

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 川 上 雅 弘
 学位の種類 博士(農学)
 学位記番号 農 第 9 4 号
 学位授与の日付 平成 18 年 3 月 22 日
 学位授与の要件 学位規程第 4 条第 1 項該当
 学位論文題目 ブタ体細胞核移植卵の発生能向上に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教授 角 田 幸 雄
 (副主査) 教授 櫻 谷 保 之
 (副主査) 教授 上 野 紘 一

本研究では、体外成熟培養卵子を用いた体細胞クローンブタの作出成功率の向上を目的として、ブタ体細胞核移植卵の発生能向上に関する諸条件の検討を行った。

I. 化学的染色体除去法がブタ体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響

ブタ未受精卵の染色体除去を行う際に用いる薬剤の最適な処理条件を検討し、体細胞核移植卵の体外発生能と産子への発生能について検討した。その結果、第二減数分裂中期卵を0.1~0.4 μg/ml Demecolcine で60分、0.4 μg/ml Demecolcine で30分、又は3 μg/ml Nocodazole で30~60分間処理すると、染色体が凝集して、卵細胞質表面に突出することが明らかになった。最適濃度の Demecolcine または Nocodazole で体外成熟卵を1時間処理後、凝集して卵細胞質表面に突出した染色体を除去して体細胞核移植に用いた結果、核移植卵の体外発生率に違いは見られなかった。しかしながら、0.4 μg/ml Demecolcine 処理後染色体を除去した核移植胚を移植した6頭の受胎雌のうち、2頭から合計4頭のクローンブタが得られたのに対して、3 μg/ml Nocodazole 処理を行った場合は核移植胚を移植した4頭は、いずれも分娩に至らなかった。本実験結果から、染色体除去操作には、Demecolcine を用いる方がよいことが明らかとなった。

II. 培養液がブタ体細胞核移植卵の体外発生能に及ぼす影響

mNCSU37 培地と PZM-3 培地を用いて、ブタ体細胞核移植卵の体外発生能を比較した。胚盤胞への発生率は、PZM-3 を用いた場合12%であり、mNCSU37 を用いた場合の6%に比べて高く、また得られた胚盤胞の細胞数も PZM-3 区で多かった。次に、体細胞核移植卵の胚盤胞への発生時期を比較したところ、mNCSU37 を用いた場合、培養後7日目に胚盤胞への発生が観察されたが、PZM-3 を用いた場合は、培養後6日目にはじめて胚盤胞へ発生した。以上の結果から、PZM-3 培地の方が体細胞核移植卵の培養液として優れていることが判明した。

III. 化学的活性化法がブタ体細胞核移植卵の体外発生能に及ぼす影響

イオノマイシンを用いた化学的活性化法が、ブタ体細胞核移植卵と単為発生卵の発生能に及ぼす影響を検討した。その結果、単為発生卵ではイオノマイシンの処理濃度依存的に発生率が向上した。これに対して、核移植卵ではイオノマイシンの処理濃度や処理時間の違いによって発生率に大差はみられなかった。次に、イオノマイシンあるいは電気刺激を用いてブタ体細胞核移植卵を活性化し、発生率を比較した。その

結果、イオノマイシンを用いた場合の胚盤胞への発生率は11%、電気刺激を用いた場合の発生率は14%であり、活性化刺激方法の違いによって発生率に大差はみられなかった。

IV. ブタ単為発生卵と体細胞核移植卵の発生速度の比較

ブタ単為発生卵と体細胞核移植卵における卵割時期と前核形成時期を比較した。その結果、単為発生卵と核移植卵の卵割時期に違いは見られず、活性化付与後18~20時間に卵割する胚が多いことが示された。しかし、単為発生卵と核移植卵の間で、卵割時期によって発生能が異なることが明らかとなった。すなわち、単為発生卵では活性化付与後18~20時間の間に卵割した胚の発生能が最も高く、その後、卵割時期が遅くなるに従って発生能は低下した。一方、核移植卵では、活性化付与後18~20時間目から胚盤胞が得られるようになるが、卵割時期が遅くなるに従って発生能が向上し、活性化付与後22~24時間目に卵割した胚の発生能が最も高かった。本実験結果から、単為発生卵と核移植卵では、前核形成時期は異なるが、卵割時期に大差はないことが明らかとなった。また、発生能が高い胚の卵割時期に、単為発生卵と核移植卵の間で違いがあることが明らかとなった。

V. 脂肪滴の除去が体細胞核移植卵の凍結融解後の生存性に及ぼす影響

本実験では、第一卵割の時期によって選別した体細胞核移植卵に脂肪滴除去処理(Delipation)を行って、ガラス化法(Vitrification)による凍結保存が可能か否かを検討した。その結果、2細胞期で脂肪滴を除去する操作は、核移植卵の胚盤胞への発生能を低下させないことが判明した。核移植卵に Delipation を行った場合の凍結融解後の生存率は71~83%であり、凍結を行わない場合と大差がみられなかった。本実験より、Delipation はブタ核移植卵の凍結保存に有効な手法であり、第一卵割時期を利用した胚の選別と Delipation 処理を組み合わせることによって、効率的なブタ体細胞核移植胚の凍結保存技術を確立することができた。

