT に由来する胚盤胞期胚で発現量が低下していることを証明しており (Inoue *et al.*, 2010)、その原因遺伝子とされる *Xist* 遺伝子の発現を RNA 干渉技術により発現抑制することにより、その後の胚発生率が向上することが判っている (Matoba *et al.*, 2011)。さらに、近年の RNA-sequence 解析技術の発展により、SCNT に由来する 2 細胞期胚内のヒストンのメチル化修飾の維持がその後の胚発生を阻害することが報告されている (Matoba *et al.*, 2014)。このメチル化修飾の他に、クロマチンの構成タンパクであるコアヒストンの翻訳後修飾には、アセチル化、リン酸化およびユビキチン化が知られており、遺伝子発現の制御に主として関わるものとしてヒストン H3 および H4 のリジン残基およびアルギニル残基がある (青木ら、2007)。Li らは、特に、ヒストン H3 のリジン残基を脱メチル化する酵素 (Lysin(K) demethylase(KDM) family) *Kdm4b* および *Kdm5b* をコードする遺伝子の mRNA を SCNT 胚内へ導入することにより一時的に脱メチル化を誘引し、胚発生能を改善できることを報告している (Liu *et al.*, 2016)。これらの報告は、遺伝子改変を必要とすることなく SCNT 胚の発生能を改善できることを示している。

一方で、これまで SCNT には、高い技術力が求められ、研究者のテクニックに大きく左右されることから、異なる研究室における再現性が難しい場合があった。さらに、一度に作製できる胚の数が熟練者においても 1 時間に 100 個程度と限られるため、技術的な改良が行われている。Wakayama らの SCNT 法 (Honolulu 法) は、除核未受精卵子の作製から細胞注入操作までを連続した手順で行うことが可能であることから多数の卵子を処置できるものの、卵細胞膜へのダメージが大きく、実際には生存卵子を得ることが難しく、マイクロマニピュレーション操作の習熟は必要不可欠であった (Wakayama *et al.*, 1998)。この SCNT 技術の複雑な操作は、電気融合装置を用いて細胞を卵細胞膜と融合させる方法 (Ogura *et al.*, 2000) およ

びセンダイウイルスの膜融合能を利用する細胞融合法(Ono *et al.*, 2001)による改良が報告されている。しかしながら、注入法を用いる場合と比較して、融合法による SCNT 技術は、高価な機器や特殊な設備を要するものの、生存胚の作製を容易にした。さらに、SCNT 後の培養条件の改良として、Cytochalasin B(CB)の代替に、毒性の低い Latruncrin A(Lat A)を用いた結果、胚発生能が強化されること(Terashita *et al.*, 2012)や胚培養液に含まれるウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin: BSA)内の金属イオンの脱イオン化は、胚発生能を改善することを報告している(Isaji *et al.*, 2015)。しかしながら、より実用的に SCNT を研究へ用いるには、さらなる効率のよい SCNT 技術の開発が必要である。第 2 章では、共同開発した TSA および Vitamin C(VC)の小分子および脱イオン化 BSA(deionized BSA: d-BSA)を用いたクローンマウス生産システム(Miyamoto *et al.*, 2017)の有効性をさらに検討し、ビデオジャーナルによる詳細なプロトコールの公開を行った(Azuma *et al.*, 2018)。上記のマウス SCNT 技術を応用した研究として、野生動物の保全に役立つ技術開発を検討することは多いに意義がある。

近年の野生動植物の減少を鑑みて、平成 21 年 1 月に「絶滅のおそれのある野生動植物種の生息域外保全に関する基本方針」が発表されている。この基本指針によると、種の絶滅を回避し、種内の遺伝的多様性を維持することを最終目標として、①緊急避難、②保険としての種の保存、③科学的知見の集積、のこれら 3 点が実施目的と定められており、特に、科学的知見の集積においては、生息域内の種の存続が困難となる危険性のある種について、生息域外の個体群から予め増殖技術や遺伝的多様性の現状把握が求められている。また、生物を保全する重要性は、比較的数の多い普通種や近年の環境変化に伴って増加している動物に対しても検討されつつあり、野生動物の保全は共存することが重要であると提唱され(樋口、1996)、野生動物全般を様々な方面から保全する策の必要性を示唆している。

現在、野生動物の遺伝的多様性を保護するために取り組まれている生息域外保全としては、①飼育下個体群の遺伝子保存、②生殖細胞保存、③遺伝子情報の保存が

計画・実施されている(小池ら、2007)。実際に、野生動物を飼育する動物園や水族館等を飼育している施設では、施設同士の連携による人工繁殖が取り込まれており、近年では、ハズバンドガリートレーニング等を用いた健康状態の管理や飼育技術の向上が飼育下における寿命を引き延ばしている。その一方で、飼育されている動物は、高齢化によって次世代の作出が難しい状況にあり、家畜動物や実験動物で確立されている技術の応用が検討されている。遺伝子保存の具体的技術として、冷凍動物園の構想から生殖・発生工学的繁殖に用いるために、本邦では、生殖細胞や血液・組織保存および組織から樹立した培養細胞の保存が進められている。

前述した SCNT 技術は、再構築した胚盤胞期胚から胚性幹細胞(nuclear transfer embryonic stem(nteS) cells)を樹立できる(Mizutani *et al.*, 2008)。しかしながら野生動物の場合、卵子を得ることが難しい。そのため、他の動物の卵子を代用する異種間核移植(interspecies SCNT: iSCNT)技術開発は、野生動物由来胚性幹細胞を樹立することができる重要なツールであり、現存する動物を傷つけることなく、繁殖に供試可能な精細胞や卵子の作製が期待されている。

また、展示動物の高齢化の現状を鑑みると、今後、細胞の樹立に供試される動物もまた高齢や老齢になることも予測される。人工繁殖技術として SCNT 技術が実用化されるには個体の老化と培養細胞のリプログラミング能の関係性を検証することが必要である。

以上のことから、本研究では、第 2 章で公開したマウス卵子を用いた SCNT 技術を応用し、新たな発生工学的アプローチによる遺伝資源の保全技術を開発することを目的として、第 3 章ではアカネズミから樹立した尾部由来線維芽細胞を用いて作製した iSCNT 胚の発生能を検討した。さらに老化とリプログラミング能の関係性を検討する一助として、第 4 章では、老齢マウス由来線維芽細胞を用いて再構築した胚の発生能を検討した。

第 2 章 HVJ-Envelope, Trichostatin A および Vitamin C の 組み合わせによる体細胞核移植技術の改善

第 1 節 緒言

マウス SCNT 技術は、前述した通り 1998 年に初めてのクローンマウスの作製 (Wakayama *et al.*, 1998) が報告されて以来、技術的な効率の低さや再構築胚内の異常について未解明な部分が残されている。その原因解明には、多くの胚を解析する必要があるが、技術的な難しさは作製できる個数を制限する。SCNT 技術は、まずピエゾドライブユニットを装着したマイクロピペットを駆使して第 2 減数分裂中期にある未受精卵から染色体を除去する除核卵子の作製に続いて、体細胞核を顕微注入する必要がある、マイクロマニピレーターを用いた複数のステップがあることから技術的に習熟するまでに少なくとも 3 ヶ月以上のトレーニング期間が必要といわれている (Kishigami *et al.*, 2006)。

SCNT 技術を用いたクローンマウスの作出については、従来法の Honolulu 法 (Wakayama *et al.*, 1998) に始まり、電気融合法 (Ogura *et al.*, 2000) やセンダイウイルス (Hemagglutinating virus of Japan: HVJ) を用いた細胞融合法 (Ono *et al.*, 2001) へ発展して現在に至る。しかしながら、卵細胞膜に直接的にピエゾドライブユニットを用いて穿孔することは、卵子へのダメージが非常に大きく生存卵子を得ることが難しい。また、電気融合法は、細胞膜同士の硬度が異なることによる最適な条件の設定が必要となる。また、細胞融合法に用いる HVJ は、特定の機器を必要とするため、ハンドリングが困難である。不活化されたセンダイウイルス (HVJ-Envelope: HVJ-E) は、HVJ のゲノム RNA を不活化および精製した、非増殖性かつ非感染性の特徴をもつ小胞であり、バイオセーフティレベル 1 の実験室で使用可能なため、特殊な設備や操作を要することなく HVJ に比べて取り扱いが容易である。HVJ-E を使用した SCNT では、卵細胞膜表面に HVJ-E 溶液とドナー細胞

を置くだけで細胞融合操作が完了するため、技術的な困難さをサポートできると考えられた。

また、SCNT 胚を培養する培地下への薬剤添加が発生能を改善する報告がある。例えば、HDACi の 1 種である TSA を活性化培地へ添加することは、胚発生率のみならず、産子作出効率を改善することが示されている(Kishigami *et al.*, 2006; Rybouchkin *et al.*, 2006)。この TSA の作用機序については、現在も研究が進められており、SCNT 胚内のヒストン修飾への効果によって、結果的に DNA の低メチル化を誘導し、リプログラミングを促進することが考えられている(Bui *et al.*, 2010)。最近になって、SCNT 胚の発生停止要因として、ドナー細胞によって持ち込まれる初期化抵抗性遺伝子領域に集積する H3K9me3 が示されている(Matoba *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016)。一方で、H3K9me3 を低下させる効果が VC に見出され、強い抗酸化作用だけでなく DNA 脱メチル化酵素やヒストン脱メチル化酵素を活性化できることが示されている(Chen *et al.*, 2013)。以前に、Miyamoto らは、d-BSA 存在下において TSA および VC を SCNT 胚の培養培地へ加えることは、その後の発生を改善することを示している(Miyamoto *et al.*, 2017)。しかしながら、これらの新しく開発された手法が世界的に普及されるには詳細なプロトコールの確立が必要である。

そこで、本章では、実験動物又動物科学の研究発展に資することを目的として、このマウス SCNT 法のプロトコールを精査し、詳細なプロトコールの確立を行い、WEB 上での公開を行った(Azuma *et al.*, 2018)。なお、本法は、非常に効率的かつシンプルで新しい SCNT 法であり、細胞融合に用いる HVJ-E の取り扱いについても説明した。この詳細なプロトコールの公開は、発生生物学・生殖生物学分野の研究者にとって、遺伝子改変マウスの作出や遺伝資源の保存に貢献すると期待される。

第2節 HVJ-Envelope, Trichostatin A および Vitamin C の 組み合わせによる体細胞核移植技術の簡易化および 産子作出効率の改善

前節にて述べたように、SCNT 技術は習熟が難しく、さらに、作製した再構築胚は発生率および産子作出効率が低い。本実験では、2017 年に開発された SCNT 技術の精査および詳細なプロトコールの確立と公開を目的として、HVJ-E を用いることによる細胞融合法に続く、d-BSA 存在下における TSA および VC の組み合わせ処理による発生能および産子作出へ与える効果を検討した。

材料および方法

1. 培養液の調製

本実験では、胚の回収および胚操作のために、Table 1 に示す KSOM 培地を使用した。その作製方法は、滅菌水エンドトキシンフリー(196-15645, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)(以下、滅菌水) 100mL に対し、NaCl(28-2270-5, Sigma-Aldrich, Co., Lcc., MO, USA) 0.5552g、KCl(169-03542, Wako) 0.01864g、KH₂PO₄(165-04242, Wako) 0.00476g、MgSO₄·7H₂O(137-00402, Wako) 0.00493g、CaCl₂·2H₂O(039-00431, Wako) 0.02514g、D(+)-Glucose(041-00595, Wako) 0.0036g、Sodium Pyruvate(199-03062, Wako) 0.0022g、L-Glutamine(G3126, Sigma-Aldrich) 0.01460g、Polyvinylpyrrolidone(MW. 360,000, 168-17042, Wako)(以下、PVP) 0.0100g、NaHCO₃(31213-15, Nacalai tesque, Inc., Kyoto, Japan) 0.2100g、Sodium DL-Lactate(60% in Water)(31605-72, Nacalai tesque) 147μL、Penicillin(4987222637671(GTIN-13), Meiji Seika Pharma Co., Ltd. Tokyo, Japan) 0.0050g、Streptomycin(4987222665643(GTIN-13), Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan) 0.0050g を添加した。作製した培養液は、

ボトルトップフィルター(Pore size: 0.22 μ m, 430624, Corning, Inc., NY, USA)を用いて濾過滅菌を行った。さらに使用前に 3.88mL の培養液に対して 2mM Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate(345-01865, Dojindo Lab., Kumamoto, Japan)(以下、2mM EDTA \cdot 2Na)(Table 2-a) 20 μ L と 12% d-BSA 100 μ L を添加し KSOM 培地とした。胚培養ドロップの作製は、プラスチックシャーレ(35 \times 10mm, 353001, Corning)内に 20 μ L ずつのドロップを 4 個作製した後、ミネラルオイル(M8410, Sigma-Aldrich)を被せた。なお、2mM EDTA 2Na は、EDTA 2Na 0.0058g を滅菌水 10mL に溶解し、マイクレスフィルター(Pore size: 0.22 μ m, SLGP033RS, Millipore)で濾過滅菌した後、分注して 4 $^{\circ}$ C で保存した。また、12% d-BSA (Table 2-b)は、BSA(A3311, Sigma-Aldrich) 1.2g を滅菌水 10mL に重層して 4 $^{\circ}$ C で溶解した後、BT AG 501-X8(D) Resin(143-7425, Bio-Rad Lab., Inc., CA, USA) 0.12g 加え、緩やかに攪拌しながらイオン交換を行った。その後、BT AG 501-X8(D) Resin が青色から黄色に変化したことを確認後、BSA 溶液のみを移し替え、再度 BT AG 501-X8(D) Resin を 0.12g 加え、Resin の色変化がなくなるまで繰り返した(Figure 1)。イオン交換後、BSA 溶液に 10.5% NaHCO₃(Table 2-c) 250 μ L を加え、生理的 pH(pH7.4)に調整した後、マイクレスフィルター(Pore size: 0.45 μ m, SLHV033RS, Millipore)を用いて濾過滅菌した。作製した 12% d-BSA は、分注して-20 $^{\circ}$ C で保存した。なお、使用した 10.5% NaHCO₃ は、NaHCO₃ 0.1050g を滅菌水 1mL へ溶解し用事調製した。

核移植操作には、Table 3 に示した Hepes CZB 培地を使用した。滅菌水 100mL に対し、NaCl 0.4760g、KCl 0.0360g、CaCl₂ \cdot 2H₂O 0.0250g、MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.0290g、KH₂PO₄ 0.0160g、EDTA \cdot 2Na 0.0040g、Sodium DL-Lactate(60% in Water) 530 μ L、D(+)-glucose 0.1000g、Penicillin 0.0025g、Streptomycin 0.0035g、Phenol-red(P0290, Sigma-Aldrich) 25 μ L、Polyvinyl alcohol(P8136, Sigma-Aldrich) 0.0010g、NaHCO₃ 0.0420g、Hepes sodium salt(H3784, Sigma-Aldrich) 0.5200g を添加後、ボトルトップフィルターを用いて濾過滅菌した。

細胞融合操作後の活性化処理には、KSOM培地 2mLに対して、SrCl₂(193-04182, Wako) 0.0027g(最終濃度: 5mM)、1mg/mL Cytochalasin B(CB, 034-17554, Wako)(Table 2-d) 10 μ L、0.5M O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid(E8145, Sigma-Aldrich)(以下、EGTA)(Table 2-e) 8 μ L を添加し、マイクレスフィルターにて濾過滅菌後に使用した(Table 4)。なお、1mg/mL CBは、DMSO(045-24511, Wako) 3mL に対して CB 0.0030g を溶解後、マイクレスフィルターで濾過滅菌し、分注して-20 $^{\circ}$ Cで保存した。また、0.5 M EGTA の作製は、滅菌水 1mL に対して EGTA 0.23414g を溶解後、マイクレスフィルターで濾過滅菌し、分注して 4 $^{\circ}$ Cで保存した。

マウス胎子由来線維芽細胞の樹立および培養には、Dulbecco's Modified Eagle Medium(1965092, Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)(以下、DMEM) に非働化 Fetal Bovine Serum (SH30910.03, GE Healthcare Life Sciences, HP, England)(以下、FBS)を 10%添加した培養液を用いた(Table 5)。作製方法は、DMEM 200mL に対して、MEM Non-Essential Amino Acids Solution(1140050, Thermo Fisher Scientific)(以下、NEAA) 2mL、Sodium Pyruvate(11360070, Thermo Fisher Scientific) 2mL、Penicillin-Streptomycin(15140122, Thermo Fisher Scientific)(以下、Pen/Strept) 2mL を添加し、1 \times PBS(-)(Table 2-g) 1mL に対して、2-Mercaptoethanol(M6250-10ML, Sigma-Aldrich)(以下、2ME)を 7 μ L 加えて混和した溶液(1000 \times 2ME) 200 μ L を加えた後、予め非働化処理した FBS を 25mL 加えて転倒混和した後、ボトルトップフィルターを用いて濾過滅菌した。なお、使用した 1 \times PBS(-)は、予め作製した 10 \times PBS(-)(Table 2-j)を希釈してオートクレーブ滅菌後に使用した。また、10 \times PBS(-)の作製は、MilliQ 水 500mL に対して、NaCl 40g、KCl 1g、KH₂PO₄ 1g、Na₂HPO₄ \cdot 12H₂O(31723-35, Nacalai tesque) 14.5g を添加してオートクレーブ滅菌した後に使用した。

2. 供試動物

レシピエント卵子には、成熟齢に達した B6D2F1(C57BL/6N \times DBA/2Cr)雌マウスを使用した。ドナー細胞には、同系統の卵丘細胞および Jcl:MCH(ICR)の胎子由来線維芽細胞を使用した。SCNT 胚の受胎雌マウスには、精管結紮した Jcl:MCH(ICR)の雄と交配した Jcl:MCH(ICR)を用いた。本実験に使用した各マウスは、日本 SLC 株式会社(SLC Co. Ltd., Shizuoka, Japan)および日本クレア(CLEA JAPAN Inc, Tokyo, Japan)から購入し、入荷後、概日調整を 1 週間以上行い順化した後に実験に供試した。飼育条件は、ライトコントロール(明期; 7:00-19:00、暗期; 19:00-7:00)、室温 23 \pm 5 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 5%の環境下で、飼料(CRF1R: オリエンタル酵母工業(株))と飲水を自由摂取させた。なお、本実験に際して、動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規程に準じて実施した。

3. 過剰排卵処理および未受精卵子の回収

B6D2F1 雌マウスに血清性性腺刺激ホルモン(Pregnant Mare Serum Gonadotropin: PMSG: 動物用セロトロピン; 879412, ASKA Pharmaceutical. Co., Ltd, Tokyo, Japan) 7.5 単位(Table 2-h)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(human Chorionic Gonadotropin: hCG: ゴナトロピン; 8772413, ASKA) 7.5 単位 (Table 2-i)を 48 時間間隔で腹腔内投与して過剰排卵を誘起した。hCG 投与 14~15 時間後、マウスを安楽死処分して卵管を摘出した。続いて、0.1% Hyaluronidase(H3506, Sigma-Aldrich) in HEPES CZB 培地(Table 2-j)のミネラルオイル中で卵管膨大部から卵子卵丘細胞複合体を回収し、0.1% Hyaluronidase in HEPES CZB 培地中へ移し、37 $^{\circ}$ C 加温盤上で 5 分間静置することで卵丘細胞を除去した。その後、予め 3 時間以上の通気済の 20 μ L の KSOM 培地で 4 回洗浄した後、形態的に正常な卵子を回収し、除核操作に供試するまで 37 $^{\circ}$ C(6% CO₂ in air)で静置した。

4. 卵丘細胞の調整

第2章第2節第3項にて、得られる遊離した卵丘細胞をガラスピペットで吸引し、6% d-BSA in Hepes CZB 培地に回収し、核移植操作に供試するまで 37°C 加温盤上で静置した。

5. 胎子由来線維芽細胞の樹立および培養

(1) 胎子由来線維芽細胞の樹立

Jcl:MCH(ICR)雄マウスと Jcl:MCH(ICR)雌マウスを交配させ、翌日(Day1)、膈栓が確認できた雌マウスを Day12.5 で安楽死処分後、腹部から胎子を摘出した。胎子を細切後、0.25% Trypsin-EDTA(25200056, Thermo Fisher Scientific) 10 mL で 10 分間組織を溶解した。10 分後、DMEM を 20mL 加え反応を停止後、100 μ m Cell Strainer(352360, Corning Inc, NY, USA)および 40 μ m Cell Strainer (352340, Corning)にて組織片を除去した。1,000rpm・5 分間遠心後、細胞のペレットを 10% FBS/DMEM にて懸濁して、細胞培養ディッシュ(83.3902.300, Sarstedt K.K., Tokyo, Japan)へ播種した後、37°C(5%CO₂ in air)で培養した。細胞遊走を確認し、胎子由来線維芽細胞が 80%コンフルエントに増殖した後、継代培養を行った。

(2) 胎子由来線維芽細胞の継代培養操作

1×PBS(-)にて細胞を 2 回洗浄した後、0.25% Trypsin-EDTA 1mL を加え、37°C (5%CO₂ in air)で 3 分間処理をした。3 分後、DMEM を 2mL 加えて反応を停止した後 1,000rpm で 5 分間遠心した。上清除去後、細胞のペレットを 10% FBS/DMEM にて懸濁し、細胞培養ディッシュへ播種し、37°C(5%CO₂ in air)で培養した。

(3) 胎子由来線維芽細胞の凍結および融解操作

胎子由来線維芽細胞の凍結操作は、継代培養操作と同様に細胞ペレットを作製し、CELLBANKER(CB011, Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) 500 μ L/本で加え、BICELL(BICELL, Nihon Freezer Co., Ltd., Tokyo, Japan)の庫内へ入れ、-80°C で凍結保存した。細胞の融解操作は、-80°Cフリーザーから凍結したチューブを取

り出し、37°Cウォーターバスにて融解後、細胞懸濁液を DMEM 2.5mL へ加えて混和させた後、1,000rpm にて 5 分間遠心した。遠心後は、継代培養操作と同様に細胞を播種して培養した。

(4) 胎子由来線維芽細胞の調整

継代培養操作により得られた細胞ペレットを 6% d-BSA in HEPES CZB 培地 20 μ L にて懸濁し、核移植操作に供試するまで氷上にて静置した。

6. マイクロマニピレーター用マイクロピペットの作製

マイクロピペットの作製は、滅菌処理した BOROSILICATE GRASS(B100-75-10, SUTTER INSTRUMENT Co. Ltd., CA, USA: O.D.)をマイクロピペット作製用プラー(P97/IVF, Shoshin EM Corp, Aichi, Japan)を用いて Table 6 に示した設定値に従って引き延ばした。除核用、細胞融合用ピペットは、引き延ばした BOROSILICATE GRASS をマイクロホージ(LEICA MS5; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)に取り付け、除核用ピペットは内径約 10 μ m、細胞融合用ピペットはドナー細胞の直径より少し細くなるように内径約 7 μ m~10 μ m で水平に切断し、先端から約 300 μ m を約 30 度曲げて作製した。卵子固定用ピペットは、引き延ばした BOEOSILICATE GRASS をアンプルカッターで内径約 100 μ m を水平に切断し、マイクロホージに取り付け、先端が 1.5:1:1.5 の割合になるように加工し、先端から 600 μ m 付近を約 30 度曲げて作製した。

