

用いて検討している。まず、第1節では最も重大な危険因子である高血圧症との関連性について疫学的に解析している。ロジスティック回帰分析の結果、統計的に有意な関連性を認め、歯周病罹患群は、健康者群に比較して2.60倍の確率で高血圧症に罹患することを明らかにしている。また、血圧値が基準値範囲にある対象者に、血圧値と唾液潜血量との相関関係について喫煙習慣別に検討している。その結果、非喫煙者において収縮期血圧値、拡張期血圧値および血清トリグリセライドは、唾液潜血量との間に統計的に有意な相関関係を認めている。さらに、第2節では炎症性物質である白血球とCRPとの関連性について、第1節と同様に唾液潜血反応試験を用いて疫学的に解析している。その結果、非喫煙者において、唾液潜血量が増加するに従って、総白血球数、好中球数が統計的に有意に高値を示している。つまり、歯周病が進展するに従って、総白血球数、好中球数が高くなる傾向を示している。血清CRPと唾液潜血反応試験との関連性は、統計的に有意ではないが、白血球数と同様に唾液潜血量が増加するに従って、血清CRPが高値を示している。すなわち、歯周病の進展によりこれらの炎症性物質が高値を示し、その結果として冠動脈疾患が誘発される可能性が高くなると推察している。

第1章～第3章では、肥満と冠動脈疾患の発症経路に関する疫学的な解析により、その経路の中に歯周病が介在することを明らかにし、これは肥満者の脂肪細胞中の多量のTNF- α の作用により歯周病の重症化が促進され、さらに歯周病の長期間の炎症反応により、総白血球数、血清CRPが上昇し、その結果として肥満が冠動脈疾患の発症に連結することを見出している。

第4章では冠動脈疾患予防対策に重要な位置を占める運動および栄養から、実践的な知見を得るための解析を実施している。第1節では、運動習慣に関する7年間の継続的観察を実施し、生活習慣要因、特に睡眠時間との関連性について検討している。その結果、睡眠時間不足群は、運動習慣を中心とした生活習慣も不適切であることを認めている。さらに、第2節は栄養面から、冠動脈疾患発症に関連するミネラルであるマグネシウムと関連する諸要因について検討している。その結果、血清マグネシウム値は、非常に変動の少ないものであるが、それに関連する要因により値に差異があることを認め、マグネシウムの適切な摂取が必要であることを明らかにしている。

本研究は、肥満と冠動脈疾患との関連性について、口腔疾患を介在した新たな経路を見出した点と、運動、栄養面からの実際的な予防対策を明らかにした等から、健康寿命の延伸や高齢者のQOL向上面で寄与するところ大である。よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

氏名	谷 哲 弥
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農 第 1 1 1 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	ウシ体細胞核移植卵の発生能に関する研究
論文審査委員 (主 査)	教授 角 田 幸 雄
(副主査)	教授 重 岡 成
(副主査)	教授 上 野 絃 一

論文内容の要旨

近年、哺乳類において体細胞クローンの作成が可能となったが、その成功率は極めて低く、また得られる産子に異常などが高頻度で見られることから核移植技術の改善と共に体細胞核の初期化機構の解明が求められている。本研究では、ウシ体細胞核移植における効率的なクローン個体作出のための実験系の確立と体細胞核初期化機構の解明を行った。

I. ドナー細胞の種類、培養期間、凍結保存方法がウシ体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響

ウシ体細胞核移植に適したドナー細胞の由来を明らかにするために、性別、成熟段階、採取組織の異なる体細胞を用いて核移植を行い、核移植卵の体外及び体内における発生能を調べた。また、体細胞核移植技術の確立を目指して、G0/G1 期への適切な細胞周期同調法及び効率的な体細胞の保存方法を検討した。その結果、細胞を採取する個体の性別、成熟度、組織の違いに関係なく、23~50%の核移植卵が胚盤胞期まで発生した。その中でも、成体雌の卵丘細胞及び卵管細胞を用いると効率的にクローン個体を作成できること、成体雄の表皮と耳を用いた場合には出生率には差はなかったが生存率が低下したことを示した。また、低血清処理法だけでなく接触阻止法によって細胞周期を G0/G1 期に同調させても、核移植のドナー細胞として効率的に用いることができることや 39°C、-70°Cあるいは-196°Cのいずれの温度でも核移植卵の発生率を低下させることなく、細胞を 150~160 日間保存できることを明らかにした。しかしながら、保存期間がより長くなると、核移植卵の発生率が低下することも明らかとなった。

