

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19332

研究課題名（和文）ユニバーサル卵子の構築に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research on construction of universal egg

研究代表者

加藤 容子（kato, yoko）

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40278742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の最終目的はユニバーサルな卵細胞質を構築することである。種を超えて体細胞核を初期化する人工的な卵細胞質を作り出すことができれば、優良家畜の育種・増産や異種間核移植が必要な希少動物種の再生・複製に大きく貢献する。本研究では、複数の動物種において卵細胞質ならびに体細胞におけるミトコンドリア量の制御を行うことができた。また、効率のよい核移植実験系を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵子の初期化能力の増強は、ヒト生殖補助医療分野にも貢献する。卵細胞質が持つ体細胞核の初期化機構と全能性誘導機構は、エピジェネティクス修正の関与が大きな鍵となっていることは明らかであるが、全体像についてはほとんど解明されていない。そのため、本研究を実施する過程において卵細胞質が持つ初期化機構の全体像を知る一端になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The final goal of this study is to construct a universal egg cytoplasm. The ability to create an artificial egg cytoplasm that initializes somatic cell nuclei across species greatly contributes to breeding, increasing production of excellent livestock and reproduction, replication of rare animal species that require interspecific nuclear transfer. In this study, we were able to control mitochondrial abundance in oocyte and somatic cells in multiple animal species. In addition, we were able to construct an efficient nuclear transfer experimental system.

研究分野：動物発生工学

キーワード：卵子 初期化 ユニバーサル卵子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の体細胞核移植は、1997年に成体ヒツジの細胞を用いて成功後、20年近く経過しているにもかかわらず、正常産子を生み出す成功率は低いままで維持されており、核移植時に生じる体細胞核の初期化機構についてはほとんど解明されていない。特に家畜では体細胞核移植後に受胎した母体に異常を生じさせたり、誕生した産子に異常が生じたりしたこともあり、体細胞核移植技術は、家畜生産には使用されていないが、一方で、希少動物の複製に貢献する技術である。しかしながら、体細胞核移植を実施するためには、ドナー細胞と同種の卵子を多く必要とし、また、胚移植のための受胎雌が必要であるが、希少動物種などではそれが実質不可能である。そのため、希少動物種のドナー細胞を近縁種の卵子へ移植する、いわゆる異種間での核移植を成功させる必要があるが、同種間の核移植よりもさらに成功率は低く、発生率改善の目処は立たない。

その理由の一つにドナー細胞核とレシピエント卵細胞質との不適合により、ドナー細胞核が異種卵子の中で転写複製阻害を受けてしまうことや初期発生を経ても通常は除外されるドナー細胞の細胞小器官の残渣が、後の発生に悪影響を及ぼしていることが示唆されている。そのため、動物種を問わずに体細胞核を初期化して発生を促すようなユニバーサルな人工卵子が構築できれば、その有用性は高いと思われる。すなわち、希少動物種の複製に用いるレシピエント卵細胞質としての利用ばかりでなく、将来はヒトの生殖補助医療や再生医療へも応用できると考えられる。

また、そのようなユニバーサル卵子を構築する過程においては、同種核移植においても未だ十分に解明されていない「細胞核の初期化機構 (totipotency誘導機構)」に関して、新たな視点からの情報が得られると期待でき、体細胞からES細胞を樹立する場合等に利用できる同種体細胞核移植卵の発生能向上にも貢献できると考えられる。初期化機構の解明に関する研究が進むiPS細胞では、DNAメチル化やヒストン修飾の変化といったエピゲノム修飾が初期化の過程で変化していることが次々と明らかになってきているが、iPS細胞における体細胞の初期化はpluripotencyの誘導であり、totipotencyを唯一誘導できる卵細胞質で生じる初期化と共通項目も多いものの、卵子特有の全く未知な部分も未だ多く残されていると考えられる。細胞サイズが小さいこともあり情報量が決して多くない卵子の初期化機構 (totipotency誘導機構) が明らかになれば、ヒト再生医療で実際に応用されているiPS細胞を用いた再生医療研究にも還元できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、体細胞核移植において種を問わず体細胞核を初期化できるユニークなユニバーサル人工卵細胞質を構築することを最終目的として基本的な検討を実施した。種を超えて体細胞核を初期化する (totipotencyを誘導することができる) ユニバーサルな人工レシピエント卵細胞質を作り出すことができれば、同種間核移植である優良家畜の育種・増産へ応用することもでき、さらに、同種間での体細胞核移植が困難で異種間核移植が必要な希少動物種の再生・複製にも大きく貢献すると考えられる。