7. 除核操作

卵子の除核は、Wakayama らの方法に準じて行った(Wakayama *et al.*, 1998)。顕微操作には、微分干渉倒立顕微鏡(LEICA DM IRB; Leica)下でピエゾマイクロマニピレーター(PMM-150FU, PRIME TECH, Co., Ltd., Ibaragi, Japan)を用いた。除核操作に用いたインジェクションチャンバーは Figure 2 に示した。未受精卵子は、10 μ g/mL CB in HEPES CZB 培地中で 10 分間静置させた後に、インジェ

クシオンチャンバー上の微小滴の 10 μ g/mL CB in Hepes CZB 培地へ導入し、第 2 減数分裂中期染色体-紡錘体を除去した。使用した圧電パルスの Intensity は 3~5、Speed は 2~4 で行った。作製した除核卵子は、KSOM 培地へ導入して 4 回洗浄した後に 37°C (6% CO₂ in air) で細胞融合操作まで静置した。

8. HVJ-E の調製

細胞融合操作に使用した HVJ-E には、HVJ Envelope Cell Fusion Kit GenomONE-CF(CF001, Ishihara sangyo kaisha, Ltd., Osaka, Japan)を使用した。Freeze-dried HVJ-E に、氷冷した HVJ-E Suspending Buffer 0.26mL を添加し、穏やかにピペッティングして懸濁後、5 μ L ずつ分注して-80°C で使用するまで保管した。使用する直前に、HVJ-E 懸濁液 5 μ L に対して、滅菌水を用いて 20 倍希釈した氷冷した 1 \times Cell Fusion Buffer 20 μ L 加え、5 倍希釈液を作製した。

9. 細胞融合操作

ドナー細胞の融合は、Miyamoto らの方法に準じて行った(Miyamoto *et al.*, 2017)。細胞融合操作に使用したインジェクションチャンバーは、Figure 2 へ示した。ドナー細胞は、予め 6% d-BSA in Hepes CZB 培地へ導入した。卵丘細胞を用いた場合は、実体顕微鏡下にて 6% d-BSA in Hepes CZB 培地中に遊離している細胞をガラスピペットで吸引し、インジェクションチャンバー上の 6% d-BSA in Hepes CZB 培地の微小滴ドロップへ導入した。マウス胎子由来線維芽細胞を用いた場合は、6% d-BSA in Hepes CZB 培地で懸濁した液からガラスピペットで吸引し、実体顕微鏡下にてインジェクションチャンバー上の 6% d-BSA in Hepes CZB 培地へ導入した。細胞融合操作は、まず、インジェクションチャンバー上の 6% d-BSA in Hepes CZB 培地の微小滴ドロップ内にある 10 個~30 個の細胞をマイクロピペットにより吸引し、HVJ-E の微小滴ドロップ中へ一度排出した。次いで、排出したドナー細胞と HVJ-E をマイクロピペット内へ間隔を空けて再吸引し、

Hepes CZB 培地の微小滴ドロップ内にて、ピエゾ圧電素子による透明帯を穿孔後、除核卵子内へ挿入した。ドナー細胞を HVJ-E の微小滴ドロップ中へ導入してから細胞融合操作は 10 分間で処理した。なお、この 10 分間で処理を完了することは融合率と関係するため、時間を厳守した。細胞融合操作後、卵子は KSOM 培地へ洗浄することなく導入し、37°C・6% CO₂ in air で 1 時間静置した後、早期染色体凝集(Premature chromosome condensation: PCC)の形成を観察した。

10. 活性化処理と発生能の観察

PCC 形成が確認された再構築卵子は、Kishigami らの方法に準じて 6 時間培養することで活性化処理した(Kishigami *et al.*, 2008)。活性化処理培地組成(Table 4)は、第 2 章第 2 節第 1 項に記した。SCNT 胚は、活性化処理開始から 6 時間後に偽前核の形成を観察した後、24、48、72、96 時間で発生能を評価した。

11. SCNT 胚の TSA および VC による処理

卵子活性化処理開始から 6 時間、50nM TSA(T1952, Sigma-Aldrich)含有 KSOM 培地添加した活性化処理培地で培養した。次いで、2 時間、50nM TSA 含有 KSOM 培地にて培養した。その後、7 時間、10µg/mL VC(A5960, Sigma-Aldrich)含有 KSOM 培地にて培養し、KSOM 培地へ卵子を移して培養した(Figure 2)。

12. 卵丘細胞由来核移植 2 細胞期胚の胚移植

2 細胞期へ発生した SCNT 胚は、予め精管結紮をした Jcl:MCH(ICR)雄マウスとの交配により作製した Jcl:MCH(ICR)偽妊娠雌マウスの卵管へ移植した(交配後 0.5 日)。交配後、19.5 日に帝王切開により、産子および着床痕の有無を観察した。

13. 統計学的解析

本実験操作における卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞による SCNT 成績は、

Stat View-J 5.0 により、各実験区の分散分析値を求めた後、Fisher PLSD 法による有意差検定を行った。なお、統計学的な有意差の表値は、5%水準以下とした。

Table 1. Composition of KSOM medium

Components	100 mL
NaCl	0.5552g
KCl	0.01864g
KH ₂ PO ₄	0.00476g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.00493g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02514g
D(+)-Glucose	0.0036g
Sodium Pyruvate	0.0022g
L-Glutamine	0.01460g
PVP	0.0100g
NaHCO ₃	0.2100g
Sodium DL-Lactate (60% in Water)	147μL
Penicillin	0.0050g
Streptomycin	0.0050g
滅菌水	up to 100mL

使用前に、

上記の EDTA, d-BSA 不含 KSOM 培地 3.88 mL に対し、
以下の添加物を加えた。

2mM EDTA 2Na	20 μL
12% d-BSA	100 μL

Table 2. Composition of used reagent

(a) 2mM EDTA 2Na		(g) 1×PBS (-)	
Components	10 mL	Components	500 mL
EDTA 2Na	0.0058 g	10×PBS(-)	50mL
滅菌水	10 mL	MilliQ	up to 500 mL
(b) 12% d-BSA		(h) PMSG	
Components	10 mL	Components	20 mL
BSA	1.2 g	PMSG	1000 IU
滅菌水	10 mL	Saline solution	20 mL
BT AG 501-X8 (D) Resin	2.4 g		
10.5% NaHCO ₃	250 μL		
(c) 10.5% NaHCO₃		(i) hCG	
Components	1 mL	Components	20 mL
NaHCO ₃	0.1050 g	hCG	1000 IU
滅菌水	1 mL	Saline solution	20 mL
(d) 1mg/mL CB		(j) 0.1% Hyaluronidase in Hepes CZB Medium	
Components	3 mL	Components	10 mL
CB	0.0030 g	Hyaluronidase	0.0100 g
DMSO	3 mL	Hepes CZB Medium	10 mL
(e) 0.5M EGTA		(k) 12.5mM TSA stock	
Components	1 mL	Components	1 mL
EGTA	0.23414g	5 mM TSA	2.5 μL
滅菌水	1 mL	DMSO	1 mL
(f) 10×PBS (-)		(l) 1mg/mL VC	
Components	500 mL	Components	1.5 mL
NaCl	40 g	VC	0.0015 g
KCl	1 g	滅菌水	1.5 mL
KH ₂ PO ₄	1 g		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	14.5 g		
MilliQ	up to 500 mL		

Table 3. Composition of Hepes CZB medium

Components	100mL
NaCl	0.4760g
KCl	0.0360g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.0250g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.0290g
KH ₂ PO ₄	0.0160g
EDTA 2Na	0.0040g
Sodium DL-Lactate(60% in Water)	530μL
D(+)-Glucose	0.1000g
Penicillin	0.0025g
Streptomycin	0.0035g
Phenol-red	25μL
Polyvinyl alcohol	0.0010g
NaHCO ₃	0.0420g
Hepes sodium salt	0.5200g
滅菌水	up to 100mL

Table 4. Composition of activation medium

Components	2mL
KSOM medium	2mL
1 mg/mL CB	10 μ L
0.5 M EGTA	8 μ L

Table 5. Composition of cell culture medium, 10% FBS/DMEM

Components	231.2mL
DMEM	200mL
NEAA	2mL
Na-Pyruvate	2mL
Pen/Strept	2mL
1000 \times 2ME	200 μ L
\triangle FBS	25mL

Table 6. Setting of puller instrument

	Heat	Pull	Velocity	Time
Enucleating and fusing pipet	735	100	150	90
Holding pipet	855	120	90	250

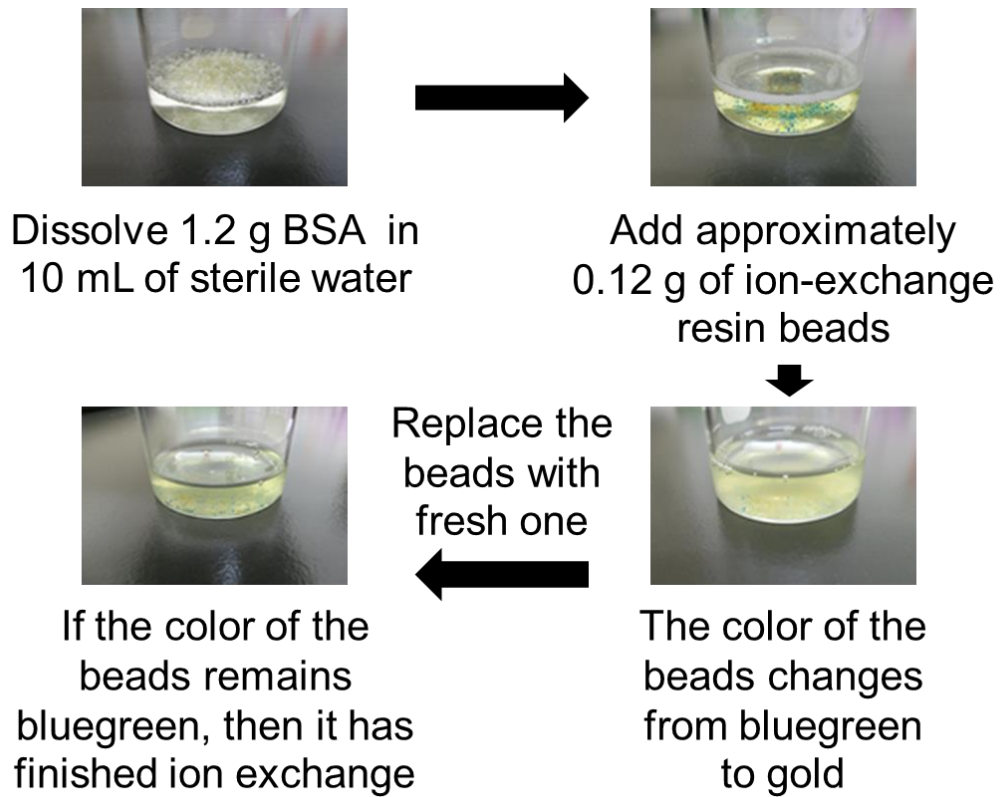


Figure 1. Preparation of d-BSA.

Step-by-step procedures for preparing d-BSA solution are depicted. The extent of ion exchange can be judged by the change of beads color.

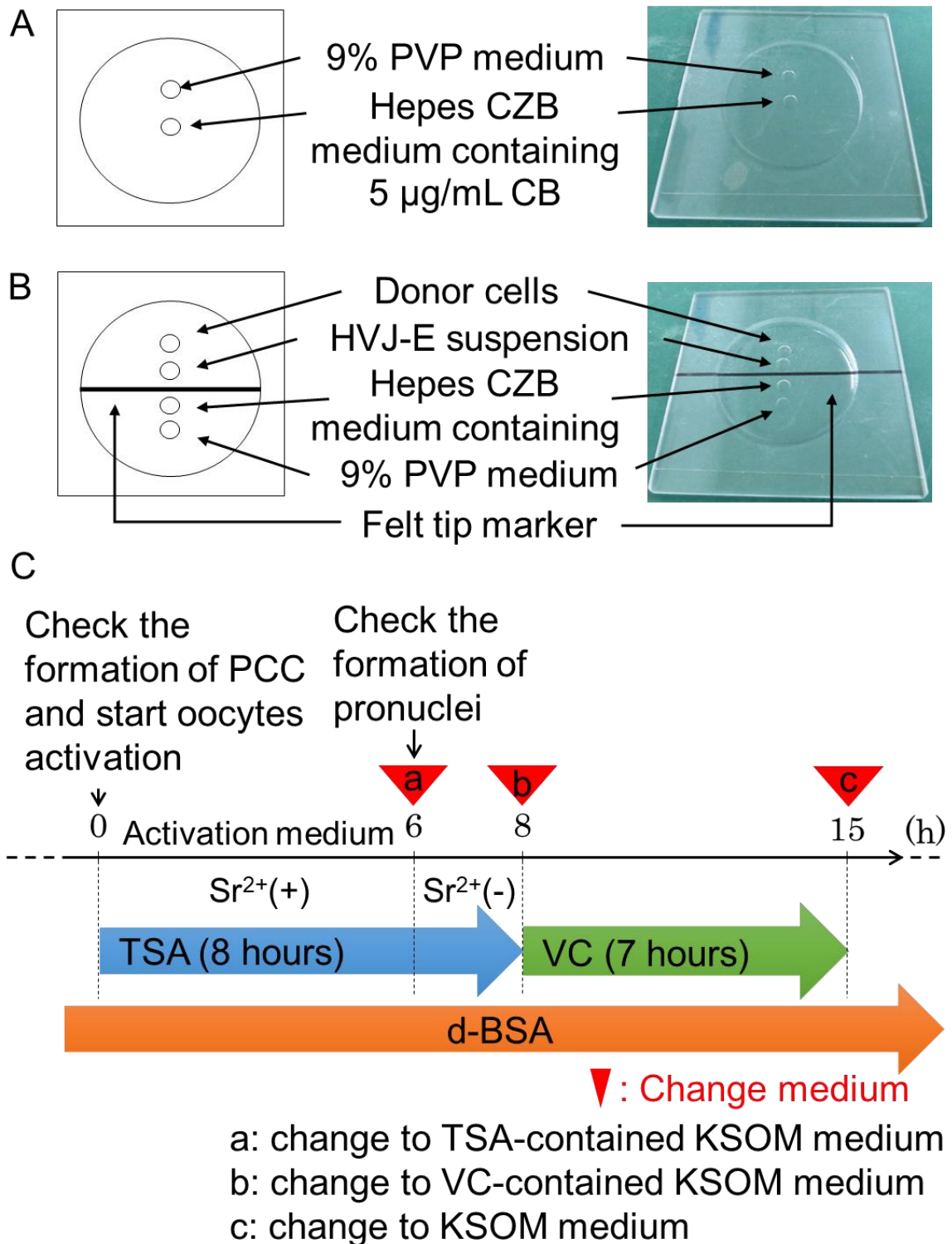


Figure 2. Somatic cell nuclear transfer procedures.

(A) An illustration of the enucleation chamber. Enucleation of oocytes are performed in the Hepes CZB medium with CB. For the

piezo driving system, a spot of 9% PVP medium is used to prepare the glass pipette for enucleation. Spots are covered by mineral oil.

(B) An illustration of the cell fusion chamber. Cell fusion is performed in the Hepes CZB medium containing 6% d-BSA. A spot of 9% PVP medium is used to prepare the glass pipette for cell fusion. Spots are covered by mineral oil. (C) Scheme of the TSA, VC and d-BSA treatment for SCNT embryos. Blue arrow represents treatment with TSA, followed by incubation with VC (green arrow) under KSOM medium containing with 0.3% d-BSA (orange arrow). Arrow heads indicate the timing for changing medium.

結果

卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞をドナー細胞として、SCNT 胚を作製し、胚盤胞期への発生能を検討した。再構築卵子の作製成績および活性化処理後の 2 細胞期への発生成績を Table 7 に示した。卵丘細胞を用いた場合では、168 個の除核卵子へ融合操作を行い、164 個の卵子で融合を確認した(98%)。融合した卵子は 1 時間培養した後、その全ての卵子が PCC を形成していた。PCC を確認した再構築卵子は、活性化処理後、TSA および VC 処理区では 99%(81/82)が偽前核を形成し、89%(72/81)の偽前核卵子が 2 細胞期へ発生した。未処理区では、融合した全ての卵子が偽前核を形成し、83%(68/82)が 2 細胞期へ発生した。胎子由来線維芽細胞を用いた場合は、403 個の除核卵子へ融合操作を行い、342 個(85%)の卵子が融合した。このうち融合操作 1 時間後、316 個の卵子が PCC を形成した。活性化処理後、TSA および VC 処理区では、89%(151/169)が偽前核を形成し、82%(124/151)が 2 細胞期へ発生した。未処理区では、97%(142/147)が偽前核を形成し、77%(109/142)が 2 細胞期へ発生した。これらの結果は、卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞のどちらの細胞をドナー細胞として体細胞核移植操作へ供試しても、非常に高い 2 細胞期への発生率を有することを示している。

各ドナー細胞を用いて作製した 2 細胞期胚の発生成績を Table 8 に示した。胚盤胞期への発生率は、卵丘細胞を用いた場合、TSA および VC 処理区では、89%(135/152)であり、未処理区(39%(32/83))と比較して有意に高い値を示した。胎児由来線維芽細胞を用いた場合においても、TSA および VC 処理区では、71%(88/124)であり、未処理区(27%(29/109))と比較して有意に高かった。これらの結果は、TSA および VC 処理が卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞を用いて作製した 2 細胞期胚の胚盤胞期への発生率を改善することを示し、本手法がマウス系統およびドナー細胞種によって制限されないことを示している。

さらに、卵丘細胞を用いて作製した再構築 2 細胞期胚の一部は、偽妊娠雌マウス

の卵管へ移植した。TSA および VC 処理によって得られた 72 個の 2 細胞期胚は、3 匹の移植された結果、6 匹の生存産子を得た(8.3%)(Figure 3)。Miyamoto らの報告では、この体細胞核移植法では、移植した 2 細胞期胚のうち約 15%が産子へ発生することが示されている(Miyamoto *et al.*, 2017)。さらに、他の施設での胚移植成績では、9~15%の生存産子の作出率が得られている。これは、Kishigami らが報告した活性化培地への TSA 処理区の再構築 2 細胞期胚における移植成績(Kishigami *et al.*, 2006)よりも優れており、これらの結果は、体細胞核移植法が再構築胚の発生能力を促進することを示している。

Table 7. Effects of the TSA and VC treatment on the in vitro development of cloned mouse embryos to the 2-cell stage

Group	Donor cell type	Mouse strain	No. of oocytes used	No. of oocytes fused	No. of oocytes showing premature chromosome condensation	No. of oocytes showing pronuclei formation (%)	No. of pronuclei-formed oocytes that developed to 2-cell embryos (%)
TSA, VC untreated	cumulus	C57BL/6× DBA/2	84	82	82	81 (99)	72 (89)
TSA, VC untreated	cumulus	C57BL/6× DBA/2	84	82	82	82 (100)	68 (83)
TSA, VC untreated	fetal fibroblast	MCH(ICR)×MCH(ICR)	202	171	169	151 (89)	124 (82)
TSA, VC untreated	fetal fibroblast	MCH(ICR)×MCH(ICR)	201	171	147	142 (97)	109 (77)

Table 8. Effects of the TSA and VC treatment on the in vitro development of cloned mouse embryos to the blastocyst stage.

Group	Donor cell type	Mouse strain	No. of 2-cell embryos used	No. of 2-cell embryos developed to (%)		
				4-cell	morula	blastocyst
TSA, VC untreated	cumulus	C57BL/6× DBA/2	152	152 (100)	149 (98)	135 (89) ^a
TSA, VC untreated	cumulus	C57BL/6× DBA/2	83	47 (57)	41 (49)	32 (39) ^b
TSA, VC untreated	fetal fibroblast	MCH(ICR)×MCH(ICR)	124	110 (89)	101 (81)	88 (71) ^c
TSA, VC untreated	fetal fibroblast	MCH(ICR)×MCH(ICR)	109	54 (50)	45 (41)	29 (27) ^d



Figure 3. Cloned offspring derived from cumulus cells just after caesarean section after 19.5 days of pregnancy.