VI. 減数分裂再開抑制処理が体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響

減数分裂再開抑制現象を利用して、39℃の培養器内で卵胞卵が保存可能かどうかを検討した。まず、卵母細胞の減数分裂を抑制する保存条件を検討した。その結果、10%卵胞液、1mM dbcAMP、卵胞壁小片を添加した mNCSU37 を用いた場合、GV 期で停止していた卵胞卵の割合が有意に高かった。次に、保存可能時間を調べた。そ

の結果、1mM dbcAMP を含む場合は、96 時間まで高率に GV 期を維持していた(94~98%)が、含まない場合は時間の経過に伴って徐々に低下した。ついで、保存した卵子を、単為発生誘起と体細胞核移植に用いて、それぞれの発生能を検討した。その結果、単為発生では48時間まで、核移植では72時間まで保存した卵子を用いても、発生率が低下しないことが明らかとなった。本実験結果から、単為発生卵と核移植卵の発生能を低下させることなく、ブタ卵胞卵を少なくとも48時間39℃に保存できることが示された。

VII. アポトーシス抑制剤を併用した減数分裂再開抑制処理が体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響

卵胞卵を39℃で保存すると時間経過に従って卵丘細胞が脱落し、卵丘細胞が脱落した卵胞卵は第二減数分裂中期卵へ成熟しても、その後の発生能は低下する。卵丘細胞が脱落する原因は、細胞のアポトーシスによると考えられることから、本実験では、アポトーシス阻害剤(Z-VAD-FMK)を用いて卵丘細胞のアポトーシスを抑制して卵胞卵を保存し、単為発生誘起ならびに体細胞核移植後の発生能を調べた。その結果、保存培地へアポトーシス阻害剤を添加すると、卵丘細胞の脱落が抑制されること、96時間まで保存した卵子の卵細胞質を体細胞核移植のレシピエント卵細胞質として用いても発生能は低下しないことが示された。

本研究では、ブタ体外成熟培養卵子を用いた体細胞クローンブタの作出成功率の向上を目的として、ブタ体細胞核移植卵の発生能向上に関する検討を行った。その結果、発生能の高い核移植卵の選別方法や凍結方法、核移植に使うレシピエント卵の保存法など、核移植研究を行う上で利用価値の高い新しい技術を開発することができた。

論文審査結果の要旨

成体体細胞の培養細胞を未受精卵に核移植することによって、初めて子ヒツジ（体細胞クローン）が得られたことが1997年に報告されて以来、有用家畜の生産、発生・分化機構の解明、絶滅動物種の保護、再生医療への応用等の幅広い分野から注目を集め、現在に至るまで多くの動物種で体細胞クローン個体が作出されてきた。体細胞クローンブタ作出技術は、食料生産分野での利用に加えて、異種臓器移植用臓器提供動物作出法としての利用が考えられてきた。近年先進諸国では、高度医療の一環として臓器移植が行われるようになったが、移植を待つ患者数に対して、臓器提供ドナー数が極端に不足しているのが現状である。その現状を打破するため、いくつかの方法が考えられているが、その一つとしてヒトに移植した場合に生じる超急性拒絶反応を生じないように操作したブタを作出し、その臓器をヒトに移植する異種臓器移植が考えられている。そのためには、ブタ培養細胞を用いて超急性拒絶反応に関わる遺伝子を破壊し、その細胞から個体を作る手法の確立が必要である。

申請者にブタ体細胞クローン作出効率の向上に関するテーマを与えたのは2000年暮れであるが、初めて体細胞クローンブタの作出成功例が報告された年であった。当時、日本、英国と米国から同時に成功例が報告されたが、いずれの報告でもクローン個体の作出例はわずか数頭であり、極めて成功率が低かった。体細胞クローン個体は、多くの要素技術を組み合わせた複合的な手法を用いて初めて作出できる。申請者は、核移植を成功させるための最も重要な技術である卵染色体の除去法に独自の工夫を加えて、新しい化学的染色体除去法を確立した。ついで、核移植卵の体外培養液、核移植卵を発生させるための単為発生刺激、核移植卵の発生速度、核移植卵の凍結保存法をそれぞれ検討することによって、発生能の高い核移植技術を確立した。

また、希少動物種で核移植を実施する場合、核を移植するレシピエント卵細胞質の入手と保存方法の確立が重要になる。特に最近、重篤な疾患を持つ患者

の体細胞をヒト未受精卵に核移植後体外で発生させ、ES細胞を樹立し、必要な細胞種に分化させて治療に用いようとする試みが始まっている。この方法論には、倫理的な問題以外にも技術上の問題点があり、その一つが卵胞卵の有効利用に関する問題である。そこで申請者は、新しい観点から卵胞卵を培養器内で少なくとも4日間体細胞核移植後の発生率を低下させることなく保存する手法を開発した。この知見は、卵胞卵の採取、核移植、細胞株の樹立場所などが異なる場合の多いクローンヒトES細胞の樹立に当たって貴重な知見となる。

本研究で得られた成果は、これまで4編（うち筆頭著者3編）の国内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ブタ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18年2月20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。