II. レシピエント卵の体外成熟培養条件がウシ体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響

ウシ体細胞核移植に適した体外成熟培養の条件を検討し、核移植卵の体外発生率の影響を調べた。体外成熟培養法の違いによって卵細胞の質の指標として知られている GSH 合成量が変化したが、紡錘体形成異常出現率や MPF 及び MAPK 活性には変化が見られなかった。卵丘細胞を剥離して卵成熟培養を行うと、GSH 合成量の低下や表層顆粒パターンに乱れが生じたが、体細胞核移植卵の胚盤胞への発生率に大差は見られなかった。しかし、TUNEL 法により胚盤胞期でアポトーシスを起している細胞核の割合を調べると、有意に増加していた。このことから、体細胞核移植に用いる卵細胞の体外成熟培養条件として、卵丘細胞の付着が重要であることが明らかとなった。

III. 化学的染色体除去法がウシ体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響

ウシ MII 期卵染色体の除去に効果的な Demecolcine の最適処理時間を検討し、ウシ体細胞核移植に用いて、核移植卵の体外発生能と胚移植による体内発生能を調べた。その結果、MII 期卵を 30 分間 0.5 μ g/ml Demecolcine で処理すると染色体を含む細胞膜が卵卵腔に突出し、細胞膜突起を除去することで、従来の方法に比べて染色体の除去が効率よく実施できた。細胞膜の突出付近は、アクチンが凝集して、Con-A が結合しない表面構造をしていることも明らかとなった。さらに、マウス MII 期卵の場合と同様に、

Demecolcine 処理により MPF 活性が 20~30%上昇することが明らかになったが、MAPK 活性は変化しなかった。化学的染色体除去法を用いて体細胞核移植を行った場合、核移植卵は通常の染色体除去法を用いた場合と同程度の割合で胚盤胞期へ発生した。また、一部の胚盤胞は、受胎雌へ移植することによって正常なクローン個体へ発生したことから、化学的染色体除去法は体細胞核移植に有効な手段であると考えられた。

IV. 体細胞核移植卵の紡錘体形成及びスピンドルチェックポイント

体細胞核移植卵における紡錘体形成及びスピンドルチェックポイントについて、紡錘体の免疫染色による検査及び MPF と MAPK 活性の測定によって調べた。大部分の核移植卵では、異常な紡錘体構造をとり、染色体の散在が観察された。Demecolcine 処理により、核移植卵の紡錘体形成は阻害され、MII 期卵の場合と同様に染色体の凝集、MPF 活性の上昇ならびに細胞膜の突出が観察された。しかしながら、MII 期卵の場合とは異なって、活性化刺激を行うと MPF と MAPK の活性が低下した。このことから、核移植卵におけるスピンドルチェックポイント機構は正常に機能していないことが明らかとなった。しかし、体細胞を 2 個移植することで、スピンドルチェックポイント機構が活性化されたことから、この異常は体細胞核から細胞質に放出されるシグナル伝達因子量の不足に起因すると考えられた。

V. ドナー細胞とレシピエント卵細胞質の細胞周期の組み合わせがウシ体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響

体細胞核移植におけるドナー細胞とレシピエント卵細胞質の細胞周期の組み合わせが、体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響について検討した。MII 期のレシピエント卵を用いた場合、細胞周期が S 期以外の時期に同調したドナー細胞を用いると、21~50%の核移植卵が大差なく胚盤胞期まで発生した。さらに、M 期の体細胞を核移植し、第 2 極体を放出後得られた 2 倍体胚盤胞を 5 頭の受胎雌に移植したところ、1 頭が受胎して正常なクローン個体を分娩したことから、体細胞クローン個体作出のためのドナー細胞の有効な細胞周期は、必ずしも G0/G1 期である必要はないことが証明された。また、S 期のレシピエント卵を用いた場合、ドナー細胞の細胞周期に関わらず、いずれの場合も 8 細胞期で発生を停止した。これらの点から、体細胞核の初期化を誘導する機構は MII 期の卵細胞質にのみ存在していると判断された。