考察

SCNT 技術による個体生産効率については、いくつかの改善方法が示されてきた(Kishigami *et al.*, 2006; Terashita *et al.*, 2012; Isaji *et al.*, 2015)。従来法の SCNT 技術は、胚へのダメージや詳細な条件の設定等、技術的な難しさは否めなかった。手順をより簡易化し、さらに詳細な情報を動画と共に提示することによって、SCNT 技術をより正確に伝播することが可能となり、様々な研究への安定的なクローン胚の供給を保証できる。さらに、今回の SCNT 法は、遺伝子改変や mRNA 注入をも必要とすることなく、培地への薬剤の添加のみで胚発生能を向上させている。従って、特に、多数の生存 SCNT 胚を提供する有力な方法となり得る。

今回の SCNT 法における重要なステップは、ドナー細胞と除核卵子の融合時に使用する HVJ-E の取り扱いである。HVJ-E は、適切な量を細胞融合で維持し、そして操作を 10 分以内に完了する必要がある。HVJ-E には、赤血球凝集能(HA 活性)とノイラミニダーゼ活性(NA 活性)を担う HANA タンパクと膜融合反応に重要な役割を担うとされる F タンパクを持ち、これらタンパクが細胞膜の脂質層に埋まり、一定の膜構造を形成することで膜融合が成立する(目加田、1980)。従って HVJ-E を用いた本 SCNT 法は、技術的な難しさを軽減する。

今回検討した HVJ-E を用いた細胞融合法は、尾部由来細胞(Wakayama and Yanagimachi, 1999)、セルトリ細胞(Ogura *et al.*, 2000)および胚性幹細胞(Wakayama *et al.*, 1999)などの体細胞をドナー細胞とする実験に適用可能と考える。特に、尾部由来細胞などの直径 10 μ m を超えるような比較的大きな細胞やセルトリ細胞のような比較的細胞膜が硬い細胞を卵子の細胞質に移植したい場合には、注入時に卵子が破壊されることが少なくなり、HVJ-E を利用した細胞融合法は簡単で効果的である。

この SCNT 技術は、絶滅危惧動物の保全研究が進められている。SCNT で供試されるドナー細胞として、非侵襲的な手法で採取された細胞が理想的であり、一例

として尿細胞を用いたクローンマウスの作出が示されている(Mizutani *et al.*, 2016)。また、臨床研究のために T 細胞依存性のアレルギー性免疫応答を簡便かつ迅速に解析できる病態モデルを作製することを目的として、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞からのクローンマウスの作出も報告されている(Kamimura *et al.*, 2017)。今回示した SCNT 法が、このような先行研究を含めた希少動物の保全や臨床研究へ応用展開が可能かどうかを調べることは興味深い。

本実験では、簡易な手順で実用的なレベルの高効率でクローンマウスの作出が可能であることを示した。したがって、本法は、希少動物の遺伝資源保全や医学研究に、核のリプログラミングや初期胚発生の分子メカニズムを理解するために実行可能な有効なツールとなる。

第3節 小括

本章では、SCNT 操作を技術的に簡易化するために HVJ-E を用いた細胞融合法を適用し、卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞を用いて作製した再構築胚の胚培養培地下への TSA および VC の組み合わせ処理が胚発生へ与える効果を検討した。

- (1) HVJ-E を用いた細胞融合法は、多数の生存胚を得ることができた。
- (2) 卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞を用いて作製した再構築胚は、活性化処理後、TSA および VC を添加区では高い胚発生能を有した。
- (3) 卵丘細胞を用いて作製した再構築 2 細胞期胚からクローンマウスが得られた。

以上のことから、マウス SCNT への HVJ-E の使用による多数の胚を作製できるようになったことと TSA および VC の組み合わせ処理によって胚盤胞期への発生率の改善およびクローンマウスの作出が可能であることを示した。この成果は、ビデオによる詳細なプロトコールとして発信され、核のリプログラミング等の基礎研究や野生動物の保全への応用研究や医学領域に必要な病態モデルマウスの生産において、実用化レベルで利用できる SCNT 技術の重要な基盤となると考える。

第3章 アカネズミーマウス異種間核移植胚の発生能の検討

第1節 緒言

野生のネズミは、基礎生物学だけでなく医学分野への新たな研究資源としての利用価値が高い(Matsushima, 2012)。日本には、4科13属23種の齧歯類が生息している(Nakata *et al.*, 2015)。アカネズミ(Large Japanese field mice(*Apodemus speciosus*))は、沖縄と南西諸島の一部を除く日本全国の平野部から亜高山帯にかけて普遍的に分布し、生息環境が各地の森林から河川敷まで多岐にわたっている(本川, 2016)。日本列島の多様な気候環境に自然に適応放散した本種は、高い環境応答性が期待されることから、その遺伝や形態、繁殖形質の地域変異等が研究されている(酒井ら, 2013; Shintaku *et al.*, 2010; Serizawa *et al.*, 2000)。さらに近年は、東京電力福島第一原子力発電所の事故により、環境中に放出された放射線が野生動物へ与える影響を解析するための環境指標種として活用されている(Kawagoshi *et al.*, 2017; Okano *et al.*, 2016)。これらの理由から、アカネズミは新規のリソースになる適性を持っている。しかしながら、アカネズミを研究資源として利用するためには、実験動物化・モデル動物化が必要であるが、本種は季節繁殖性を有し、飼育下における自然繁殖が難しい(Okano *et al.*, 2015; 立石, 2007)。また最近、本種は得られる卵子の個数が少ないことから、抗インヒビン抗体を用いた過剰排卵処置による体外受精が検討されている(Meguro *et al.*, 2019)。ゆえに、より発展したSCNT等の生殖工学技術は、遺伝的に均一なバックグラウンドを持つアカネズミの作出に有用である。

異種間核移植(interspecies SCNT : iSCNT)技術は、ある種の細胞と別の卵子を用いて直接的に胚やクローン動物を作出できる(Beyhan *et al.*, 2007)。特に、野生動物等の利用可能な卵子の供給が限られる場合、実験動物や家畜動物の卵子を代用できるため、非常に価値がある。実際に、iSCNT技術は、希少動物種の繁殖(Yelisetti

et al., 2016; Wani *et al.*, 2017)や絶滅種の再生(Folch *et al.*, 2009; Yamagata *et al.*, 2019)に用いられている。しかしながら、iSCNT 胚は、卵子活性化後の発生によく失敗する。これまでに報告される異種間クローン産子の作出は、絶滅危惧動物のガウル(Lanza *et al.*, 2000)、リビアヤマネコ(Gómez *et al.*, 2004)、ハイイロオオカミ(Oh *et al.*, 2008)、スナネコ(Gómez *et al.*, 2008)、フタコブラクダ(Wani *et al.*, 2017)、絶滅動物のブカルド(Folch *et al.*, 2009)の 6 種であり、同種間 SCNT のクローン産子の作出報告と比べて少ない。生存可能な個体に繋がる iSCNT 胚の発生能を改善する技術開発が、特に卵子の獲得が難しい哺乳類にとって重要である。

近年、SCNT 胚の発生を阻害する因子として、ドナー細胞によって持ち込まれるヒストン修飾が注目されている。Matoba らは H3K9me3 が SCNT 後の初期化に抵抗性を示すヒストン修飾であることを同定し(Matoba *et al.*, 2014)、さらに、この H3K9me3 を特異的に脱メチル化する酵素 *Kdm4d* および遺伝子発現の転写活性を高める H3K4me3 の脱メチル化酵素 *Kdm5b* をコードする各 mRNA を SCNT 胚へ同時注入することによる人為的なメチル化抑制は、クローンマウスの作出効率が 1%から 8%にまで向上させることが報告されている (Liu *et al.*, 2016)。また、H3K9me3 においては、ウシ(Liu *et al.*, 2018)、ヒツジ(Zhang *et al.*, 2018)、ブタ(Zhai *et al.*, 2018)の SCNT 胚においても低メチル化状態が胚発生能を改善することが判っており、H3K9me3 をターゲットとしたリプログラミング方法は動物種を越えて類似している可能性が示唆される。一方、iSCNT 胚では、部分的なリプログラミングを生じると共に、ドナー細胞で発現する特異的遺伝子の発現が頻繁に観察されることや KDM ファミリーが不活性化されていることが判っている(Wang *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2014; Zuo *et al.*, 2017)。

こうした iSCNT 胚の発生能に関する研究では、DNA およびヒストンメチル化酵素阻害剤で処理したドナー細胞を用いることにより iSCNT 胚の発生能が改善されること(Gómez *et al.*, 2012)や iSCNT 胚培養下への TSA 処理がエピジェネティックな修飾に変化を与え、発生能が改善されることが報告されている(Wittayarat

et al., 2017)。当研究室の最近の研究においても、卵子活性化直後から dBSA 存在下での TSA および VC の組み合わせ処理が卵丘細胞由来 SCNT 胚の H3K9me3 を低下することだけでなく、胚盤胞期への発生率と産子作出率も改善することを報告している(Miyamoto *et al.*, 2017, Azuma *et al.*, 2018)。

そこで本実験では、前章にて示した SCNT 法をアカネズミーマウス iSCNT へ適用し、iSCNT 胚の発生促進技術の開発を目的として、まず、d-BSA 存在下における TSA および VC の組み合わせ処理がアカネズミーマウス iSCNT 胚の発生およびヒストン修飾(H3K9me3, H3K4me3)に与える効果を評価した。次に、アカネズミドナー細胞のマウス除核卵子への曝露時間を検討し、iSCNT 胚の発生能の改善を試みた。最後に、アカネズミドナー細胞内 H3K9me3 を低下させる最適な VC 処理条件を検討し、iSCNT 胚の発生能を評価した。

第 2 節 アカネズミーマウス異種間核移植胚における ヒストンメチル化修飾の局在および発生能の検討

前章で示した SCNT 法を用いて、d-BSA 存在下で TSA および VC 処理がアカネズミーマウス iSCNT 胚の発生能およびヒストン修飾(H3K9me3, H3K4me3)へ与える効果について評価した。ドナー細胞には、アカネズミ尾部由来細胞を用い、レシピエント卵子にはマウス除核卵子(*Mus musculus domesticus*)を用いた。

材料および方法

1. 培養液の調製

以上の過程は、第 2 章第 2 節と同様に行った。

2. 供試動物

レシピエント卵子には、成熟齢に達した B6D2F1(C57BL/6NCr×DBA/2Cr)の雌マウスを使用した。SCNT のドナー細胞には、同系統の卵丘細胞および尾部から樹立した線維芽細胞を使用した。iSCNT のドナー細胞には、富山市ファミリーパークから提供されたアカネズミの尾部から樹立した線維芽細胞を用いた。本実験に使用したマウスは、日本 SLC 株式会社から購入し、入荷後、概日調整を 1 週間以上行い順化した後に実験に供試した。飼育条件は、ライトコントロール(明期; 7:00-19:00、暗期; 19:00-7:00)、室温 23±5℃、湿度 50±5%の環境下において、飼料および飲水を自由摂取させた。なお、本実験に際して、動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規程に準じて実施した。

3. 過剰排卵処理および未受精卵子の回収

4. 卵丘細胞の調製

以上の過程は、第 2 章第 2 節と同様に行った。

5. 尾部由来線維芽細胞の樹立

成熟齢に達した B6D2F1 マウスおよび富山市ファミリーパークから提供されたアカネズミの尾部組織は、麻酔下にて採取した。採取した尾部組織は皮膚を剥離し、小直剪刀を用いて表面に切込を加え、35mmDish へ置き、カバーガラスを被せて 10% FBS/DMEM 100mL に対して、Amphotericin B(15290018, Thermo Fisher Scientific) 2mL を加えた培養液を 3~4mL 導入して培養を開始した。組織から遊走し定着した細胞は、0.25% Trypsin-EDTA で 5 分間処理して細胞を剥離後、DMEM を加えて酵素活性を停止させた。細胞懸濁液を遠心後、細胞のペレットを 10%FBS/DMEM にて再懸濁して 37°C・5%CO₂ in air で培養した。定着した線維芽細胞は 80%コンフルエントで継代培養を行い凍結保存した。

各動物由来線維芽細胞の継代培養操作および凍結・融解方法は、第 2 章 2 節の胎子由来線維芽細胞の実験方法と同様に行った。

細胞融合操作への供試は、細胞ペレットに 6% d-BSA in HEPES CZB 培地で懸濁した後に使用した。

6. マイクロマニピレーター用マイクロピペットの作製

7. 除核操作

8. HVJ-E の調製

9. 細胞融合操作

10. 活性化処理と発生能の観察

11. 核移植胚の TSA および VC による処理

以上の過程は、第 2 章第 2 節と同様に行った。

12. 免疫組織化学的染色

SCNT 胚および iSCNT 胚は、活性化処理後 28 時間で酸性タイロドを用いて透明帯を除去し、3mg/mL PVP in PBS(-)(以下、PVP/PBS)にて 5 分間洗浄した後、3.7% Formaldehyde(162-16065, Wako)(以下、PFA) in PBS(-)で室温下において 20 分間固定した。固定した胚は、PVP/PBS にて洗浄した後、0.5% Triton X-100(A16046, Alfa Aesar) in PBS(-)で室温下において 40 分間透過処理した。透過処理後、0.01% Tween-20(655205, Millipore)、1% BSA in PBS(-)にて、ブロッキング処理を室温にて 1 時間行った。1 次抗体処理には、anti-H3K9me3 antibody (final dilution: 1:100, MBL, Nagoya, Japan; MABI0318)を用いて 4°C 下で一晩反応させた。その後、1×PBS(-)にて室温にて 15 分間、3 回洗浄した。洗浄後、2 次抗体処理には、Alexa Fluor 568-labeled Donkey anti-mouse IgG antibodies (final dilution: 1:500, Abcam plc. Tokyo, Japan; ab175472)を用いて、室温にて 1 時間、遮光下で反応させた。反応後、胚は、0.1µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride(DAPI, Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan; D1306) in DMSO にて 10 分間染色し、1×PBS(-)にて 5 分間洗浄を 2 回行った。スライドガラス上へ VECTASHIELD mounting medium(H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を 7µL 置き、その上に処理を行った胚を置き、カバーガラスを被せてマニキュアで封入した。

H3K4me3 の免疫組織化学染色には、固定処理、透過処理、ブロッキング処理については、H3K9me3 の染色時と同条件にて行った。使用した 1 次抗体処理は、anti-H3K4me3 antibody (final dilution: 1:200, Abcam; ab8580)を 4°C で一晩反応させた。2 次抗体は、Alexa Fluor 488-labeled Donkey anti-rabbit IgG antibody(final dilution: 1:500, Abcam; ab150073)を室温下にて 1 時間処理をおこなった。観察は、蛍光顕微鏡(BZ-X800, KEYENCE CORPORATION, Osaka, Japan)および解析ソフトウェア(BZ-X800 Analyzer, KEYENCE)を用い、定量解析は、Image J Fiji ソフトウェアを使用した。

13. 再構築 iSCNT 胚の VC 処理

VC 処理濃度および処理時間の検討には、まず、作製した iSCNT 卵子を Kishigami らの方法に準じて 6 時間培養することで単為発生的に活性化処理を施した(Kishigami *et al.*, 2008)。濃度検討に使用した培地は、活性化処理 8 時間後から、10, 25, 50, 100 μ g/mL VC in KSOM 培地を用いた(Figure 7)。さらに、処理時間の検討には、10 μ g/mL VC in KSOM 培地を使用し、時間は、Miyamoto らと同様に活性化処理後、TSA 処理 0~8 時間+VC 処理 8~15 時間、VC 処理 0~8 時間、VC 処理 0~15 時間、VC 処理 0~24 時間で処理した(Miyamoto *et al.*, 2017)(Table 7)。各処理条件後 iSCNT 胚は、KSOM 培地へ卵子を移し、活性化処理開始後 24、48、72、96 時間に発生能を評価した。

14. 統計学的解析

統計解析には、StatView バージョン 5.0(SAS Institute、Cary、NC、USA)と Microsoft Excel を使用して、有意水準は、p 値 0.05 以下で分散分析(ANOVA)を実行し、グループの平均間の統計的に有意な差を決定した。

Table 9. Composition of primary cell culture medium

Components	233.2 mL
DMEM	200 mL
NEAA	2 mL
Na-Pyruvate	2 mL
Pen/Strept	2 mL
1000×2ME	200 μL
△FBS	25 mL
Amphotericin B	2 mL

Table 10. Composition of 4% PFA

Components	10 mL
PFA	0.4 g
1×PBS (-)	10mL

Table 11. Composition of 0.5% TritonX-100 in 1×PBS (-)

Compoents	10 mL
TritonX-100	0.05 mL
1×PBS (-)	10mL

Table 12. Composition of blocking solution

Components	10 mL
Tween 20	10 μL
BSA	0.1 g
1×PBS (-)	10 mL

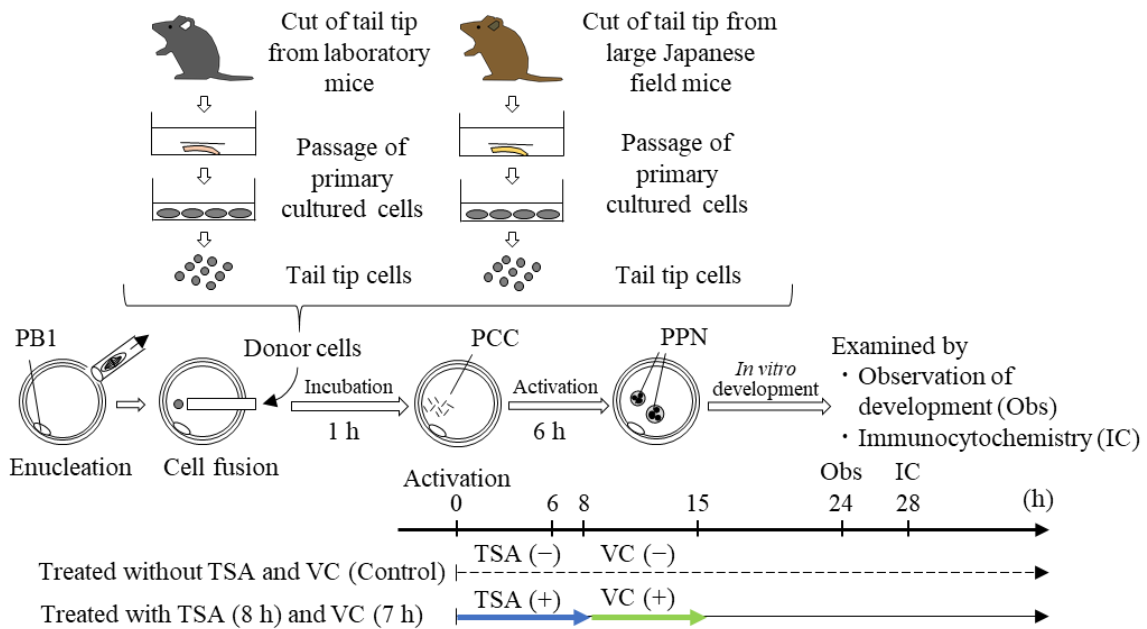


Figure 4. Schematic diagram of somatic cell nuclear transfer (SCNT) and interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) using tail tip cells derived from laboratory mice (*Mus musculus domesticus*) and large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*). PB1, first polar body; PPN, pseudo-pronuclei; Obs, observation; IC, immunocytochemistry.

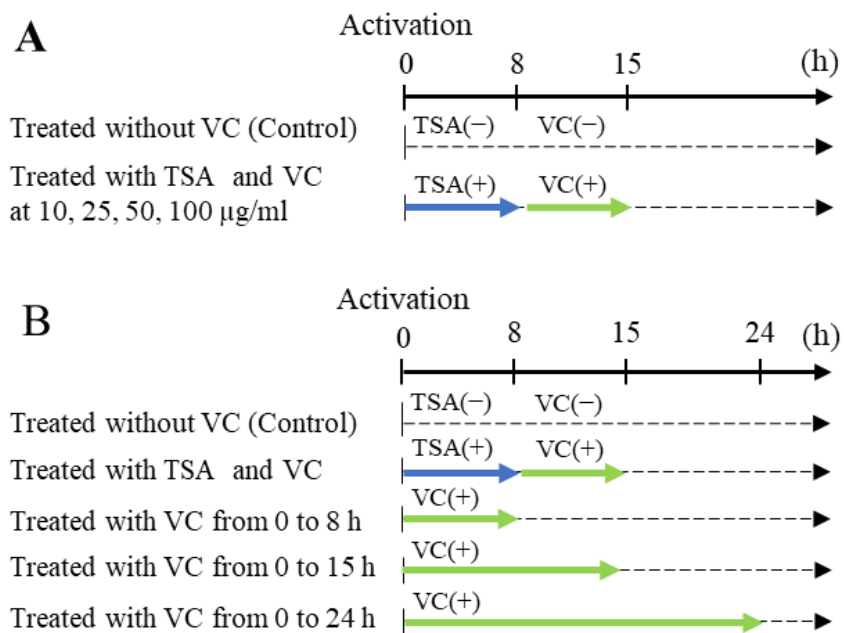


Figure 5. Time Courses of vitamin C treatment.

(A) Treatment concentrations of vitamin C. (B)

Treatment periods of vitamin C.

結果

SCNT 法の応用研究として、本実験では、野生マウスのアカネズミから樹立した尾部由来細胞を用いて iSCNT 胚を作製し、その得られた胚の H3K9me3 の局在およびシグナル強度を定量した (Figure 6)。マウス卵丘細胞をドナー細胞として SCNT 胚における H3K9me3 のシグナル強度は、TSA および VC 処理区において、未処理区と比較して減少していた。さらに、アカネズミ尾部由来細胞をドナー細胞として iSCNT 胚においては、未処理区と比較して、TSA および VC 処理区における H3K9me3 の蛍光シグナルは有意に減少した。H3K9me3 は、遺伝子発現抑制型ヒストンとして知られる。SCNT 胚および iSCNT 胚では、どちらも H3K9me3 の減少がみられたため、ZGA と関連があるといわれている遺伝子発現活性型のヒストン修飾であるヒストン H3K4 のトリメチル化 (H3K4me3) について免疫組織化学的解析をおこなった (Figure 7)。H3K4me3 は、SCNT および iSCNT のどちらにおいても観察され、そのシグナル強度は TSA および VC 処理による影響を受けなかった。これらの結果から、TSA および VC 処理は、H3K9me3 の減少を誘導するものの H3K4me3 に対しては影響を及ぼさないことが明らかとなった。

さらに、TSA および VC 処理による SCNT 胚および iSCNT 胚の発生成績を Table 13 に示した。SCNT 胚の作製には、マウス卵丘細胞およびマウス尾部由来細胞をドナー細胞として用い、iSCNT 胚の作製には、アカネズミ尾部由来細胞を用いた。胚の観察は、PCC を観察後、卵子活性化から開始して経時的に行われ、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間に行った。その結果、TSA および VC 処理条件に関わらず、2 細胞期への発生率は非常に高率であった。マウスに由来するドナー細胞では、TSA および VC で処理した偽前核 (pseudo-pronuclear: PPN) 卵子は、未処理区と比較して、卵丘細胞を用いた場合は 92%、尾部由来細胞を用いた場合は 65% の胚盤胞期への発生率を有した。しかしながら、アカネズミ尾部由来細胞を用いて作製した iSCNT 胚では、未処理区では全ての胚が 2 細胞期で発生を停止

し、TSA および VC 処理区においても同様に 4 細胞期への発生率は、2%(2/79)であり、胚盤胞期への発生率はわずか 1%であった。さらに、再構築した iSCNT 卵子の活性化以降の培地へ VC 処理濃度および処理時間を検討した結果、いずれの処理区においても 4 細胞期への胚発生は観察されなかった(Figure 8 and 9)。

これらのことから、活性化以降の培地への TSA および VC 処理は、iSCNT 胚内の H3K9me3 を減少させることができるものの、胚発生能を改善しないことが示唆された。

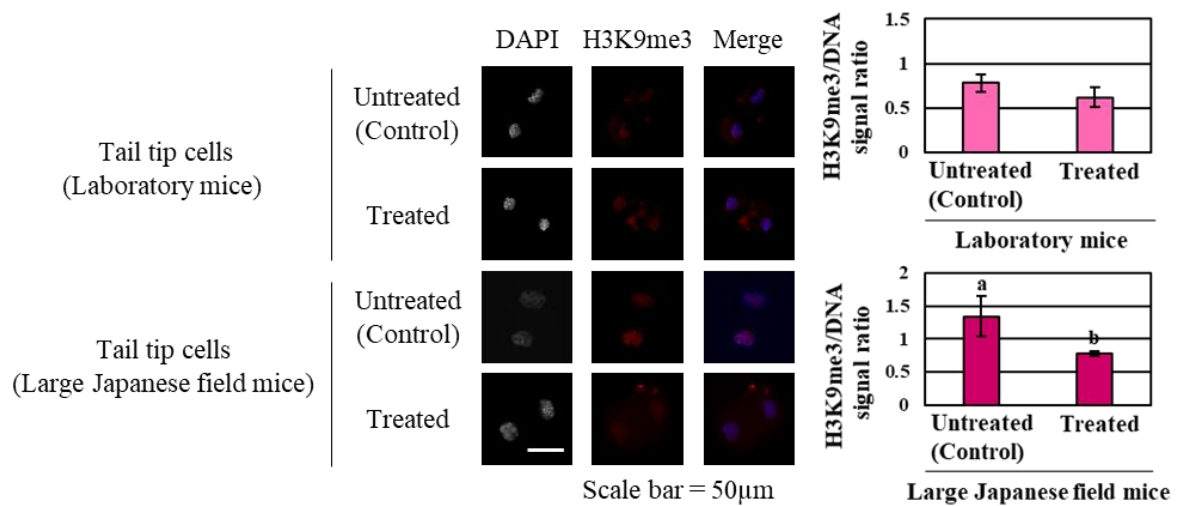


Figure 6. Immunocytochemistry of H3K9me3 in SCNT and iSCNT embryo.