卵細胞質が持つ体細胞核の初期化機構 (totipotency誘導機構) は、エピジェネティクスの修正の関与が大きな鍵となっていることは明らかであるが、全体像についてはほとんど解明されていない。そのため、本研究を実施することによって、種を超えて体細胞核を初期化できる卵子特有の初期化過程 (totipotency誘導機構) や、また、種による初期化機構 (totipotency誘導機構) の差異を知ることができれば、卵細胞質が持つ独自の初期化機構 (totipotency誘導機構) の全体像を知る一端になると考えられる。さらに、その研究の過程で得られる知見により、ヒトの生殖補助医療に必要な、クオリティが高くない卵子の発生能を向上させる技術や多能性幹細胞を用

いた再生医療などの医療分野へも応用できる。すなわち、老化卵子を蘇らせる手法開発（初期化強化）や医療現場で利用されることの多いクオリティが高くない卵子の有効利用や能力の高いiPS細胞を作出したり、iPS細胞の作出効率を向上させる手法へも応用できると考えられる。

そこで、本実験ではこれらの最終目的を目指し基本的な検討から取り組んだ。まず、卵細胞質内や体細胞内に存在する細胞小器官が制御できないか検討した。たとえば、細胞小器官のうちミトコンドリアにおいてはヘテロプラズミーやホモプラズミー状態の細胞を生存しながら維持させる手法の開発や卵子から細胞小器官を減少させて生存させる手法の検討、核移植をより簡便に実施する手法の開発等を試み、最終的な目的であるユニバーサル卵子の構築に結びつけられるか検討した。

3. 研究の方法

マウスと家畜のGV期卵を回収し、より効率の良い体外成熟培養系を確立するとともに、体外成熟培養培地に各種の細胞小器官阻害剤を添加してGV期卵のMII期への成熟率や処理後の卵子の特性を検討した。体外成熟培養時に各種酸化防止剤等を添加し生存性を向上させる試みを行った。GV期卵は顆粒層細胞が密に付着したものを選別し、家畜では24～48時間の成熟培養時間のうち、処理する時間帯の影響を検討するとともに、各種薬剤の濃度検討を実施した。マウスでは約12～24時間の成熟培養時間に各種酸化防止剤を添加し生存性を向上させる試みを行った。また各種細胞小器官阻害剤を様々な濃度で添加し、その後の体外成熟能や体外発生能ならびに卵子の特性や生存性を詳細に検討した。同様に数種類の体細胞を用い、培養中に各種阻害剤を添加して細胞増殖能を検討した。また、細胞核にあるDNAの立体構造を維持させたり変化させる酵素等、すなわちDNAの螺旋構造を2本切断して結合させ、DNAの複製のために一度らせんを解消する働きをもつ酵素の阻害剤を用いて、第一減数分裂進行時の核と細胞質の動態を検討し、より安定性があり容易な核移植法の検討をおこなった。

4. 研究成果

成体マウスと家畜の卵子サンプルを用いてまず体外成熟培養を向上させるため各種酸化防止剤の影響を検討した。その結果、いくつかの酸化防止剤を体外培養液に添加すると、卵子の体外成熟率が向上することがわかった。ならびに、成熟卵に単為発生を付与した後の胚盤胞への体外発生能も向上し、今後の検討を行う上で有用な結果が得られた。体細胞と成熟卵のミトコンドリア量をなるべく容易に化学的に制御する手法を検討し、まずはいくつかのミトコンドリア代謝阻害剤やDNA複製阻害剤を用いて至適条件の設定を試みた。体細胞を用いた検討では、7日間でミトコンドリア量を減少させる手法ができたが、同時に生存率も低下したため、培養条件の詳細を検討する必要がある。今後はより生存性を安定させつつ向上させる検討を行う必要性が残されたと考えられる。

成体成熟卵では10nM～100μMのDNA複製阻害剤や脱共役剤で処理すると、濃度依存的に家畜、マウスいずれの卵子においても、共に体外成熟率が低下したものの、ミトコンドリア量が減少した成熟卵を得ることができた。体外発生能や生存性への影響もみられる可能性があるため、今後は消去（減少）した細胞小器官を補完するような体外培養条件をより厳密に検討する必要があると考えられる。これまでのところ、細胞の生存性をできる限り損なわずにミトコンドリア量を制御するいくつかの薬剤処理法がみつき、現在も重ねて詳細を検討しているところである。

細胞核にあるDNAの立体構造を維持させたり変化させる酵素に対する阻害剤を用いた検討、すなわちDNAの螺旋構造を2本とも切断して結合しDNAの複製のために一度らせんを解消する

働きをもつ酵素の阻害剤をいくつか選び出して用い、未成熟卵を様々なタイミングで様々な濃度で処理し、減数分裂時の核と細胞質の動態を検討したところ、いくつかの阻害剤では、阻害剤の濃度依存的に減数分裂時に全ての核が第1極体として放出されることが明らかになったが、至適条件がクリアでなく不安定であり、より厳密な諸条件の検討が必要であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----