VI. 核の初期化に及ぼす MPF と MAPK の影響

体細胞核の初期化機構の解明を目指して、活性化していない MII 期の卵子細胞質から活性化刺激後どの段階で初期化誘導能が消失するかを、体細胞核移植卵の発生能を指標に調べた。特に、MPF と MAPK 活性との初期化誘導能との関連について詳細に検討した。G0/G1 期の体細胞を核移植した場合、活性化刺激後 1 時間目以降の卵で胚盤胞への発生率は有意に低下した。これに対して、M 期の体細胞を用いた場合は、活性化刺激後 5 時間目までの卵へ核移植した場合発生するが、6 時間目の卵を用いると発生率が急激に低下した。MPF 活性が基底値に達する 1 時間目の卵細胞質でも初期化を誘導できることが

ら、MPFは初期化誘導因子ではないことが明らかとなった。さらに、初期化誘導能の消失時期は、MAPKカスケード(MEK-ERK-RSK)の不活化時期とも相関がなかったため、MAPK活性も核の初期化に直接関与しないことも明らかとなった。

VII. 卵細胞質に存在する初期化誘導因子の探索

体細胞核の初期化を誘導する因子は、MII期の卵細胞質に存在するだけでなく、活性化刺激後5時間目までの卵細胞質に存在し、MPF及びMAPK活性による制御を受けていないことを明らかにした。本章の実験では、この因子を同定し、利用することにより体細胞クローン個体の作出成功率を向上できるか否かを検討した。プロテオーム解析技術を用いて、ウシ未受精卵に存在する初期化誘導因子の探索を行い、その候補としてTCTPを同定した。さらに、TCTPは卵細胞質中でリン酸化を受けて活性化し、脱リン酸化を受けて不活化するタンパク質であることを明らかにした。詳細な機能解析の結果、dsRNAをGV期卵へ注入して卵細胞質内のmRNA量を減らしても、MII期への卵成熟率には影響しないことが判明した。しかしながら、その後の発生において体外受精を行った場合対照区と同様に発生したが、体細胞核移植卵では胚盤胞期への発生率が有意に低下した。また、cRNAをGV期卵へ注入してタンパク質を強制発現させると、卵成熟の進行がMI期で停止し、紡錘体と染色体形成に異常が認められた。次に、体細胞核の初期化誘導能を検討するため、活性化刺激後6時間目の卵にTCTPタンパクとリン酸化ペプチドを注入して体細胞核移植を行い、発生率が回復するかを調べたが、体細胞核移植卵の胚盤胞期への発生能を回復させることはできなかった。そこで、核移植前のドナー細胞へリン酸化ペプチドを導入して核移植を行い、核の初期化が促進されるかどうかを検討した。その結果、この細胞を用いた核移植を行って得られた胚盤胞を受胎雌へ移植すると、ペプチドを導入しない細胞を用いた場合に比べて、受胎率が高く、流産率が低くなり、また得られたクローン個体に形態形成異常が見られなかった。このことから、リン酸化ペプチドをドナー細胞へ予め導入することにより核移植後の体細胞核の初期化が促進されたと考えられる。

本研究では、ウシ体細胞核移植における実験系の確立のために最適なドナー細胞とレシピエント卵の条件を明らかにし、また未受精卵からの染色体除去法など核移植に伴う技術の開発とその機序を解明した。一方、体細胞核初期化についてMPFとMAPK活性との係わりを調べ、さらに初期化誘導因子の候補を同定及び利用することによりクローン個体の作出成功率を向上させることに成功した。

核移植技術は、優良家畜の育種・改良・増産、基礎生物学の研究手段、異種臓器移植や有用医薬品の生産を目的としたTG動物の作製、絶滅危惧種の救済、再生医療へ向けたオーダーメイドES細胞の樹立など非常に多くの点で利用が期待される。本研究で実施した未受精卵から初期化誘導因子を同定し利用する新しいアプローチは、体細胞核初期化の分子機構の解明や体細胞核移植技術の向上だけでなく、核移植を介することなく体細胞核を未分化状態にして細胞株を樹立し、再生医療分野へ応用できる可能性があることから、様々な分野に貢献できると考えられる。