Representative images of embryos stained with anti-H3K9me3 antibody in reconstructed embryos using donor cells derived from laboratory mice (upper) and large Japanese field mice (lower panel). Different letters indicate statistical significances ($P < 0.05$).

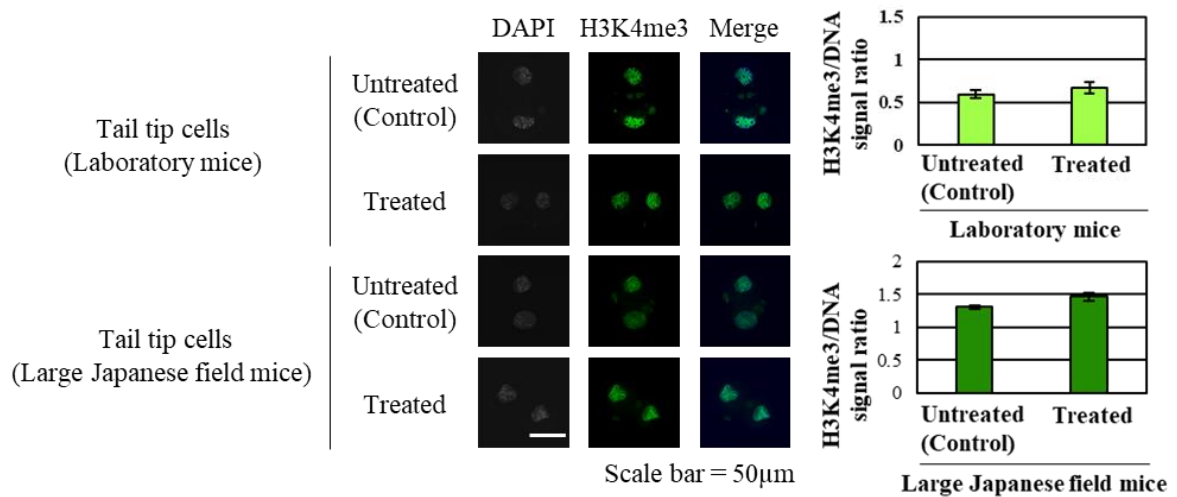


Figure 7. Immunocytochemistry of H3K4me3 in SCNT and iSCNT embryo.

Representative images of embryos stained with anti-H3K4me3 antibody in reconstructed embryos using donor cells derived from mice (upper) and large Japanese field mice (lower panel). All nuclei were stained by DAPI (gray). Merge images show all images combined with DAPI. All Intensity of fluorescent signals were measured using Image J software. Scale bar = 50 μm.

Table 13. Embryonic development of somatic cell nuclear transfer oocytes and interspecies somatic cell nuclear oocytes using

Group	Donor cell		Treatment	No. of oocytes formed pseudo-pronuclei	No. (%) of embryos developed to			
	Animals	Cell-types			2-cell	4-cell	Morula	Blastocysts
SCNT	Laboratory mice	Cumulus cell	Untreated	63	60 (95)	37 (59)	34 (54)	32 (51)
			Treated with TSA and VC	64	64 (100)	61 (95)	61 (95)	59 (92)
SCNT	Laboratory mice	Tail tip fibroblast	Untreated	83	70 (84)	43 (52)	31 (37)	23 (28)
			Treated with TSA and VC	26	24 (92)	24 (92)	23 (89)	17 (65)
iSCNT	Large Japanese field mice	Tail tip fibroblast	Untreated	53	34 (64)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			Treated with TSA and VC	85	79 (93)	2 (2)	2 (2)	1 (1)

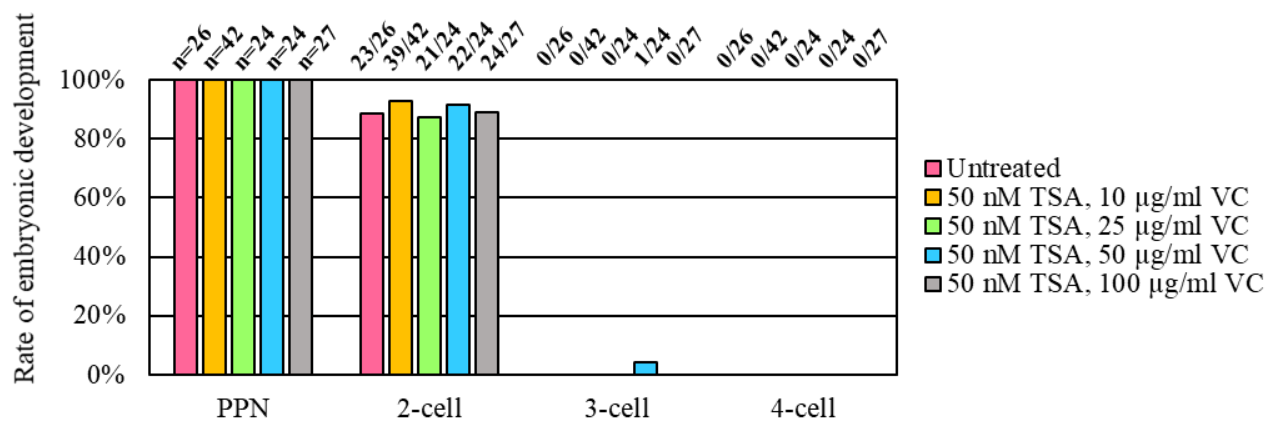


Figure 8. Embryonic development of interspecies somatic cell nuclear transfer oocytes treated with vitamin C at various concentrations.

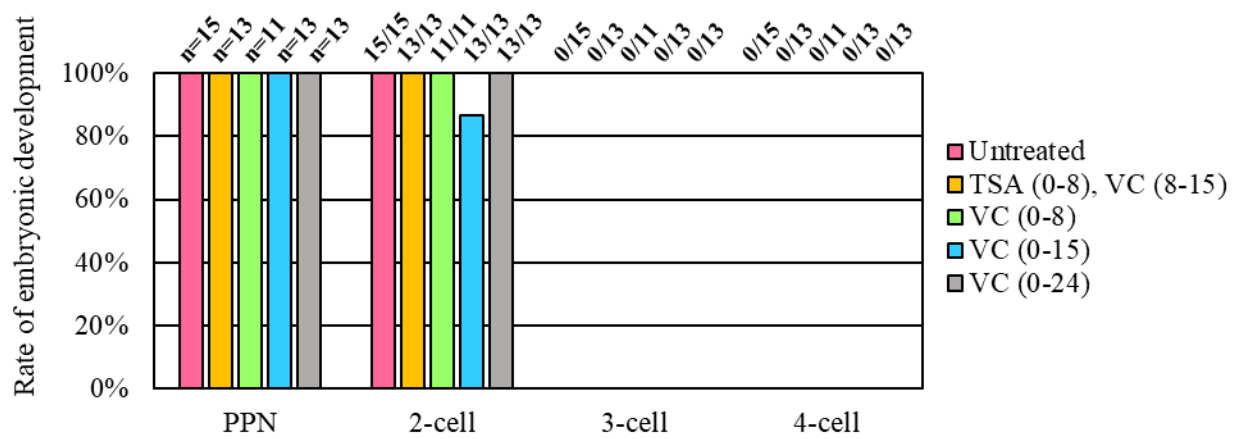


Figure 9. Embryonic development of interspecies somatic cell nuclear transfer oocytes treated with vitamin C under various treatment periods.

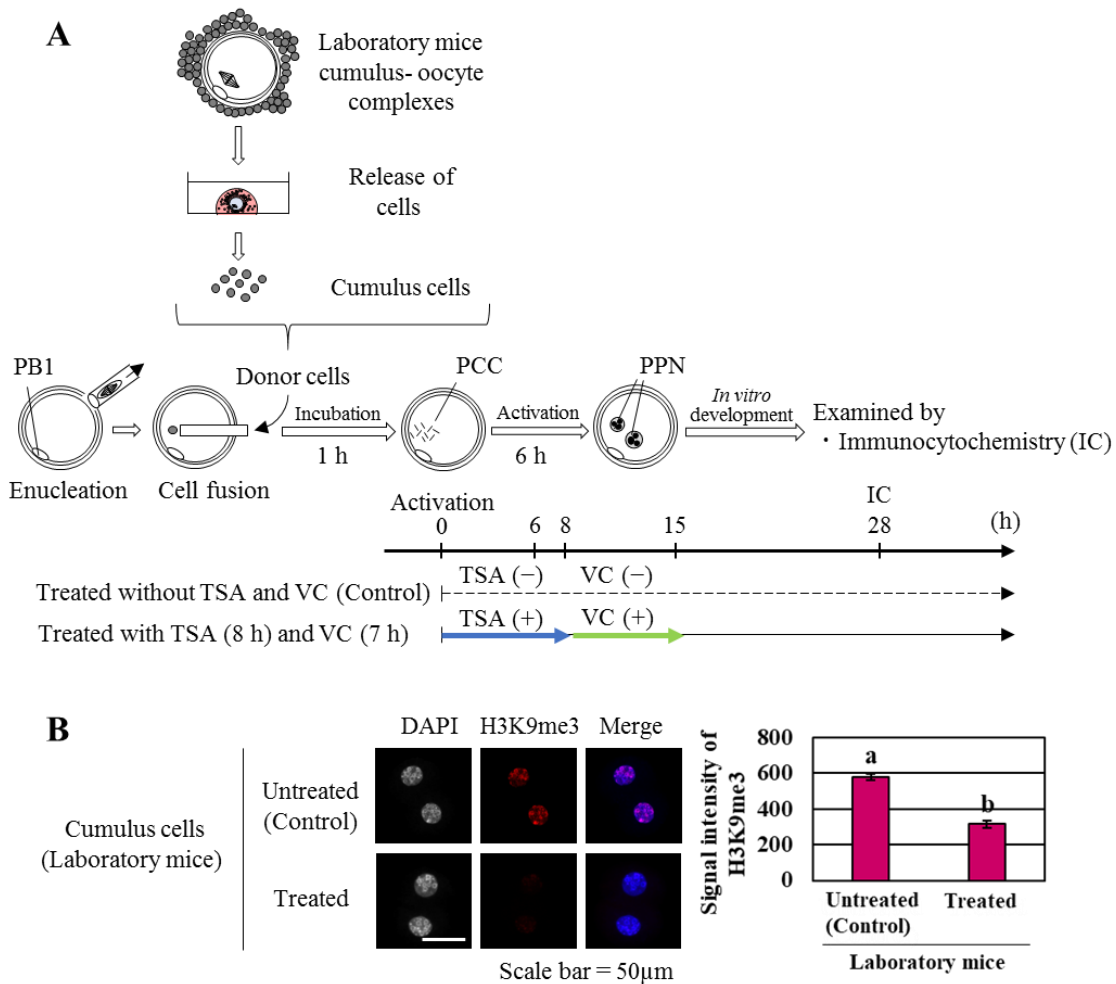


Figure 10. Effect of combination treatment of trichostatin A and vitamin C on H3K9me3 level in somatic cell nuclear transfer embryos using cumulus cells. (A) Schematic representation of SCNT using cumulus cells. (B) Immunocytochemistry of H3K9me3 at 2-cell stage embryos produced by SCNT. All nuclei were stained by DAPI (gray). Merge images show all images combined with DAPI. Thirteen to fifteen 2-cell embryos were examined in each treatment group by three independent repeated experiments. All images and intensity of fluorescent signals obtained by LEICA DMI6000B microscope and LAS AF software. Scale bar = 50 μ m.

考察

H3K9me3 の脱メチル化は、分化細胞の全能性を再獲得する重要なステップである。マウス着床前胚において、H3K9me3 はリプログラミングバリアとして機能しており、H3K9me3 の低下は、その後の ZGA を許容するためのエピジェネティックな環境を作り出すと考えられている(Wang *et al.*, 2018)。また、マウス SCNT 胚においては、2 細胞期以降の H3K9me3 の脱メチル化は、胚盤胞期へ発生する能力を支持することが示されている(Matoba *et al.*, 2014)。本実験では、Miyamoto らの条件に従って iSCNT 胚を TSA および VC 添加培地にて培養した結果、有意に H3K9me3 の低メチル化を誘導することが可能であった(Figure 6)。Miyamoto らの実験では、卵丘細胞を用いて作製した 2 細胞期胚では H3K9me3 レベルが有意に低下することを報告している(Miyamoto *et al.*, 2017)。マウス尾部由来線維芽細胞を用いて作製した 2 細胞期胚内では、TSA および VC 処理によって H3K9me3 レベルが有意に低下しなかったことから、H3K9me3 レベルの低下は、ドナー細胞種および動物種による相違が考えられた。TSA 単添加処理において、ドナー細胞の細胞種や遺伝子型によって効果が異なることが報告されている(Ogura *et al.*, 2013)。これらの結果から、アカネズミドナー細胞を用いた iSCNT 胚に最適化した技術開発の必要性が示唆された。

加えて、iSCNT 胚の発生停止時期についても ZGA と関連していると考えている。これまでの研究において、ブタ体細胞を除核したウシ卵子へ注入することにより作製されたブターウシ iSCNT 胚は、16 細胞期で発生を停止することが示されており、逆に、ウシの体細胞を除核ブタ卵子へ注入した作製されたウシ-ブタ iSCNT 胚は 4 細胞期で発生を停止することが示されている(Lagutina *et al.*, 2010)。ゆえに、アカネズミ-マウス iSCNT 胚は、マウスの ZGA が始まる 2 細胞期で発生を停止したと考えられる。本研究では、TSA および VC の添加による H3K9me3 の低下を誘導することは可能であったが、iSCNT 胚は 2 細胞期までの胚発生しかサポ

トできないことがわかった。

本研究では、前章にて再検討した Miyamoto らの実験に従い、iSCNT 胚内における H3K9me3 および H3K4me3 レベルに着目してきた。以降の節では、現状の iSCNT 法に加えて、ドナー細胞への 2 つの条件によって発生能の改善を検討した。

第3節 ドナー細胞の卵細胞質内曝露が異種間核移植胚の 発生能へ与える効果

従来法のマウス SCNT において、ドナー細胞の卵細胞質内曝露は核のリプログラミング効果を増大することが報告されている(Wakayama *et al.*, 1998)。ウシ SCNT において、移植後 2.5 時間曝露した卵子は、未曝露区と比較して、核の形成過程が改善し、桑実期/胚盤胞期への発生能の向上が認められている(Akagi *et al.*, 2014)。そこで本実験では、アカネズミドナー細胞のマウス卵細胞質内への曝露が iSCNT 胚の発生能へ与える効果について検討した。

材料および方法

1. 培養液の調製
2. 供試動物
3. 過剰排卵処理および未受精卵子の回収
4. 卵丘細胞の調製
5. マイクロマニピレーター用マイクロピペットの作製
6. 除核操作
7. HVJ-E の調製
8. 細胞融合操作

以上の過程は、第2章第2節と同様に行った。

9. 活性化処理と発生能の観察

細胞融合操作後、卵子は 1~3 時間、37°C・6%CO₂ 下にて培養した(Figure 11)。PCC 形成を確認した後、第2章第2節第1項と同様に活性化処理した。6 時間後、偽前核の形成を観察し、24、48、72、96 時間で発生能を評価した。

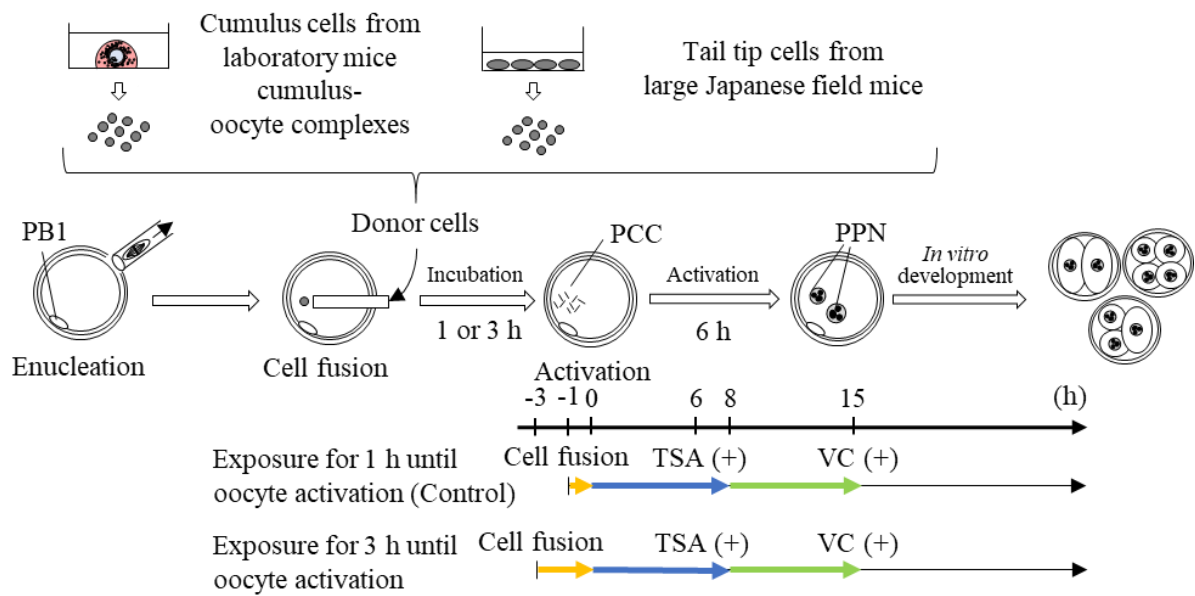


Figure 11. Brief scheme of two incubation procedures before oocyte activation.

Donor cells used cumulus cells of laboratory mice (*Mus musculus domesticus*) and tail tip cells of large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*).

結果

マウス卵丘細胞を用いて作製した SCNT 胚およびアカネズミ尾部由来細胞を用いて作製した iSCNT 胚において、1~3 時間の卵細胞質内曝露が胚発生に与える効果を検討した(Figure 11)。マウス卵丘細胞を用いて作製した SCNT 卵子において、3 時間曝露区は、1 時間曝露区と比較して、2 細胞期へ全ての胚が発生した(55/55)。さらに、その後の胚盤胞期へ 95%(52/55)の胚が発生した(Figure 12)。アカネズミ尾部由来細胞を用いて作製した iSCNT 卵子において、3 時間曝露区では、96%(134/139)が 2 細胞期へ発生した(Figure 13)。その後、1 時間曝露した卵子と比較して、4 細胞期を超えて 5 細胞期へ達する胚を観察したが、明確な発生能の改善効果は得られなかった。

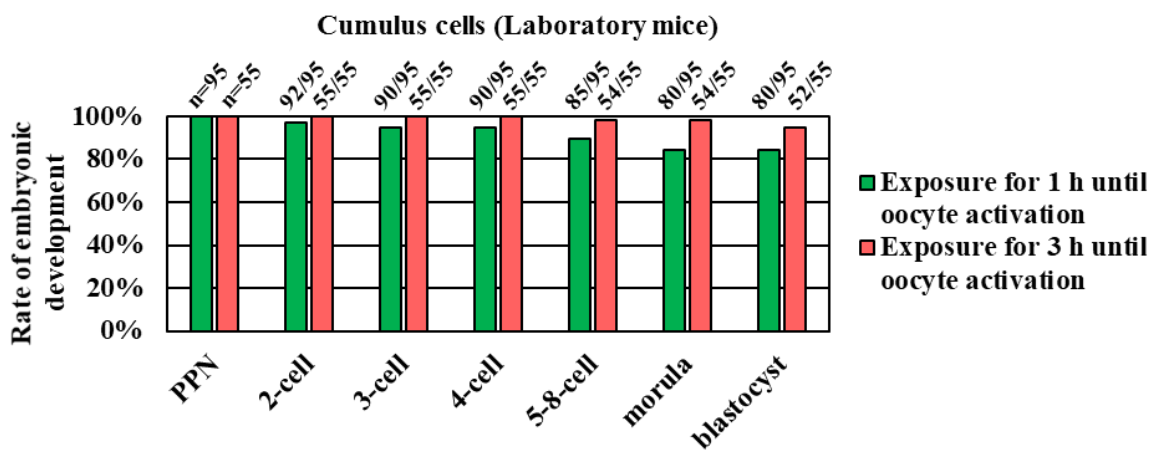


Figure 12. Effect of exposure periods on embryonic development in somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos produced using cumulus cells of laboratory mice.

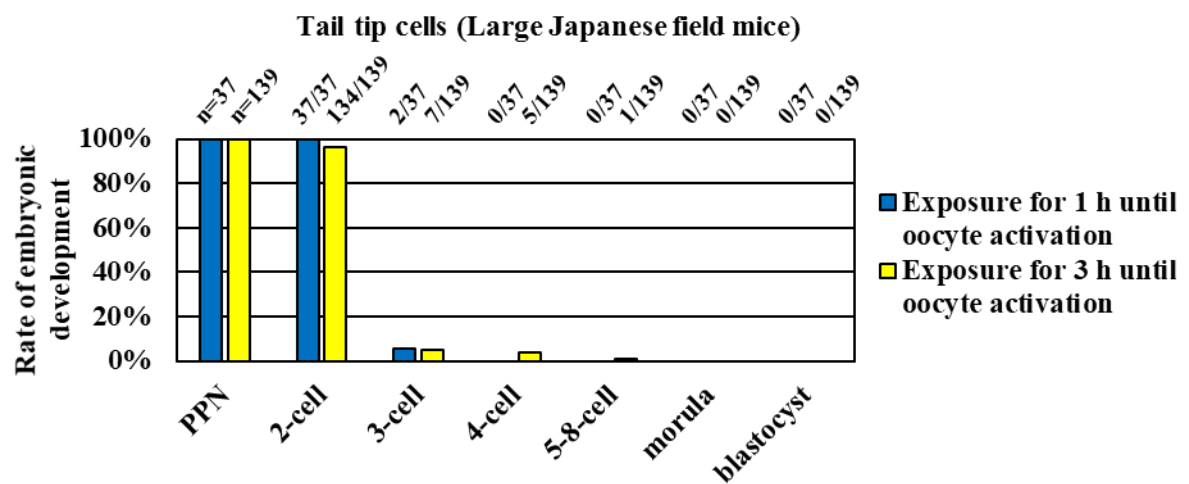


Figure 13. Effect of exposure periods on embryonic development in interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) embryos produced using tail tip cells of large Japanese field mice.

考察

従来の Wakayama らの方法では、SCNT に供試したドナー細胞は、注入後の卵細胞質内において 1～3 時間の曝露がリプログラミングに重要であることを示唆している (Wakayama *et al.*, 1997)。本実験では、iSCNT 胚の発生能を改善することを目的として、ドナー細胞の卵細胞質内での曝露時間が胚発生に与える効果を検討した。先行研究において、4 時間以上の卵細胞質内曝露は、卵子の M 期促進因子の低下によって単為発生を引き起こすことがあることが分かっている (Wakayama *et al.*, 2007)。今回の実験から、異種の卵細胞質内におけるドナー細胞の曝露はリプログラミングを著しく促進することはなく、種の違いに起因する他の要因によって、iSCNT 胚の発生が進行しないことが考えられた。

第4節 ドナー細胞の培養下への Vitamin C が H3K9me3 へ与える効果

iSCNT 胚の活性化以降の培地へ TSA および VC を添加する処理に加えて、予めドナー細胞への VC 処理により人為的に H3K9 の低メチル化状態を誘導することによって iSCNT 胚の発生能を改善させることを考えた。本節では、まず、アカネズミ尾部由来細胞への VC 処理が、H3K9me3 へ与える効果を検討した。

材料および方法

1. 培養液の調整

アカネズミ尾部由来細胞の培養には、10% FBS/DMEM を用いた。DMEM 200mL に対して、NEAA を 2mL、Na-Pyruvate を 2mL、Pen/Strept を 2mL、1000×2ME 200 μ L、予め非働化処理した FBS を 25mL、Amphotericin B を 2mL 加え、転倒混和した後、0.22 μ m のボトルトップフィルターで滅菌した。

2. Vitamin C 含有培地の調整

VC 含有培地は、10% FBS/DMEM に用事調製した 10mg/mL VC を添加することにより作製した。10mg/mL VC の作製は、1mL 滅菌水に対して、0.0015g の VC を混和させた後、マイクレスフィルターを用いて滅菌した。

3. アカネズミ尾部由来細胞への Vitamin C 処理

アカネズミ尾部由来細胞は、第3章第2節にて樹立および作製した凍結ストックを融解して使用した。まず、予め消毒用エタノールに浸漬しておいた 24mm×24mmNo.1 角カバーガラス(C024241, Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan) をガスバーナーにて火炎滅菌し、6 ウェルプレート(83.3920.300, Sarstedt K.K.,

Tokyo, Japan)へ設置した。カバーガラスが浸漬するようにオートクレーブ滅菌した 0.1% Gelatin in water(16605-55, Nacalai tesque)を適量加え、1 晩以上経過させ、カバーガラス面をゼラチンコーティングした。細胞融解後、60mmdish にて培養を始め、80%コンフルエントを確認後、0.25% Trypsin EDTA 500 μ L を添加して細胞を剥離し、1,000rpm で 5 分間遠心した。遠心後、ゼラチンコートをした 6 ウェルプレートへ $1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ cell/well を播種した。継代 1 日後、VC 含有培地へ培地を交換し最長 72 時間培養した(Figure 14)。培養後、抗 H3K9me3 抗体による免疫組織化学染色を行った。

4. 免疫組織化学染色

VC 処理を行った 6 ウェルプレートへ 3.7% PFA in PBS(-)を加え、室温下にて 20 分間細胞を固定した。1 \times PBS(-)で 3 回洗浄した後、0.5% Triton X-100 in PBS(-)にて、室温下で 40 分間透過処理した。その後、0.01% Tween-20, 1% BSA in PBS(-)にて、ブロッッキング処理を室温にて 1 時間行った。1 次抗体処理には、anti-H3K9me3 antibody (final dilution: 1:100)を用いて 4 $^{\circ}$ C 下で一晩反応させた。その後、1 \times PBS(-)にて室温にて 15 分間、3 回洗浄した。洗浄後、2 次抗体処理には、Alexa Fluor 568-labeled Donkey anti-mouse IgG antibodies(final dilution: 1:500)を用いて、室温にて 1 時間、遮光下で反応させた。抗体処理後、0.1 μ g/ml DAPI in PBS(-)にて 10 分間染色し、1 \times PBS(-)にて 5 分洗浄を 2 回行った。核染色後、スライドガラス上へ VECTASHIELD mounting medium 10 μ L を滴下し、細胞面を下にして被せて周囲をマニキュアで封入した。

5. 統計学的解析

StatView バージョン 5.0(SAS Institute, Cary, NC, USA)と Microsoft Excel を使用し、有意水準は、p 値 0.05 以下で分散分析(ANOVA)を実行し、グループの平均間の統計的に有意な差を決定した。

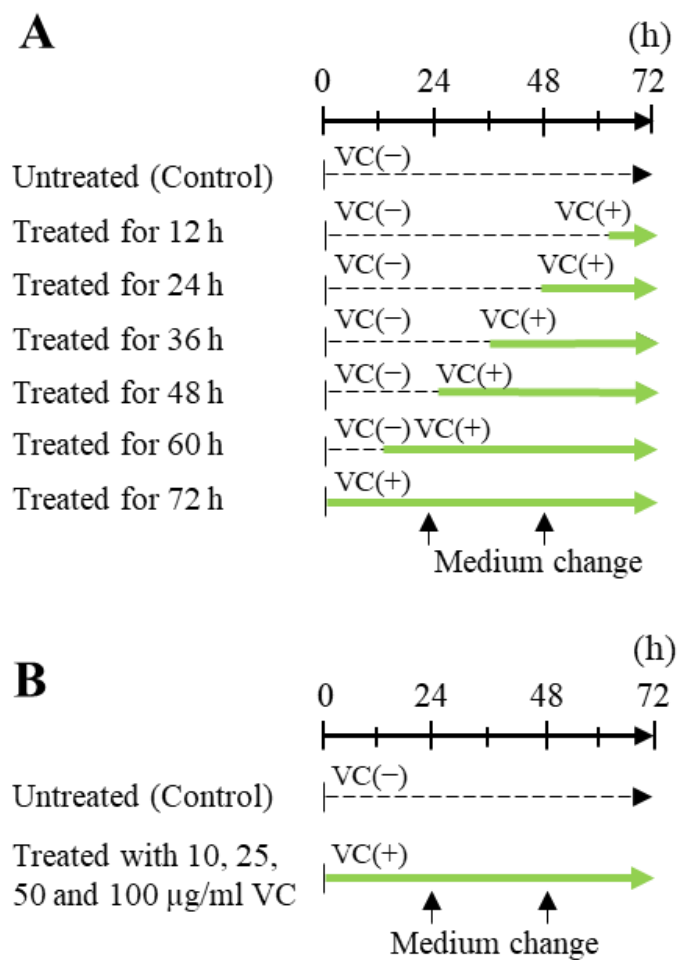


Figure 14. Brief scheme of Vitamin C treatment procedure under cell culture

結果

iSCNT に供試するドナー細胞の前処理として、アカネズミ尾部由来細胞における H3K9me3 を減少させる処理濃度および処理時間の検討を行った。処理時間については、10 μ g/mL VC を添加してから 0、12、24、36、48、60、72 時間で細胞を固定し、免疫組織化学染色を行った(Figure 14-A)。その結果、36 時間以降に徐々に H3K9me3 が減少し、72 時間で最も低メチル化状態になった(Figure 15)。さらに、72 時間の VC 含有培地での培養における最適な VC 処理濃度を検討した。VC 処理した濃度には、0、10、25、50、100 μ g/mL を用い、72 時間培養後、細胞を固定した(Figure 14-B)。その結果、25 μ g/mL VC で H3K9me3 の蛍光シグナル強度が最も減少していた(Figure 16)。これらの結果は、VC がアカネズミ尾部由来細胞の H3K9me3 の減少に効果を与えることを示しており、25 μ g/mL の濃度で 72 時間処理することが最も効率的に H3K9me3 を低下させることが示された。

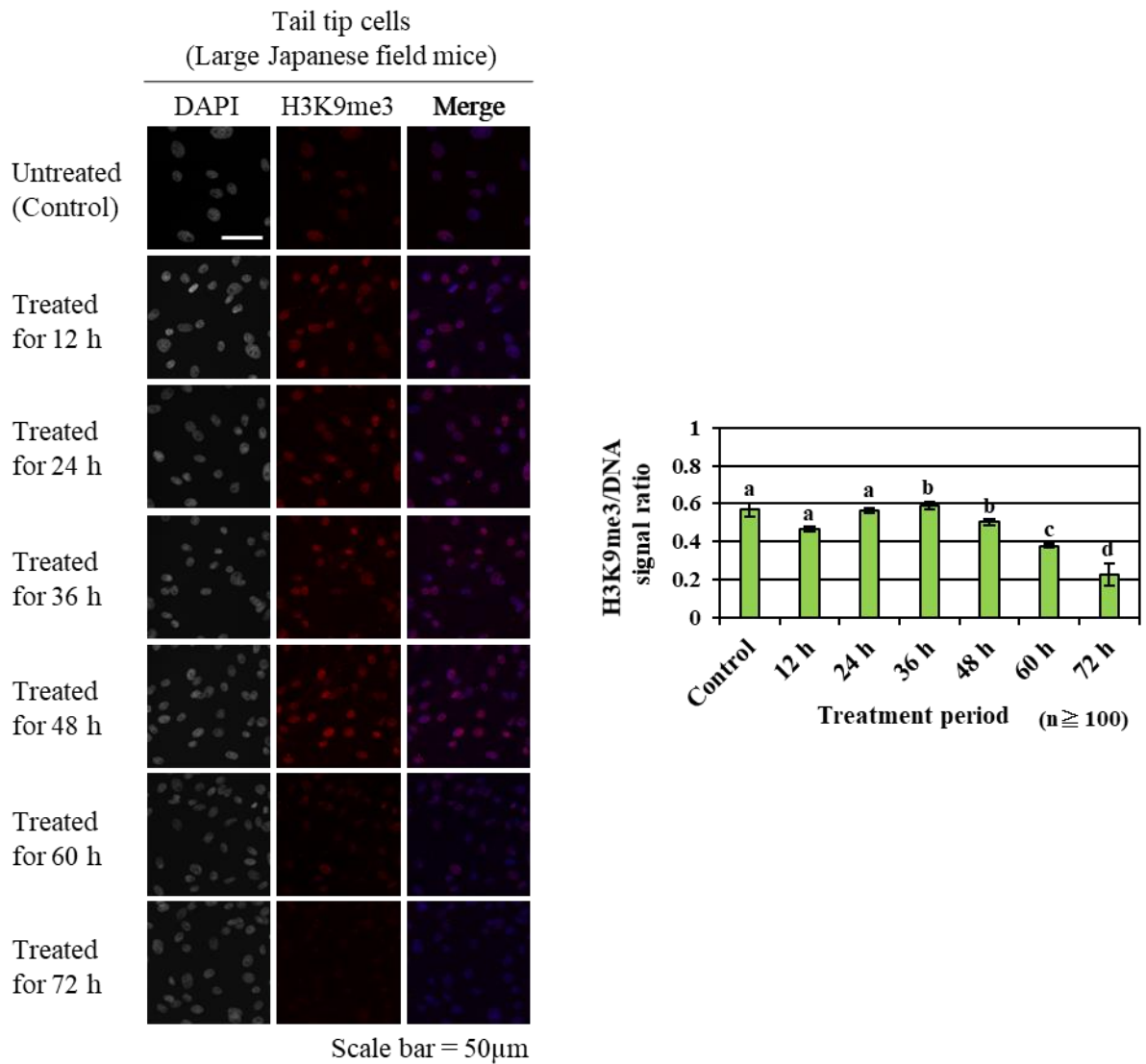


Figure 15. Immunofluorescence images of trimethylation of histone H3 lysine K9 (H3K9me3) in untreated and VC-treated cells as donor cells. (left) Shown are representative images of cells stained with DAPI (gray) and with anti-H3K9me3 antibody (red) by immunocytochemistry. Merge images show all images combined with DAPI. (right) Fluorescent intensity of H3K9me3 in untreated and VC- treated cells. Different letters indicate statistical significances ($P < 0.05$).

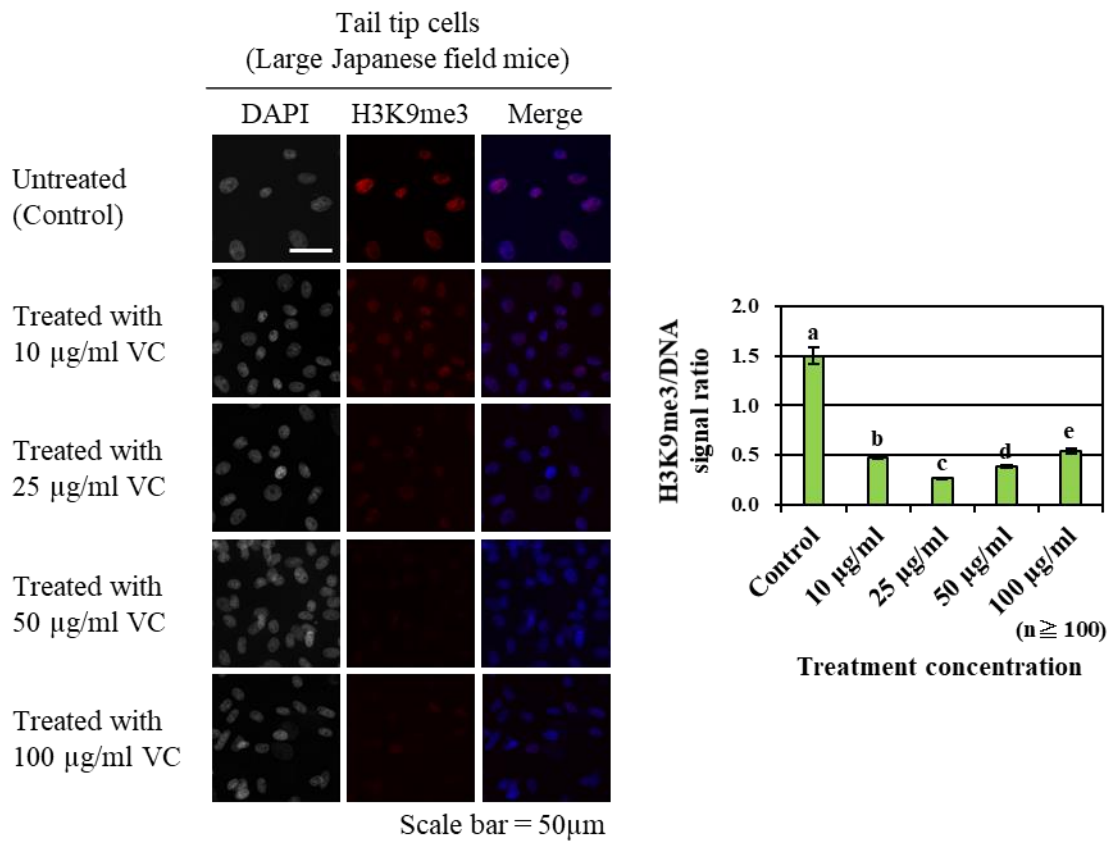


Figure 16. Immunofluorescence images of trimethylation of histone H3 lysine K9 (H3K9me3) in untreated and VC-treated cells as donor cells. (left) Shown are representative images of cells stained with DAPI (gray) and with anti-H3K9me3 antibody (red) by immunocytochemistry. Merge images show all images combined with DAPI. (right) Fluorescent intensity of H3K9me3 in untreated and VC-treated cells. Different letters indicate statistical significances ($P < 0.05$).

考察

SCNT へ供試されるドナー細胞は、除核卵子と融合した後、卵細胞質へ曝露され、核膜崩壊および染色体を早期に凝集し、活性化されることによって胚発生を開始し、分化細胞から全能性細胞へのダイナミックな変化を達成する。先行研究において、SCNT 胚内におけるメチル基転移酵素の遺伝子発現を抑制することや移植されるドナー細胞内のメチル基転移酵素の欠損が胚発生を劇的に改善することが報告されている(Matoba *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017)。Lee らによると、抗酸化作用として広く知られる VC には、DNA 脱メチル化およびヒストン脱メチル化の両方のエピジェネティックな修飾を消去する役割を持つことが示されており、この VC 処理は、リプログラミング抵抗性遺伝子領域へのリプログラミング因子のアクセシビリティを高める可能性があることが示唆されている(Lee *et al.*, 2019)。さらに、最近になって、Zhang らは、ヒツジ SCNT へ供試するドナー細胞へ 10 μ M VC を添加することによって DNA のメチル化レベルが低下することを認めている(Zhang *et al.*, 2019)。本実験においても H3K9me3 の低下が認められたことから、種によって異なる可能性があるものの VC 処理によってヒストンのみならず DNA も脱メチル化を受ける可能性が示唆された。本実験において得られた VC の最適な処理条件は、iSCNT へ使用するためのアカネズミ尾部由来細胞の細胞培養下において H3K9me3 を著しく低下させる効果を持つことが明らかとなった。

第 5 節 Vitamin C 処理細胞による異種間核移植胚の発生能の検討

前節にて、VC 処理はアカネズミ尾部由来細胞の H3K9me3 を著しく低下させる効果を持つことがわかった。そこで、本節では、VC 処理により誘導された H3K9me3 の低メチル化細胞を用いた iSCNT 胚の発生能について検討した。

材料および方法

1. 培養液の調製
2. 供試動物
3. 過剰排卵処理および未受精卵子の回収

以上の過程は、第 2 章第 2 節と同様に行った。

4. アカネズミ尾部由来細胞の VC 処理

VC 処理条件は、前節で効果を認めた 25 μ g/mL にて 72 時間処置した。まず、10mg/mL VC in water を作製し、細胞を $1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ cell/35mmdish へ播種後翌日の 9:00 に処理を開始した。72 時間後(iSCNT 当日)、除核操作後に細胞を剥離し、細胞ペレットに 6% d-BSA in Hepes CZB 培地を加えて細胞懸濁液を作製し、細胞融合操作に供試するまで氷上で保管した。

5. マイクロマニピレーター用マイクロピペットの作製
6. 除核操作
7. HVJ-E の調製
8. 細胞融合操作

以上の過程は、第 2 章第 2 節と同様に行った。

9. 活性化処理と発生能の観察

再構築した卵子は、細胞融合操作後、3時間インキュベーターで 37°C・6%CO₂ 下にて培養した(Figure 17)。PCC の形成を確認した後、再構築した卵子は Kishigami らの方法に準じて 6 時間培養することで活性化処理を行った(Kishigami *et al.*, 2008)。活性化処理培地の組成は、第 2 章第 2 節第 1 項に記した。SCNT 胚および iSCNT 胚は、活性化処理開始から 6 時間後に偽前核の形成を観察した後、24、48、72、96 時間で発生能を評価した。

6. 統計学的解析

統計解析には、StatView バージョン 5.0(SAS Institute、Cary、NC、USA)と Microsoft Excel を使用して、有意水準は、p 値 0.05 以下で分散分析(ANOVA)を実行し、グループの平均間の統計的に有意な差を決定した。

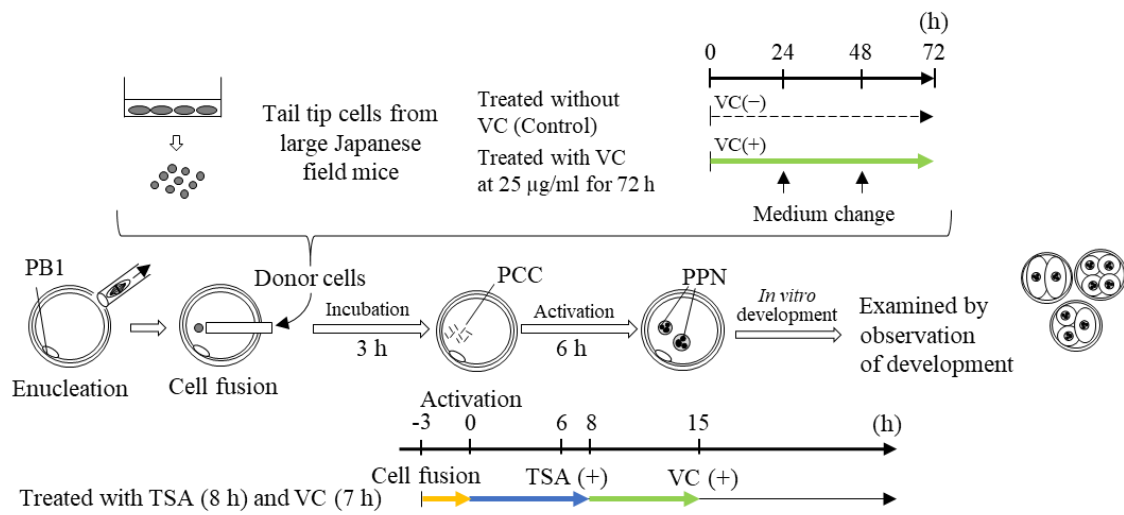


Figure 17. Schematic representation of interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) experiments using an optimized treatment method.

結果

H3K9me3の低下に焦点を当てた最適な実験条件が、アカネズミーマウス iSCNT の胚発生を改善するかどうかを調べた。ドナー細胞は、細胞融合の 72 時間前に 25 μ g/mL の VC にて処理され、さらに、それらの VC 処理ドナー細胞は除核卵子と融合させた後、活性化処理を施すまで 3 時間曝露した (Figure 16)。最適化した本実験条件における iSCNT 胚の発生成績は、Figure 18 に示すようにドナー細胞への VC 処理した区および未処理区のどちらの条件においても 2 細胞期への高い発生能を示し、さらにわずかではあるが 4 細胞期へ胚発生が進行した。これらの結果から、ドナー細胞への VC 処理は、iSCNT 胚の発生能には関与しないことが明らかとなった。

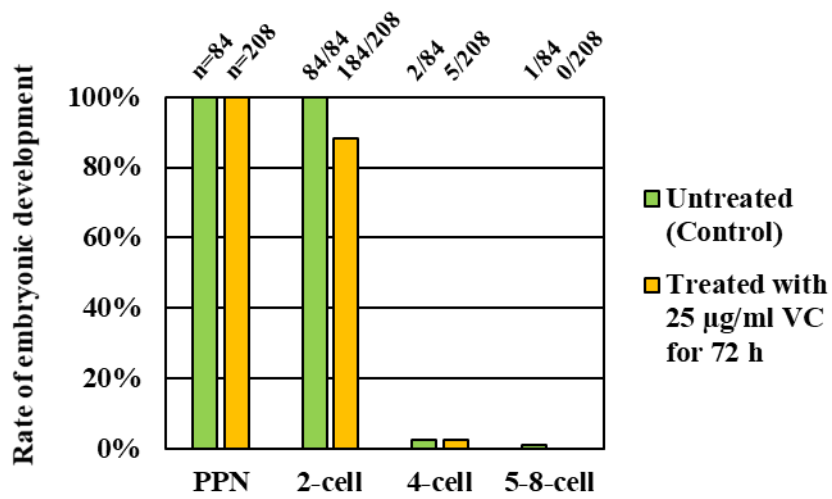


Figure 18. Development of iSCNT embryos using treated cells of vitamin C and incubation for 3 h.