申請者が近畿大学大学院農学研究所博士前期課程に入学した平成9年は、2月に世界で最初の成体体細胞クローンヒツジドリーの誕生が報告された年であり、また申請者が所属する研究室では培養細胞を用いた個体発生の研究で生研機構の大型研究を開始した年でもあった。そこで、同氏にはウシ体細胞の核移植に関する研究テーマを与えた。同氏は、教員、ポスドク、実験助手や他の大学院生と協力してウシ体細胞の核移植に取り組み、世界で最初の成体由来体細胞クローンウシの作出に貢献して、その成果を第2著者としてScience誌に公表した。同氏は、大学院修了後近畿大学助手として採用されて、体細胞クローン個体の作出に関して再度採択された大型研究の主要メンバーとして、現在に至るまで一貫してウシ体細胞の核移植に取り組み多くの成果を上げてきた。

申請者はまず、核移植に用いる体細胞の種類、培養期間、保存方法が核移植卵の発生能に及ぼす影響を検討した結果、核移植のドナー細胞として卵丘細胞及び卵管細胞が優れていること、体細胞は少なくとも150日間保存できることを明らかにした。

ついで、核移植に用いる未受精卵の培養条件を検討して、卵丘細胞が存在することの重要性を明らかにするとともに、デメコルシンを用いた染色体の化学的除去法を確立した。

体細胞核移植卵は体外で高率に発育するが、受胎雌に移植すると受胎率が低く、受胎した場合でも流産率が高く、しかも得られる産子に死産、形態形成異常や分娩直後の死亡等が高頻度で見られることを明らかにした。核移植卵における紡錘体形成およびスピンドルチェックポイント機構が正常に機能していないことが、異常が出現する一つの原因であることを明らかにした。体細胞核移植卵では、未受精卵に核移植後生じる体細胞核の初期化が不十分なために、発生に関連する遺伝子の発現が受精卵と比べて異なるようになり、それが個体への異常につながる主要な原因であると考えられている。しかしながら、未受精

卵細胞質内に存在する初期化に関わる因子については、不明であった。そこで、申請者はドナー細胞と未受精卵細胞質の細胞周期の組み合わせが核移植卵の体外発生能に及ぼす影響を詳細に検討することによって、体細胞核の初期化に関わる因子が第2減数分裂中期(MII期)未受精卵細胞質内に存在することを明らかにした。ついで、この因子はこれまで推察されていたような卵成熟促進因子やMAPキナーゼではないことを明らかにした。そこで、プロテオーム解析により MII期卵細胞質内に存在する体細胞核の初期化誘導因子の探索を行い、その候補としてTCTPを同定した。ついで、TCTPの特性解析を行って、この蛋白質は卵細胞質中でリン酸化を受けて活性化すること、動物種で広く保存されていること、体細胞核が初期化される最初のステップに働く可能性が高いことを明らかにした。

ついで、合成したリン酸化 TCTP ペプチドをあらかじめ導入した体細胞を、化学的染色体除去法を用いて調整した未受精卵に核移植して体外で発生させ、受胎雌に移植した結果、受胎後の流産率が低下し、得られた個体の死亡率等が低下することを確認した。このことから、本研究で見いだしたリン酸化 TCTP は、体細胞核の初期化の誘導に関わる因子である可能性が高いと考えられた。

本研究で得られた成果は、これまで筆頭著者として6報(1報は筆頭著者相当)の国外の学術論文として公表してきた。また、得られた成果は世界の体細胞クローンウシ作出研究の進展に大きな貢献をしてきた。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの手続きを経たうえ、平成19年2月9日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	やま もと あつ ひこ 山本敦彦
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第906号
学位授与の日付	平成18年6月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	頭部3D-CT規格分析法の開発

論文審査委員(主査)	教授	上	石	弘
(主査代行)	教授	西	村	恭昌
(副主査)	教授	重	吉	康史