考察

iSCNT 胚の発生能は、ドナー細胞を除核卵子に注入後活性化処理までに 3 時間卵細胞質中に曝露することにより 4 細胞期へのわずかな改善が示されたが、胚盤胞期への発生能に変化はみられなかった。そして、ドナー細胞に対する VC 添加培養処理は iSCNT 胚の発生能の向上にはつながらなかった。Zuo らは、iSCNT 胚では、転写調節関連タンパク質や基本的な複製因子などの遺伝子の転写が脆弱であること、および卵子活性化後に生じる母性タンパク質の分解が不十分であることによって発生が阻止されている可能性があることを示唆しており (Zuo *et al.*, 2014)、アカネズミーマウス iSCNT 胚においても同様のことが起きている可能性が考えられる。本実験において H3K9me3 への VC による発生能の改善はみられなかったことから、アカネズミーマウス iSCNT 胚では、現段階では薬剤処理による iSCNT 胚の発生を改善することは難しい。さらに最近、Zhang らの実験では、VC をヒツジ細胞の培養下へ添加すると、増殖能が増大し S 期に位置する細胞が増えることが認められており、血清飢餓培養との併用により効果的な 5-メチルシトシン(5mC)の減少を誘導することができている (Zhang *et al.*, 2019)。しかし、彼らの実験においても培養培地への VC 添加による再構築胚の発生能の改善には至っていない。従って、VC の添加による DNA メチル化および H3K9me3 への効果のような遺伝子発現抑制型アプローチだけではなく、遺伝子発現活性型(H3K4me3)等の異なるヒストン修飾を含む包括的なエピジェネティックな状態を評価する必要があることがわかった。

第 6 節 小括

本章では、第 2 章にて開発および詳細を公開した SCNT 法の応用として、iSCNT を用いた遺伝資源の保全を目的とした iSCNT について試みた。アカネズミの尾部由来細胞をマウス除核卵子へ細胞融合させて iSCNT 卵子を作製し、活性化処理後の TSA および VC 処理による iSCNT 由来 2 細胞期胚内の H3K9me3 および H3K4me3 のメチル化状態および発生能を検証した。続いて、iSCNT 胚の発生能を改善するために、ドナー細胞の卵細胞質内における曝露時間が胚発生に与える効果を検討した。最後に、ドナー細胞のリプログラミング環境の改善を目的として、iSCNT 前のドナー細胞への VC 処理による H3K9me3 の低メチル化細胞の作製を検討し、iSCNT 後の胚発生を検証した。

- (1) 高効率でクローンマウスの作製を可能にする TSA および VC の組み合わせによる SCNT 法をアカネズミ尾部由来細胞およびマウス除核卵子を用いた iSCNT へ応用した。その結果、H3K9me3 レベルの著しい減少が誘導された。しかしながら、H3K4me3 レベルは未処理区と同程度であることも判った。さらに、作製した iSCNT 卵子は、2 細胞期への発生は処理の有無に関わらず高く、処理区において一部の胚が 4 細胞期および胚盤胞期への発生することが判った。
- (2) TSA および VC の組み合わせによる SCNT 法を用いた iSCNT において、1～3 時間の幅で培養することは、4 細胞期以降への発生に明瞭な促進効果を持たないことが判った。
- (3) iSCNT へ供試する前段階として、ドナー細胞を 25 μ g/mL VC で 72 時間処理することによりドナー細胞内の H3K9me3 が最も減少する条件であることが

わかった。

- (4) 低メチル化アカネズミドナー細胞を用いて iSCNT した結果、4 細胞期以降への発生能は、未処理区と比較して差はみられなかった。H3K9me3 の低メチル化以外の作用点を狙った iSCNT 技術の開発が必要であることが示された。

以上より、アカネズミ尾部由来細胞を用いた発生工学的手法による遺伝資源の保存において、TSA および VC 処理によって 4 細胞期および胚盤胞期へ発生が進行する胚の作製が可能であることが判った。iSCNT 胚の発生能改善を目的として、ドナー細胞の卵細胞質内曝露および VC 処理は発生能に影響しないことが判り、今後は、TSA および VC 処理による H3K9me3 を含めた他のヒストン修飾との包括的なエピジェネティックな評価系が必要であると考えられた。アカネズミは、全ゲノムが最近になって公開され、モデル動物としての需要が高まっている。本実験から得られた結果は、アカネズミの生殖補助技術の構築や他の野生動物の iSCNT 胚の発生能への研究ならびに核のリプログラミングの研究に役立つと考えている。

第4章 老齡マウス由来体細胞クローン胚の発生能の検討

第1節 緒言

近年、自然の生態系や環境破壊が進む中で、生物の多様性の消失は大きな問題である(大石、1996)。世界的に取り組まれる遺伝資源の保全策は、生息域内における個体群の保存や繁殖に取り組み、後者はその個体を生息域内から生息域外の動物園や水族館などの展示施設に持ち出すことによる個体レベルでの取り組みが考えられている(大沼ら、2012)。さらに、生息域外保全の取り組みの中には、動物園や水族館における飼育下繁殖のみならず遺伝資源として①生殖細胞や②皮膚組織から樹立した培養細胞や③各種臓器そして④DNA等の保存が行われている。加えて、それぞれの遺伝資源の有効な保存やその増殖方法の開発と実践は、その遺伝子を将来的に再生することを目的としている(大石、1996)。具体的な遺伝資源を保存する取り組みは、サンディエゴ動物園の「Frozen zoo」がよく知られている。国内では、多摩動物公園野生動物保全センターや神戸大学等が野生動物の遺伝資源保存に取り組んでいる(大沼ら、2012)。しかしながら、近年、動物園や水族館等で飼育される野生動物(展示動物)は高齢化しており、次世代を作出できる生殖細胞の採取および保存方法や人工授精などの人工繁殖技術の開発は遅れている。現存する個体に負担を強いることなく保存された細胞から個体を作製することができる SCNT 技術を含む発生工学は個体作製の有効な手段である。また、加齢による不妊個体から DNA などの遺伝子保存のみならず個体としての保存は、生物多様性の保全に重要である。

老齡個体などの不妊動物から次世代を残すための方法には、iPS 細胞を利用した生殖系列キメラによる配偶子の作製と培養細胞等の体細胞を用いたクローン個体の作製がある。しかしながら、iPS 細胞は遺伝子改変を用いるため、完全な元の個体を再生できない。一方で、SCNT 技術は、ドナー細胞と遺伝的に同一の個体を作

製することが可能である。しかしながら、老齢個体のクローンに関する知見はほとんどない。

老齢個体からのクローン個体の作出は、マウスにおいて ntES 細胞を介することで可能であることが示されている(Mizutani *et al.*, 2008)。しかしながら、動物の加齢は個体によって様々なスピードで進行するため、老齢マウス由来の初代培養細胞の細胞老化状態がクローン胚やクローンマウスにどのような影響を与えるのかについては、不明なままである。

細胞の老化状態を評価するための指標は、いくつかあるものの明確に定義づけられていないため、複数の評価系が用いることが一般的である。評価系の 1 つであるテロメアは、Heyflick らによって発見され、テロメアの短縮とそれによるテロメアの機能低下は老化細胞における増殖能を喪失させることが知られている(安達(玉盛)ら、2013)。哺乳類の場合、5'-(TTAGGG)*n*-3'の 6 塩基の繰り返し配列からなるヌクレオチドで、染色体末端に存在しており、細胞分裂による遺伝情報の損失から保護する役割を担っている(定家、2013)。また、現在までに広く用いられている老化細胞のバイオマーカーには、SA-β-Gal (senescence associated beta galactosidase: 老化関連β-ガラクトシダーゼ)がある。SA-β-Gal は、リソソームのβガラクトシダーゼをコードする GLB1 遺伝子産物であり、老化に伴う細胞内環境が中性付近の pH へ変化することによって過剰発現されることから(Dimri *et al.*, 1995)、X-Gal 染色により簡易的に細胞老化を検出することができるマーカーとして知られている。さらに最近になって、哺乳類の老化の過程における若年マウスと高齢マウスの組織特異的な miRNA の発現量が変化することが観察されており、その 1 つとして、microRNA34a は、E2F、CDK4、c-myc、SIRT1 をターゲットにして老化を誘導するがん抑制 microRNA であることが知られている(東ら、2013)。

そこで、本章では、老齢個体からのクローンマウスの作出を目標として、老齢マウスから樹立した耳介由来培養細胞の老化状態を評価し、発生能を検討した。

第2節 老齡マウス由来初代培養細胞の老化評価

前節にて述べたように、老齡マウスにおける生殖能および耳介組織から樹立した線維芽細胞における老化評価を検討した。

材料および方法

1. 供試動物

7週齢に達したマウス(C57BL/6NCr)を日本 SLC 株式会社から購入し、26か月に達した老齡マウス(C57BL/6NCr)2匹を国立健康長寿医療センターから提供されて搬入した。概日調整を1週間以上行い順化した後に実験に供試した。飼育条件は、ライトコントロール(明期; 7:00-19:00、暗期; 19:00-7:00)、室温 $23\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ の環境下において、飼料(CRF1R: オリエンタル酵母工業(株))および飲水を自由摂取させた。なお、本実験に際して、動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規程に準じて実施した。

2. 発情周期の解析

搬入後、8週齢に達したマウスおよび26か月1週齢に達したマウスは、McLeanらの方法を若干修正して発情周期を検証した(McLean *et al.*, 2012)。発情周期の検証に伴い膣スメアを1日2回取得した(9:00-10:00, 17:00-18:00)。MilliQ水をオートクレーブ滅菌した滅菌水にて滅菌した綿棒を湿らせ、綿棒を膣口に1~2mm程度挿入し膣垢を採取した。膣垢が付着している綿棒をスライドガラスへ塗布した。膣垢が乾燥後、99.5% エタノール(14712-05, Nacalai tesque)をスポイトにて滴下して細胞を固定した。ギムザ染色液(37114-64, Nacalai tesque)を滴下して核染色をおこなった。染色後に水洗し、乾燥して鏡検した。観察は、オールインワン蛍光顕微鏡(Keyence BZ-X800, BZ-X800 Analyzer)を用いて観察した。

3. 採材

発情周期を検討した後、7.5IU PMSG および 7.5 IU hCG を 48 時間間隔で腹腔内へ投与後、各マウスは安楽死処分を実施し、各実験に供試するために採材した。潜在的な卵巣内卵子の有無を検討するため、卵巣組織はパラフィン切片の作製およびヘマトキシリンエオジン染色へ供試した。また、耳介由来線維芽細胞の樹立のために、耳介組織は細胞培養へ供試した。

4. 卵巣のパラフィン切片の作製とヘマトキシリンエオジン染色

卵巣内卵子の各マウスの卵巣は、採材直後に乾燥を防ぐために 1×PBS(-)内へ導入した。1×PBS(-)を除去後、4% PFA in PBS(-)にて 4°C で 1 晩、シェーキングミキサーで (SHM-201, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Shizuoka, Japan) 振盪させながら固定した。固定液を除去後、0.1% Tween in PBS(-)(以下、PBST)を加え、4°C で 40 分間振盪させながら組織を洗浄することを 3 回おこなった。続いて、脱水処理は、25% メタノール(21915-93, Nacalai tesque) in PBS(-)、50% メタノール in PBS(-)、75% メタノール in PBS(-)の順番に溶液を交換し、100% メタノール in PBS(-)にて 2 回処理し、パラフィン置換するまで-20°Cにて保存した。パラフィン置換の直前に、100% メタノール inPBS(-)内にて実体顕微鏡下で卵巣表面の卵巣嚢を除去し、99.5% エタノール(14713-53, Nacalai tesque)に置換した。パラフィン置換は、まず、エタノールを除去後、卵巣組織を Xylene(244-00081, Wako) に導入し、63°Cの恒温培養器(TVN380DA, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)内にて 1 時間 15 分間処理した後、再度、新しい Xylene にて 63°Cの恒温培養器内にて 1 時間処理した。Xylene を除去した後、Xylene と Paraffin(4653, Sakura Finetek Japan Co.,Ltd., Tokyo, Japan)を 1:1 で混和した Xylene-Paraffin 溶液に組織を移動させ、63°Cの恒温培養器にて 1 時間置換した。溶液を除去後、Paraffin を加えて 63°Cの恒温培養器内にて 1 時間置換させた後に、再度 63°Cの恒

温培養器にて1時間30分置換した。パラフィン置換後、少量のParaffinを鋳型へ流し、組織を移して固定包埋用カセット(41870, Sakura Finetek Japan)を被せた後にParaffinで満たし、4℃に冷却したパラフィンコールドプレート(EG1130, Leica)上にてParaffinを固化させることにより組織を包埋した。包埋した組織は、鋳型から外して切片を作製するまで4℃で保管した。組織を包埋したParaffinは、組織が中央に位置できるようにトリミングし、固定包埋用カセットをマイクロトーム(RM2155, Leica)へ取り付け、5μmの厚さで切片を作製した。作製した切片は、パラフィン伸展器(M-110, SHIRAIMATSU & CO., LTD., Osaka, Japan)上で42℃に予め温めておいてスライドガラス(SO317, Matsunami)上にMilliQ水を張った上に重ならないように浮かせ、MilliQ水をキムタオルにて除去し、1晩乾燥させた。ヘマトキシリンエオジン染色は、まず、乾燥した切片をXyleneに5分間室温で3回した後、100%エタノールにて1分間室温で2回、95%エタノール in MilliQ水、70%エタノール in MilliQ水、50%エタノール in MilliQ水、30%エタノール in MilliQ水、MilliQ水にて1分ずつ室温で処置した。Hematoxylin(131-09665, Wako)中に切片を映して5分間室温で処置した後、MilliQ水中にて室温下で染色液を洗い流し、HCl in 70% EtOHで3秒間および予め60℃で温めたMilliQ水にて1分間色出しを行った。再度室温のMilliQ水にて1分間洗浄した後、30%エタノール in MilliQ水、50%エタノール in MilliQ水、70%エタノール in MilliQ水にて各1分ずつ室温にて処理し、1% Eosin Y 溶液(051-06515, Wako)、95%エタノール in MilliQ水、100%エタノールにて2秒間室温にて処置した。再度100%エタノールにて2秒間室温にて処置した後、Xyleneで3回2秒間ずつ処理した。染色した切片は、Mount-Quick(DM-01, Daido Sangyo Co., Ltd., Saitama, Japan)を滴下して24×60mmのカバーガラスを被せ、封入した。観察は、オールインワン蛍光顕微鏡(Keyence BZ-X800, BZ-X800 Analyzer)を用いて観察した。

5. 耳介由来組織からの初代培養細胞の樹立

採材した耳介組織は、なるべく毛を小直剪刀により切り落とした。次に、細胞が遊走する表面積を増やすために、耳介組織の周囲 1mm を切り取り、内耳に向かって 1mm の切込を加え、35mmDish へ置いた。初代培養用の Amphotericin B 含有 10% FBS/DMEM を約 20 μ L 滴下し、24 \times 24mm のカバーガラスを被せることにより耳介組織を Dish の底面に密着するようにした。初代培養には、Amphotericin B 含有 10% FBS/DMEM を 3mL 加えて培養を開始した。組織から遊走し定着した細胞は、0.25% Trypsin-EDTA で 5 分間酵素処理して、細胞を剥離し、DMEM を加えて酵素活性を停止させた。細胞懸濁液を遠心後、細胞のペレットを Amphotericin B 含有 10% FBS/DMEM にて再懸濁して 37 $^{\circ}$ C \cdot 5%CO₂ in air で培養した。定着した線維芽細胞が 80%コンフルエントで継代培養を行った。各マウス由来線維芽細胞の凍結ストックは、CELLBANKER を細胞ペレットへ 500 μ L/本で作製し、-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。

6. 核型解析

樹立した細胞の核型解析は、細胞を融解操作後に 1 回継代培養をおこない、最終継代から 48 時間後に行った。まず、細胞周期を分裂前期～前中期に誘導するため、10 μ g/mL コルセミド(09356-74, Nacalai tesque)を添加し、37 $^{\circ}$ C \cdot 5%CO₂ in air で 3 時間培養した。3 時間後、0.25% Trypsin EDTA を用いて細胞を剥離した後、1,000rpm にて 5 分間遠心し、上清除去することによって細胞ペレットにした。細胞ペレットをタッピングにより混和した後、72mM KCl をゆっくりと加えて低張処理を 30 分間おこなった。その後に 1,000rpm にて 5 分間遠心し、上清を除去した。続いて、得られた細胞ペレットにカルノア固定液(メタノール：酢酸(00212-43, Nacalai tesque)=1 : 1)をゆっくりと 6mL 加えることにより細胞を固定した。さらに 1,000rpm にて 5 分間遠心し、上清除去した後に再度カルノア固定液を加えて緩やかにピペッティングをおこなった。再度 1,000rpm にて 5 分間遠心し、100 μ L

のカルノア固定液を加えて緩やかにピペッティングを行い、細胞懸濁液とした。次に、細胞懸濁液をスライドガラスへ 10 μ L ずつ滴下し、乾燥させた。乾燥後、10 μ g/mL DAPI in MilliQ 水へスライドガラスを浸漬させ、10 分間核染色を行った。核染色後、MilliQ 水にて洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を滴下し、24 \times 60mm のカバーガラスを被せ、周囲をマニキュアで封入した。核型の観察には、オールインワン蛍光顕微鏡(Keyence BZ-X800, BZ-X800 Analyzer)を用いて観察した。

7. SA- β -Gal 解析

SA- β -gal 活性は、Senescence Detection Kit(518-37601, Wako)を用いて検出した。培養細胞を 12 ウェルプレートに 1well あたり 2.0 \times 10⁴cell を播種し、24 時間後に細胞を付属の Fixative solution にて 15 分間室温にて固定した。その後、細胞は、付属の Staining solution mix にて遮光下の 37 $^{\circ}$ C (5%CO₂ in air)で 15 時間静置した。1 \times PBS(-)にて染色した細胞を洗浄後、1 μ g/mL DAPI in 1 \times PBS(-)を用いて 10 分間核染色した。観察は、蛍光顕微鏡(DMI6000B, Leica)およびソフトウェア(Leica LAS AF)を用い、得られた画像は、Image J Fiji を用いて定量した。

8. テロメア長解析

老齢マウス由来線維芽細胞および 10 週齢マウス由来線維芽細胞を用いて細胞の老化指標として汎用される染色体のテロメア長の解析を行った。細胞からの DNA 抽出には、シカジーニクス R トータル DNA プレップキット(組織用)(08204-96, KANTO CHEMICAL CO.,INC., Tokyo, Japan)を用いた。サンプル調製は、老齢マウス由来線維芽細胞および 10 週齢マウス由来線維芽細胞を培養し、それぞれ 5.0 \times 10⁵cell になるように細胞ペレットを作製後、200 μ L の 1 \times PBS(-)を加えて細胞懸濁液とし、DNA 抽出まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。キットに付属されている Preteinase K 溶液を 20 μ L 入れたチューブへ細胞懸濁液 200 μ L を加え、続いて Buffer BL

200 μ L を加えてボルテックスミキサーで攪拌し完全に懸濁した。56 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで 10 分間インキュベートした後、エタノールを 200 μ L 加えてボルテックスミキサーにて攪拌した。攪拌後、溶液を GeneAll SV Column type G へ加えて 6,000 \times g にて 1 分間遠心して、ろ液を廃棄して新しいチューブへ GeneAll SV Column type G をセットした。さらに、600 μ L の Buffer BW を加えて、室温にて 6,000 \times g にて 30 秒間遠心し、ろ液を廃棄後、新しいチューブへ GeneAll SV Column type G をセットした。次に、700 μ L の Buffer TW を加えて室温にて 1 分間 6,000 \times g で遠心し、GeneAll SV Column type G を新しいチューブへセットした。さらに、室温で 1 分間最高速度にて遠心し、Buffer TW を完全に除去した後、GeneAll SV Column type G を新しいチューブへセットし直し、200 μ L の Buffer AE を加えて 1 分間室温で静置した。1 分後、最高速度で遠心し、ろ液 (DNA 溶液) を回収した。回収した DNA は、テロメア長解析に用いるまで、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。続いて、テロメア長解析には、Relative Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit, Mouse(M8908, ScienCell Research Laboratories, CA, USA)および TB Green $^{\circledR}$ Premix Ex Taq $^{\text{TM}}$ II (Tli RNaseH Plus)(RR820A, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いた。まず、200 μ L の nuclease-free H $_2$ O を凍結乾燥された telomere primer set および SCR primer set へ加えて primer stock solution を作製し、20 μ L ずつ分注して-20 $^{\circ}$ Cへ保管した。次に、Mixture の組成は、Primer stock solution 2 μ L、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ L、Nuclease-free H $_2$ O 7 μ L、Genome DNA 1 μ L を加えて混和した後、リアルタイム PCR MyGoPro(1337, IT-IS Life Science Ltd., Cork, Ireland)を用いて定量 PCR をおこなった。反応条件は、Hold 95 $^{\circ}$ Cにて 30 秒初期変性させた後、95 $^{\circ}$ C \cdot 5 秒、60 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒の 2stepPCR を 40cycle 行った。得られた C $_q$ 値を Comparative $\Delta\Delta$ C $_q$ 法を用いて定量した。

9. microRNA34A の遺伝子発現解析

(1) サンプル調製および RNA 抽出

老齢マウス由来線維芽細胞および 10 週齢マウス由来線維芽細胞の遺伝子発現解析に用いた microRNA 抽出には、NucleoSpin® miRNA(740971.50, Takara Bio) を用いた。各細胞は、 1.0×10^5 cell に調整し、1,000rpm にて 5 分間遠心することにより得られた細胞ペレットへ 300 μ L の Buffer ML を添加し、ボルテックスミキサーにて溶解し、5 分間静置した。次に、NucleoSpin Filter を Collection Tube にセットし、溶解液を NucleoSpin Filter に加え、11,000 \times g で 1 分間遠心した。ろ液 300 μ L に対してエタノール 150 μ L を添加し、すぐにボルテックスミキサーにて 5 秒間混合し、室温で 5 分間静置した。NucleoSpin RNA Column を Collection tube にセットし、混合した液をカラムに添加し、14,000 \times g、1 分間遠心した。続いて、ろ液に Buffer MP 300 μ L を加え、ボルテックスミキサーにて 5 秒間混合し、11,000 \times g、3 分間遠心してタンパク質を沈殿させた。NucleoSpin Protein Removal Column を Collection tube にセットし、上清をカラムに添加し、11,000 \times g、1 分間遠心した。NucleoSpin Protein Removal Column を取り除き、800 μ L の Buffer MX を添加し、すぐにボルテックスミキサーにて 5 秒間混合した。NucleoSpin RNA Column を Collection Tube にセットし、混合した溶液を 725 μ L を添加し、11,000 \times g、30 秒間遠心した。ろ液を廃棄し、同じチューブにカラムをセットし、この操作を繰り返すことにより、すべての混合溶液をカラムへ吸着させた。吸着させたメンブレンを洗浄するため、Buffer MW1 600 μ L をそれぞれのカラムに添加し、11,000 \times g、30 秒間遠心した後、ろ液を廃棄し、再び同じチューブにカラムをセットした。さらに、700 μ L の Buffer MW2 をカラムに添加し、11,000 \times g、30 秒間遠心した後、ろ液を廃棄後、再度同じチューブにカラムをセットした。最後に、250 μ L の Buffer MW2 をカラムに添加し、11,000 \times g で 2 分間遠心してカラムを乾燥させ、メンブレンの洗浄を終えた。次に、メンブレンに吸着させた RNA を溶出させた。まず、カラムを新しい Collection Tube にセットして、RNase-free H₂O 30 μ L をカラムに

加え、蓋を閉めずに室温で 1 分間静置した。最後に、蓋を閉めて 11,000×g で 30 秒間遠心して RNA を溶出した。

(2) cDNA の合成およびリアルタイム PCR による定量解析

cDNA の合成およびリアルタイム PCR には Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green Kit (638314, Takara Bio) を用いた。cDNA 合成のための mixture 組成は、Table 15 に示した。mRQ Buffer (2x) 5 μ L、RNA sample 3.75 μ L、mRQ Enzyme 1.25 μ L を混合 (Table 15) し、リアルタイム PCR MyGoPro を用いて、37°C 1 時間インキュベートし、酵素を不活化するために 85°C・5 分間にて処理した。合成した cDNA は、90 μ L ddH₂O を加えて最終容量を 100 μ L にした。

microRNA の発現量の qPCR に用いた mixture 組成を Table 16 および Table 17 に示した。使用したプライマーは Table 18 に示した。反応温度条件は、まず 95°C、10 秒間変性させた後、95°C 5 秒間および 60°C 20 秒間の 2 ステップ PCR を 40 サイクル行うことにより逆転写反応を行った後、さらに、解離曲線解析を 95°C 60 秒、55°C・30 秒、95°C・30 秒の条件でおこなった。得られた Cq 値を Comparative $\Delta\Delta$ Cq 法を用いて定量した。

Table 14. Composition of mixture for telomere analysis

Components	Volume (μ l)
Primer stock solution	2
TB Green Premix Ex Taq II	10
Nuclease-free H ₂ O	7
Genome DNA	1
Total	20

Table 15. Composition of mixture for cDNA synthesis

Components	Volume (μ l)
mRQ Buffer (2x)	5
RNA sample (0.25–8 μ g)	3.75
mRQ Enzyme	1.25
Total	10 μ L

Table 16. Composition of mixture for microRNA34a qPCR Reaction

Components	Volume (μ l)
ddH ₂ O	9.3
TB Green Advantage Premix (2X)	12.5
ROX Dye (50X)	0.5
microRNA 34a primer (100 μ M)	0.2
mRQ 3' Primer (10 μ M)	0.5
cDNA	2
Total	25

Table 17. Composition of mixture for U6 qPCR Reaction

Components	Volume (μ l)
ddH ₂ O	9
TB Green Advantage Premix (2X)	12.5
ROX Dye (50X)	0.5
U6 Forward Primer (10 μ M)	0.5
U6 Reverse Primer (10 μ M)	0.5
cDNA	2
Total	25

Table 18. Primer sequences

Primer ID (Takara's code)	Primer sequence (5' - 3')	GC (%)	Tm	GenBank Accession No.
MA135860-F	CTTTGGCAGTGTCTT AGCTGGTTGT	48	9	NR_029751.1

結果

老齢マウスでは、皮膚真皮層の菲薄化および皮膚脂肪層の消失・脱毛が生じる。本実験に供試した 2 匹の 27 か月齢マウスは、共に重度の皮膚炎症を示していた (Figure 19-A)。さらに、膣スメアの検査において、27 か月齢マウスは、2 匹ともに常に角化細胞および有核細胞そして粘液や血球があり、観察した 12 日間の全てにおいて発情休止期にあると判断した (Figure 19-B)。さらに、過剰排卵処置後、採材した結果、卵管膨大部には排卵卵子はいずれもみられず、卵巢では、直径 1mm 程度に委縮していることが確認された (Figure 19-C)。また、卵巢の切片では、27 か月齢マウスは 724 枚の切片を観察して、胞状卵胞が 2 個、2 次卵胞が 2 個観察されたものの、卵巢組織の多くは組織の老化現象として知られる線維化生じており (Figure 19-D)、老齢マウスの生殖能は喪失していることが確認された。

続いて、樹立した 27 か月齢マウス由来線維芽細胞の核型は、100 区画確認していずれも 90%の核型正常率であった (Figure 20-A)。さらに、老化細胞では核の周辺に集積する SA- β -Gal 活性は、10 週齢マウスと比較して 27 か月齢マウス由来線維芽細胞では 2 個体とも高値を示した (Figure 20-B)。また、2 個体には SA- β -Gal 活性に個体差が生じていることが示された。SA- β -Gal 活性のより高い 27 か月齢マウス由来線維芽細胞と 10 週齢マウス由来線維芽細胞のテロメア長を解析した結果を Figure 20-C に示した。今回のテロメア長解析では、10 週齢マウスと比べて 27 か月齢マウスに差は認められなかった。さらに、microRNA34a の遺伝子発現を解析した結果、10 週齢マウスよりも 27 か月齢マウスは高発現であった (Figure 19-D)。

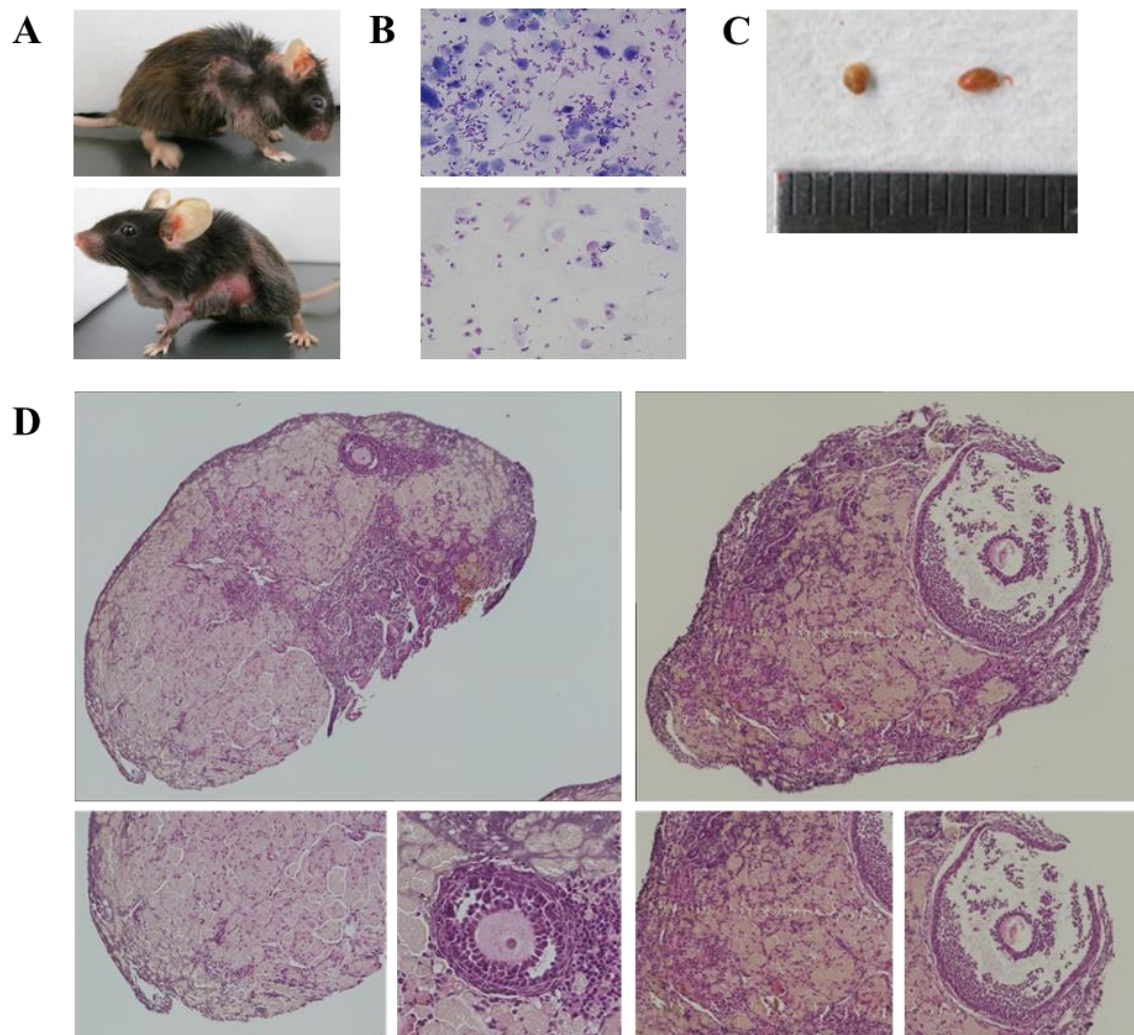


Figure 19. Characteristic of aged mice.

(A) 27 month- aged mice. (B) Images of vaginal smear. (C) Ovary of 27month-aged mice. (D) Hematoxylin-eosin staining images of ovary.

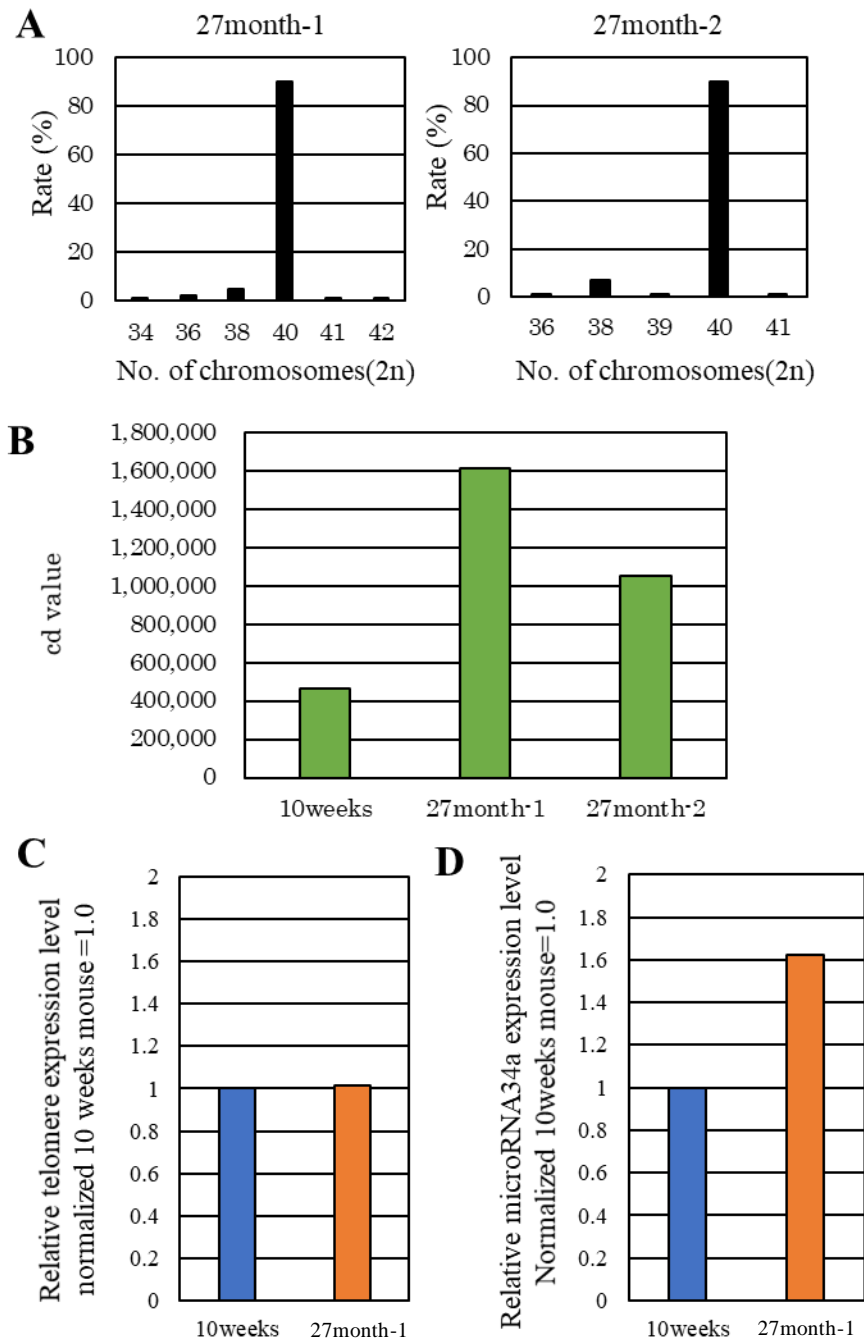


Figure 20. Comparison of 27 month-aged mice with 10 weeks-aged mice.

(A) Karyotype of 27 month-aged mice. (B) SA- β -Gal activity. (C) Telomere length. (D) Gene expression of microRNA34a.

考察

哺乳動物は、時間の経過に伴い老化するにつれて生殖能を失う。本実験に供試した 27 ヶ月齢マウスの生殖能は、生殖周期および過剰排卵処置を実施してもなお排卵卵子は得られないかつ卵巣内は線維化が進行しわずかな卵胞発育だけであることから、完全に失われていると判断した。

細胞は、分裂を繰り返すことによって不可逆的に細胞分裂を停止する。この細胞老化のマーカーとして用いられる SA- β -Gal は、27 ヶ月齢マウスの耳介組織から樹立した線維芽細胞において、10 週齢マウス由来線維芽細胞と比較して高値であった。しかし、SA- β -Gal 活性が高い 27 ヶ月齢マウス-1 由来線維芽細胞のテロメア長を検討した結果、10 週齢マウス由来線維芽細胞との差は検出されなかった。老化の原因の 1 つとして、細胞分裂に伴うテロメア長の短縮による細胞老化と組織構成細胞の増殖停止が考えられており、ヒトにおけるテロメア長が 12~15kbp に対して、マウスにおけるテロメア長は 25kb 以上を持っており、より長寿なヒトの新生児の組織と比較して 1.6~2 倍長いことが知られている(神森ら、2005)。さらに、テロメラーゼノックアウトマウスでは、第 1 世代目ではその表現型は観られないが、第 4 世代目以降のマウスにおいて生殖機能や造血機能を含む多数の組織においてテロメアの短縮が検出され、機能低下が認められている(Chang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1998)。ゆえに、本実験から加齢による初代培養細胞のテロメア長に与える影響は観られなかったことが考えられた。しかし、27 ヶ月齢マウス由来線維芽細胞における microRNA34a 遺伝子の発現は、10 週齢マウス由来線維芽細胞と比較して、高値を示し、細胞増殖およびテロメラーゼ活性の抑制による細胞老化が生じていることが示唆された。

第3節 老齡マウス由来初代培養細胞を用いた 核移植胚の発生能の検討

前節にて、老齡マウス由来初代培養細胞は、老化細胞の特徴を有していることが示された。本節では、10週齡マウス由来線維芽細胞をコントロールとして、老齡マウス由来線維芽細胞を用いた SCNT 胚の発生能を検討した。

材料および方法

1. 培養液の調製
2. 供試動物

以上の過程は、第3章第2節と同様に行った。

3. 耳介由来組織からの初代培養細胞の樹立

以上の過程は、第4章第2節と同様に行った。

4. 過剰排卵処理および未受精卵子の回収
5. マイクロマニピレーター用マイクロピペットの作製
6. 除核操作
7. HVJ-E の調製
8. 細胞融合操作
9. 活性化処理と発生能の観察
10. 統計学的解析

以上の過程は、第3章第2節と同様に行った。

結果

前節の結果から細胞老化の特徴を有することが示された老齢マウス由来線維芽細胞を用いて、除核卵子へ核移植を行い、得られた再構築胚の発生能を検証した。老齢マウス由来線維芽細胞および10週齢マウス由来線維芽細胞を用いて除核卵子へ得られた再構築卵子の2細胞期への発生をTable 17へ示した。細胞融合操作後、生存した卵子は、それぞれ117/120(98%)、109/117(93%)であった。細胞融合操作終了後、1時間経過した卵子は、61%(71/117)および69%(75/109)の卵子がPCCを形成しており、その内89%(63/71)および84%(63/75)が偽前核形成を確認した。その偽前核の形成を有した卵子は、27ヵ月齢マウス由来線維芽細胞を用いた場合では全ての卵子が2細胞期へ発生し、10週齢マウス由来線維芽細胞を用いて作製した偽前核卵子は、94%(59/63)の卵子が2細胞期へ発生した。これらの結果から、27ヵ月齢マウス由来線維芽細胞は、10週齢マウス由来線維芽細胞を用いた場合と比較して2細胞期胚への発生の差は認められなかった。

Table 18には、27ヵ月齢マウス由来線維芽細胞および10週齢マウス由来線維芽細胞を用いて作製した2細胞期胚の胚盤胞期への発生能を示した。胚盤胞期への発生能を比較すると、27ヵ月齢マウス由来線維芽細胞を用いて作製した2細胞期胚は、10週齢マウス由来線維芽細胞を用いた場合とほぼ同じ発生率を示した(27ヵ月齢: 67%(42/63)、10週齢: 69%(41/59))。このことは、27ヵ月齢マウス由来線維芽細胞は、SCNT後の胚発生に影響しないことが示唆された。

Table 17. produced of SCNT oocytes using fibroblast cells derived from 27 months-aged mouse and 10 weeks-aged mouse

Donor cells	No. of oocytes used	No. of oocytes fused	No. of oocytes showing premature chromosome condensation	No. of oocytes showing pronuclei formation (%)	No. of pronuclei-formed oocytes that developed to 2-cell embryos (%)
10week-aged	117	109	75 (69)	63 (84)	59 (94)
27month-aged	120	117	71 (61)	63 (89)	63 (100)

n=3

Table 18. Development of embryo from 27 months-aged mouse and 10 weeks-aged mouse.

Donor cells	No. of 2-cell embryos used	No. of 2-cell embryos developed to (%)		
		4-cell	Morula	Blastocyst
10week-aged	59	54 (92)	49 (83)	41 (69)
27month-aged	63	58 (92)	54 (86)	42 (67)

n=3

考察

Table 17 から示されるように、老齢マウス由来線維芽細胞を用いた場合の再構築卵子の作製率および 2 細胞期への発生率は、10 週齢マウス由来線維芽細胞を用いた場合とほとんど同じ値が示された。さらに、作製された胚盤胞期胚の発生率についても、Table 18 に示すように、10 週齢マウス由来線維芽細胞を用いた場合と比較して、差はみられなかった。先行論文において、25 ヶ月齢雌および 2 匹の 32 ヶ月齢雄の老齢マウス(B6D2F1, B6C3F1)から樹立した線維芽細胞を用いた場合の胚盤胞期への胚発生率は、活性化後に TSA 処理を行うことによって、それぞれ 15%(27/178)、22%(20/90)、18%(20/112)であることが示されている(Mizutani *et al.*, 2008)。d-BSA 存在下における TSA および VC の組み合わせ処理を用いた本実験系では、27 ヶ月齢マウス由来線維芽細胞を用いて作製した 2 細胞期胚は、先行論文と比較して胚盤胞期への十分な胚発生を持つことが示された。先行研究では、老齢由来細胞内において H3K9me3 の異常な修飾が確認されている。今後、10 週マウスと老齢マウス由来線維芽細胞から得られた 2 細胞期胚における H3K9me3 を比較することによって、老化細胞のリプログラミング機構について知見が得られると考えている。さらに、偽妊娠雌マウスへ移植検討することは、妊孕性を持たない老齢マウス由来初代培養細胞からの個体作製能を評価できると考えている。

第4節 小括

本章では、老齢動物からの遺伝資源保存を目的として、27 ヶ月齢の老齢マウスの耳介由来線維芽細胞を用いた SCNT 胚の発生能を検討した。

- (1) 老齢マウスは、発情周期を持たず、さらには過剰排卵処置による排卵も見られないことから生殖機能を喪失していると判断された。
- (2) 老齢マウス由来耳介組織から樹立した線維芽細胞は、核型は正常であるものの、老化の指標となる SA- β -Gal 活性および microRNA34A の発現が高いことが示された。
- (3) 老齢マウス由来耳介組織から樹立した線維芽細胞のテロメア長は、10 週齢マウスと差がみられなかった。
- (4) 老齢マウス由来耳介組織から樹立した線維芽細胞を用いて SCNT した結果、10 週齢マウス由来耳介組織から樹立した線維芽細胞を用いて作製した SCNT 胚と同様に、高い胚盤胞形成率を有することが示された。

以上のことから、生殖能力を失っている老齢マウスから樹立した線維芽細胞は、老化の特徴として SA- β -Gal 活性および microRNA34a の発現を有するものの、SCNT により高率に再構築胚盤胞の作製が可能であることが示された。

第5章 総括

マウス卵子を用いた SCNT 技術は、多くの研究に利用されているが、この技術を直接的に研究に活かした実用化レベルの実験は報告例がほとんどない。その原因は、依然として SCNT 技術の低効率や異常な遺伝子発現を示すことに由来すると考える。本研究では、効率的かつ簡易化した SCNT 法を詳細に公開することを目的として、再構築胚の活性化培地への TSA および VC の組み合わせ処理が胚発生に与える効果を再検討した。さらに、この SCNT 技術を野生動物の遺伝資源保全へ応用して、アカネズミーマウス異種間核移植胚の発生能に関する新しい知見を得ることを目的として、アカネズミーマウス異種間核移植由来の 2 細胞期胚内におけるヒストン修飾およびアカネズミドナー細胞の VC 含有培地での前処理が核移植後の胚発生に与える効果について検討した。さらに、老齢個体からの遺伝資源保全に向けた老化とリプログラミングの関係性を検討する一助として、27 ヶ月齢マウス由来線維芽細胞の老化状態の評価および核移植後の胚発生能への影響について検討した。

第2章 HVJ-Envelope, Trichostatin A および Vitamin C の 組み合わせによる体細胞核移植技術の改善

マウス SCNT 技術の簡易化を図るために、膜融合能を有する HVJ-E を用いてドナー細胞と除核卵子の細胞融合を行うことにより作製した再構築卵子への TSA および VC の組み合わせ添加がその後の胚発生に与える効果について検討した。また、本 SCNT 法により作製した卵丘細胞由来再構築 2 細胞期胚を偽妊娠雌マウスの卵管へ胚移植を行い、産子への発生について検討した。

- (1) HVJ-E を用いた細胞融合法による SCNT は、非常に高い融合率を示した。

(2) 卵丘細胞および胎子由来線維芽細胞を用いて作製された再構築胚は、活性化処理後、TSA および VC 処理を加えたことによって胚発生能の改善が示された。さらに、卵丘細胞を用いて作製した再構築 2 細胞期胚を偽妊娠雌へ移植し、従来の SCNT 法に比べ高率にクローン産子の作出に成功した。これらのことから、マウス SCNT 法の簡易化および活性化処理における TSA および VC 添加によって SCNT 胚の胚盤胞期への発生率および産子作出効率の改善が認められた。この成果は、ビデオによる詳細なプロトコールとして発信し、核のリプログラミングに関する基礎研究やこの技術を応用した野生動物への適用を含めて、実用化レベルで利用できる SCNT 技術の開発の基盤となることが期待される。

第 3 章 アカネズミーマウス異種間核移植胚の発生能の検討

第 2 章に示した SCNT 技術を野生動物の遺伝資源保全へ応用して、アカネズミーマウス iSCNT 胚の発生能について検討した。アカネズミーマウス iSCNT 由来の 2 細胞期胚内におけるヒストン修飾および胚発生能を調べ、さらにドナー細胞の卵細胞質内曝露時間が発生能に与える効果を検討した。さらに、iSCNT へ供試するアカネズミドナー細胞への VC 添加がヒストン H3K9me3 へ与える効果および核移植後の胚発生について検討した。

(1) アカネズミ尾部組織由来の細胞をマウス除核卵子と細胞融合させることによってアカネズミーマウス iSCNT 胚を作製した。TSA および VC 処理に関わらず、iSCNT 胚は、2 細胞期への十分な発生能を有した。さらに、わずかではあるが TSA および VC 処理区において 4 細胞期および胚盤胞期への発生を確認した。また、再構築した 2 細胞期胚内では、TSA および VC 処理によって遺伝子発現抑制型に働く H3K9me3 レベルの低下が示された。一方で、遺伝子発現活性型に働く H3K4me3 レベルについて TSA および VC 未処理区と比較したところ、同程度であることが示された。

- (2) アカネズミドナー細胞を移植後、卵細胞質内環境に 3 時間曝露することは、従来、リプログラミング効果を增強と言われていたが、1 時間曝露区と比較してわずかな発生率の増加がみられたのみで、今回の iSCNT 杯では明瞭な改善効果は得られなかった。
- (3) アカネズミドナー細胞を iSCNT へ供試する前に VC 含有培地で培養することにより、ドナー細胞の H3K9me3 レベルを SCNT 前に低下させることができた。処理濃度および処理時間は、25 μ g/mL・72 時間の処理が H3K9me3 のレベルを最も低下させた。しかしながら、H3K9me3 を低レベル化したアカネズミドナー細胞を用いて iSCNT を行った結果、4 細胞期以降への発生を改善するには至らなかった。

これらのことより、アカネズミマウス iSCNT 胚は、活性化処理後に dBSA 存在下における TSA および VC 処理によって 4 細胞期への発生能に加え、一部の胚は胚盤胞期へ進行することが示された。発生能を改善するために、活性化処理前のアカネズミドナー細胞をマウス卵細胞内において 3 時間曝露することおよび VC 処理を行ったが、明瞭な効果は得られなかった。TSA および VC 処理は、iSCNT 胚においても H3K9me3 の低下を促すものの、2 細胞期における発生停止が依然として多くみられることから、H3K9me3 の低下だけでは発生能は達成されないことが判った。TSA および VC 処理により作製された iSCNT 胚内におけるリプログラミングに関するヒストン修飾について包括的にアプローチすることによって発生能は改善されるかもしれない。今回の実験は、アカネズミドナー細胞を用いた iSCNT に関する初めての報告であり、他の哺乳類の iSCNT の技術改良のための重要な知見が提供された。

第 4 章 老齢マウス由来体細胞クローン胚の発生能の検討

老齢個体からの遺伝資源保全を最終目標として、老化とリプログラミングの関係

性について検討した。まず、27 ヶ月間飼育した老齢マウスの生殖機能について検討した。さらに耳介組織から樹立した細胞の老化状態を 10 週齢マウスの耳介組織から樹立した細胞と比較し老化を評価した後、27 ヶ月齢由来細胞を用いることによる核移植後の胚発生能に与える影響について検討した。

- (1) 27 ヶ月齢マウスでは、発情周期は常に発情休止期にあることが判った。さらに、過剰排卵処置を施しても、排卵卵子は得られず、卵巣内にも 1 個体あたり 2 個の卵胞形成を認めるのみであった。このことから 27 ヶ月齢マウスは生殖機能を喪失していると判断した。
- (2) 27 ヶ月齢マウスの耳介組織から樹立した細胞は、核型解析では正常であった。さらに、細胞老化マーカーの SA- β -Gal 活性が 10 週齢マウスの耳介由来細胞と比較して高値を示した。テロメア長は 10 週齢マウスの耳介由来細胞と比較してほぼ同等であったが、テロメラーゼの活性に影響を与える microRNA34a の遺伝子発現は 10 週齢マウスの耳介由来細胞と比較して高値を示した。このことから、27 ヶ月齢マウスの耳介由来細胞が細胞老化状態にあることが示唆された。
- (3) 27 ヶ月齢マウスの耳介由来細胞を用いて TSA および VC 処理の組み合わせによる SCNT を検討した。再構築卵子の胚盤胞期への発生率は、10 週齢マウスの耳介由来細胞と比較してほぼ同率であり、このことは、細胞老化状態は移植後の胚発生能に影響は与えないことを示唆した。

これらのことから、老齢マウスは、生殖能力を喪失し、次世代を残すことは難しい状況にあるが、ドナー細胞は細胞老化の特徴を有するものの、初期胚発生におけるリプログラミングには影響はないことが示唆され、老齢個体であっても遺伝資源の保全を目的として、細胞を保存することは有効であることが示唆された。

マウスを用いた体細胞核移植は、従来、極めて難しい手技を必要としてきた。しかし、SCNT は、核のリプログラミング研究のみならず、核と細胞質の関係を調査

するうえでも有効なツールであり、SCNT の工程の改善や発生のメカニズムを検討することにより、汎用性のある技術へと改善することが望まれる。SCNT の利用は基礎生物学から医学までの幅広い領域に大きく貢献することが期待される。

参考文献

Akagi S, Matsukawa K, Takahashi S. 2014. Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *J Reprod Dev.* 60: 329-335.

Azuma R, Miyamoto K, Oikawa M, Yamada M, Anzai M. 2018. Combinational treatment of trichostatin A and vitamin C improves the efficiency of cloning mice by somatic cell nuclear transfer. *J Vis Exp.* 134: 57036.

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol.* 17: 456-461.

Beyhan Z, Iager AE, Cibelli JB. 2007. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell.* 1: 502-512.

Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, McLaughlin KJ. 2002. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16: 1209-1219.

Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Park KK, Kim JH, Thuan NV, Wakayama T. 2010. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biol Reprod.* 83: 454-463.

Chang S. 2005. Modeling aging and cancer in the telomerase knockout mouse. *Mutat Res.* 576: 39-53.

Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J, Liang H, Chen Y, Chen J, Wu Y. 2013. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet.* 45: 34-42.

Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol.* 20: 366-369.

Choi JK, He X. 2015. Improved Oocyte Isolation and Embryonic Development of Outbred Deer Mice. *Sci Rep.* 5: 12232

Dahl JA, Jung I, Aanes H, Greggains GD, Manaf A, Lerdrup M, Li G, Kuan S, Li B, Lee AY, Preissl S, Jermstad I, Haugen MH, Suganthan R, Bjørås M, Hansen K, Dalen KT, Fedorcsak P, Ren B, Klungland A. 2016. Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. *Nature.* 537: 548-552.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 9363–9367.

Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM, Yanagimachi R, Jaenisch R. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 6209-6214.

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 AS, Vignon X. 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*. 71: 1026-1034.

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.

Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL. 2004. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*. 6: 247-58.

Gómez MC, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lyons LA, Ruhe M, Dumas C, Lyons J, López M, Dresser BL, Reiser J. 2008. Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells*. 10: 469-83.

Gómez MC, Biancardi MN, Jenkins JA, Dumas C, Galiguis J, Wang G, Earle Pope C. 2012. Scriptaid and 5-aza-2'-deoxycytidine enhanced expression of pluripotent genes and in vitro developmental competence in interspecies black-footed cat cloned embryos. *Reprod Domest Anim*. 47: 130-135.

Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. 2010. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science*. 330: 496-499.

Isaji Y, Yoshida K, Imai H, Yamada M. 2015. An intracytoplasmic injection of deionized bovine serum albumin immediately after somatic cell nuclear transfer enhances full-term development of cloned mouse embryos. *J Reprod Dev.* 61: 503–510.

Kaminuma O, Katayama K, Inoue K, Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Shimo Y, Tofukuji S, Ishida S, Ogonuki N, Kamimura S, Oikawa M, Katoh S, Mori A, Shichijo M, Hiroi T, Ogura A. Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific CD4+ T cells. *EMBO Rep.* 18: 885-893.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science.* 282: 2095-2098.

Kawagoshi T, Shiomi N, Takahashi H, Watanabe Y, Fuma S, Doi K, Kawaguchi I, Aoki M, Kubota M, Furuhashi Y, Shigemura Y, Mizoguchi M, Yamada F, Tomozawa M, Sakamoto SH, Yoshida S, Kubota Y. 2017. Chromosomal aberrations in large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*) captured near Fukushima Dai-ichi nuclear power plant. *Environ. Sci. Technol.* 51: 4632-4641.

Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. 2006. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun.* 340: 183-189.

Kishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Bui HT, Balbach S, Ogura A, Boiani M, Wakayama T. 2006. Production of cloned mice by somatic cell

nuclear transfer. Nat Protoc. 1: 125-138.

Kishigami S, Bui HT, Wakayama S, Tokunaga K, Van Thuan N, Hikichi T, Mizutani E, Ohta H, Suetsugu R, Sata T, Wakayama T. 2007. Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. J Reprod Dev. 53: 165-170.

Lagutina I, Fulka H, Brevini TA, Antonini S, Brunetti D, Colleoni S, Gandolfi F, Lazzari G, Fulka J Jr, Galli C. 2010. Development, embryonic genome activity and mitochondrial characteristics of bovine-pig inter-family nuclear transfer embryos. Reproduction. 140: 273-285.

Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. Cloning. 2: 79-90.

Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. Nature. 436: 604.

Lee Chong, Ahearn EL, Cimmino L. 2019. Reprogramming the epigenome with vitamin C. Front. Cell Dev. Biol. 7: 128.

Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. 1998. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. Nature. 392: 569-574.

Lee MJ, Kim SW, Lee HG, Im GS, Yang BC, Kim NH, Kim DH. 2011. Trichostatin A promotes the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J Reprod Dev.* 57: 34-42.

Li XP, Kato Y, Tsuji Y, Tsunoda Y. 2008. The effect of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development related genes in cloned blastocysts. *Cloning Stem Cells.* 10: 133-142.

Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF. 2006. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol.* 293: 439-448.

Liu W, Liu X, Wang C, Gao Y, Gao R, Kou X, Zhao Y, Li J, Wu Y, Xiu W, Wang S, Yin J, Liu W, Cai T, Wang H, Zhang Y, Gao S. 2016. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov.* 2: 16010.

Liu X, Wang Y, Gao Y, Su J, Zhang J, Xing X, Zhou C, Yao K, An Q, Zhang Y. 2018. H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming. *Development.* 145: 1-12.

Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, Zhang X, Lu Y, Wang Z, Poo M, Sun Q. 2018. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell.* 172: 881-887.

Miyamoto K, Tajima Y, Yoshida K, Oikawa M, Azuma R, Allen GE, Tsujikawa T,

Tsukaguchi T, Bradshaw CR, Jullien J, Yamagata K, Matsumoto K, Anzai M, Imai H, Gurdon JB, Yamada M. 2017. Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. *Biol Open*. 6: 415-424.

Matoba S, Inoue K, Kohda K, Sugimimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, Ogura A. 2011. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: 20621-20626.

Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, Zhang Y. 2014. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*. 159: 884-895.

Matsushima Y. 2012. Japanese wild mice: A rich resource for new disease models. *Exp. Anim*. 61: 25-33.

McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*. 15: e4389.

Meguro K, Komatsu K, Ohdaira T, Nakagata N, Nakata A, Fukumoto M, Miura T, Yamashiro H. 2019. Induction of superovulation using inhibin antiserum and competence of embryo development in wild large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*). *Reprod Domest Anim*. 54: 1637-1642.

Mizutani E, Ono T, Li C, Maki-Suetsugu R, Wakayama T. 2008. Propagation of

senescent mice using nuclear transfer embryonic stem cell lines. *Genesis*. 46: 478-83.

Mizutani E, Torikai K, Wakayama S, Nagatomo H, Ohinata Y, Kishigami S, Wakayama T. 2016. Generation of cloned mice and nuclear transfer embryonic stem cell lines from urine-derived cells. *Sci Rep*. 6: 23808.

Nakata K, Saitoh T, Iwasa M. A., Fukui D, Saitoh T, eds. 2015. *Apodemus spesciosus* (Temminck, 1844): The wild mammals of Japan. 2nd edition. Shoukadoh. pp. 175-177.

Ogura A, Inoue K, Takano K, Wakayama T, Yanagimachi R. 2000. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Mol Reprod Dev*. 57: 55-59.

Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi A, Takano K, Nagano R, Suzuki O, Lee J, Ishino F, Matsuda J. 2000. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*. 62: 1579-1584.

Ogura A, Inoue K, Wakayama T. 2013. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368: 20110329.

Oh HJ, Kim MK, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Park K, Park C, Sohn SH, Kim DY, Shin NS, Lee BC. 2008. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology*. 70: 638-647.

Okano T, Onuma M, Ishiniwa H, Azuma N, Tamaoki M, Nakajima N, Shindo J, Yokohata Y. 2015. Classification of the spermatogenic cycle, seasonal changes of seminiferous tubule morphology and estimation of the breeding season of the large

Japanese field mouse (*Apodemus speciosus*) in Toyama and Aomori prefectures, Japan. J Vet Med Sci. 77: 799-807.

Okano T, Ishiniwa H, Onuma M, Shindo J, Yokohata Y, Tamaoki M. 2016. Effects of environmental radiation on testes and spermatogenesis in wild large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*) from Fukushima. Sci, Rep. 6: 23601.

Ono Y, Shimozawa N, Ito M, Kono T. 2001. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. Biol Reprod. 64: 44-50.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature. 407: 86-90.

Rodriguez-Osorio N, Urrego R, Cibelli JB, Eilertsen K, Memili E. 2012. Reprogramming mammalian somatic cells. Theriogenology. 78: 1869-1886.

Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. 2006. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. Biol Reprod. 74: 1083-1089.

Serizawa K, Suzuki H, Tsuchiya K. 2000. A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. Biochem Genetics. 38: 27-40.

Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q. 2007. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. Biol Reprod. 77: 285–291.

Shintaku Y, Kageyama M, Motokawa M. 2010. Differential growth patterns in two seasonal cohorts of the large Japanese field mouse *Apodemus speciosus*. *J. Mamm.* 91: 1168–1177.

Tamashiro KL, Wakayama T, Blanchard RJ, Blanchard DC, Yanagimachi R. 2000. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol Reprod.* 63: 328-334.

Terashita Y, Wakayama S, Yamagata K, Li C, Sato E, Wakayama T. 2012. Latrunculin A can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. *Biol Reprod.* 86: 180.

Wang K, Otu HH, Chen Y, Lee Y, Latham K, Cibelli JB. 2011. Reprogrammed transcriptome in rhesus-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos. *PLoS One.* 6: e22197.

Wani NA, Wernery U, Hassan FA, Wernery R, Skidmore JA. 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 82: 373-379.

Wakayama S, Suetsugu R, Thuan NV, Ohta H, Kishigami S, Wakayama T. 2007. Establishment of mouse embryonic stem cell lines from somatic cell nuclei by nuclear transfer into aged, fertilization-failure mouse oocytes. *Curr Biol.* 17: R120-R121.

Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.*

394: 369-74.

Wakayama T, Yanagimachi R. 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cell. *Nat Genet.* 22: 127-128.

Wakayama T, Yanagimachi R. 2001. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction.* 122: 49-60.

Wakayama T, Rodriguez I, Perry A.C, Yanagimachi R, Mombaerts P. 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 14984-14989.

Wani NA, Vettical BS, Hong SB. 2017. First cloned Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) calf produced by interspecies somatic cell nuclear transfer: A step towards preserving the critically endangered wild bactrian camels. *PLoS One.* 12: e0177800.

Wang C, Liu X, Gao Y, Yang L, Li C, Liu W, Chen C, Kou X, Zhao Y, Chen J, Wang Y, Le R, Wang H, Duan T, Zhang Y, Gao S. 2018. Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat Cell Biol.* 20: 620-631.

Wang K, Otu HH, Chen Y, Lee Y, Latham K, Cibelli JB. 2011. Reprogrammed transcriptome in rhesus-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos. *PLoS One.* 26: e22197.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385: 810–813.

Wittayarat M, Sato Y, Do LT, Chatdarong K, Tharasanit T, Techakumphu M, Taniguchi M, Otoi T. 2017. Epigenetic modulation on cat-cow interspecies somatic cell nuclear transfer embryos by treatment with trichostatin A. *Anim Sci J.* **88**: 593-601.

Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science.* 301: 1063.

Yamagata K, Nagai K, Miyamoto H, Anzai M, Kato H, Miyamoto K, Kurosaka S, Azuma R, Kolodeznikov II, Protopopov AV, Plotnikov VV, Kobayashi H, Kawahara-Miki R, Kono T, Uchida M, Shibata Y, Handa T, Kimura H, Hosoi Y, Mitani T, Matsumoto K, Iritani A. 2019. Signs of biological activities of 28,000-year-old mammoth nuclei in mouse oocytes visualized by live-cell imaging. *Sci Rep.* 9: 4050.

Yelisetti UM, Komjeti S, Katari VC, Sisinthy S, Brahmasani SR. 2016. Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected postmortem as donor cells and rabbit oocytes as recipients. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **52**: 632-645.

Yin XJ, Lee HS, Lee YH, Seo YI, Jeon SJ, Choi EG, Cho SJ, Cho SG, Min W, Kang SK, Hwang WS, Kong IK. 2005. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction.* **129**: 245-9.

Zhai Y, Li W, Zhang Z, Cao Y, Wang Z, Zhang S, Li Z. 2018. Epigenetic states of donor cells significantly affect the development of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos in pigs. *Mol Reprod Dev.* **85**: 26-37.

Zhang Y, Wang Q, Liu K, Gao E, Guan H, Hou J. 2018. Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology*. 70: 1469-1477.

Zhang Y, Gao E, Guan H, Wang Q, Zhang S, Liu K, Yan F, Tian H, Shan D, Xu H, Hou J. 2019. Vitamin C treatment of embryos, but not donor cells, improves the cloned embryonic development in sheep. *Reprod Domest Anim*. 00: 1-11

Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*. 302: 1179.

Zuo Y, Gao Y, Su G, Bai C, Wei Z, Liu K, Li Q, Bou S1, Li G. 2014. Irregular transcriptome reprogramming probably causes the developmental failure of embryos produced by interspecies somatic cell nuclear transfer between the Przewalski's gazelle and the bovine. *BMC Genomics*. 15: 1113.

Zuo Y, Su G, Cheng L, Liu K, Feng Y, Wei Z, Bai C, Cao G, Li G. 2017. Coexpression analysis identifies nuclear reprogramming barriers of somatic cell nuclear transfer embryos. 2017; 8: 65847-65859.

Nguyen VT, Bui HT, 若山 照彦. 2006. 核移植の現状と将来：クローン技術と ES 細胞. 蛋白質 核酸 酵素. 51: 1768-1774.

青木 不学、秋山 智彦. 2007. 卵形成・初期発生過程におけるゲノム再プログラム化と

ヒストン修飾・ヒストン変異体置換. 蛋白質 核酸 酵素. 52: 2170-2176.

東 純哉、家串 和真、岩林 正明、谷山 義明、森下 竜一. 2013. 老化と MicroRNA. 日老医誌. 50: 9-15.

安達(玉盛) 三美、岡崎 具樹、Jill A. Kreiling、John M. Sedivy. 2013. 個体でみられる細胞老化. 実験医学. 31: 155-162.

安齋 政幸、村井 仁志、宮下 実、岸 昌生、中家 雅隆、西村 愛美、杉本 奈央、松崎 ひかる、東 里香、三谷 匡、加藤 博己、細井 美彦. 2014. 野生マウス由来線維芽細胞の樹立による遺伝資源保存後術の一例. 近畿大学先端技術総合研究所紀要. 19: 13-24.

大石 孝雄. 1996. 動物遺伝資源を巡る現状とその問題点. 日本畜産学会報. 67: 805-816.

大沼 学、水野 恵理子、中島 友紀、田島 淳史. 2013. 絶滅危惧種の培養細胞および遺伝子資源凍結保存とそれらを活用した基礎研究について(動物園との連携事例紹介). 日本野生動物医学会誌. 18: 7-10.

神森 眞、仲村 賢一、田久保 海誉. 2005. テロメア変化から老化を探る(話題,<特集>高齢者医療:薬学からのアプローチ). ファルマシア. 41: 949-954.

小池 裕子、松井 正文. 2007. 保全遺伝学. 東京大学出版会. pp. 70.

酒井 悠輔、坂本 信介、加藤 悟郎、岩本直治郎、尾崎 良介、江藤 毅、篠原 明男、森田 哲夫、越本 知大. 2013. アカネズミ (*Apodemus speciosus*) の自然交配によ

る繁殖を誘導できる飼育交配手法. 哺乳類科学. 53: 57-65.

立石 隆. 2007. 尾瀬地域におけるアカネズミの繁殖活動. 哺乳類科学. 47: 215-220.

樋口 広芳. 1996. 保全生物学. 東京大学出版会. pp. 191-192.

目加田 英輔. 1980. センダイウイルス(HVJ)による細胞融合 その細胞工学, 細胞膜研究への応用. 膜(MEMBRANE). 5: 281-292.

本川 雅治. 2016. 日本のネズミ. 東京大学出版会. pp. 27-31.

謝辞

稿の終りにあたり、本研究に終始暖かい御支援と御教示を賜った、近畿大学大学院生物理工学研究科 教授 松本 和也 博士に心から感謝の意を表します。

また、本研究を進めるにあたり、有意義な御指導と御助言をいただいた、近畿大学先端技術総合研究所 准教授 安齋 政幸 博士に深く感謝いたします。

さらに、本研究を行うにあたり、御指導と御助言をいただいた近畿大学大学院生物理工学研究科 教授 細井 美彦 博士、同教授 三谷 匡 博士、同教授 大和 勝幸 博士、同教授 宮本 裕史 博士、同准教授 山縣 一夫 博士、同講師 宮本 圭 博士、近畿大学先端技術総合研究所 教授 加藤 博己 博士、同講師 黒坂 哲 博士、に感謝の意を表します。

異種間核移植実験におきましては、貴重なアカネズミの御提供と多くのご支援をいただいた富山市ファミリーパーク 村井 仁志 氏、宇部市ときわ動物園 園長 宮下 実 博士に感謝いたします。また、貴重な老齢マウスの御提供と御助言をいただいた東京都健康長寿医療センター実験動物施設 野田 義博 研究員に深くお礼申し上げます。

学術論文執筆にあたり、上村 Backes 尚美 先生、James Horvat 先生には、懇切丁寧なご指導とご支援をいただきました。心から感謝いたします。

そして、本実験を行うにあたり、数々のご助言とご協力をいただいた本研究科卒業生 申 承旭 博士、畑中 勇輝 博士、守田 昂太郎 博士、樋口 智香 博士、分子発生工学研究室研究員 池上 春香 氏に心から感謝いたします。また、多くの御協力と日々のご支援をいただいた発生遺伝子工学研究室および分子発生工学研究室の諸氏に心から感謝いたします。

最後に、私の研究に協力してくださった全ての方々にお礼を申し上げるとともに、博士課程に進学する機会を与えてくださり、あらゆる場面で私をあたたく見守り、いつも応援し、支えてくれた両親と兄、友人に心から感謝申し上げます。