

論文内容の要旨

氏名	矢持 隆之		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	生第28号		
学位授与の日付	平成24年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当		
学位論文題目	カニクイザル線維芽細胞とウサギ卵母細胞を用いた異種間核移植胚の体外発生に関する研究		
論文審査委員 (主査)	教授	細井美彦	
	(副主査)	教授 佐伯和弘	
	(副主査)	教授 松本和也	

1997年、ヒンジにおいて哺乳類初の体細胞クローンである、ドリー誕生の報告によって分化の進んだ体細胞でも産子が得られることがわかり、それ以降、様々な動物種で、クローン産仔の作出が報告された。

近年、様々な要因により絶滅の危機に瀕している動物が増加しており、これら絶滅危惧種の繁殖方法の一つとして体細胞核移植技術を用いる試みがなされている。通常、体細胞核移植ではドナー細胞の核を同種の卵母細胞により初期化する方法が用いられている。しかし、絶滅危惧種においては卵母細胞を採取する事は非常に困難である。そのため、ドナー細胞と卵母細胞の動物種が異なる異種間核移植が研究され、ガウル、ムフロンなどのクローン産仔が作出されている。

これまで異種間核移植による産仔作出の成功した報告では、ドナー核の動物種とレシピエント卵母細胞の類縁関係が、亜種間または同属間という近縁種間で異種間核移植が行われている。これらの事から、近縁種間の卵母細胞は、産子までの発生が可能な体細胞の初期化が可能であると考えられる。また、これらの報告では、卵母細胞の供給源として、過剰排卵処理等の卵母細胞の採取技術が確立されている、家畜化や実験動物化された近縁種を用いている。しかし、ほとんどの絶滅危惧種においては、必ずしも家畜化や実験動物化された近縁種が存在するわけではない。そのため、より類縁関係の遠い動物種間での核移植が必要とされている。そこで、本研究では、レシピエントとしてウサギ卵母細胞を、核ドナーとしてカニクイザルを用いてカニクイザル-ウサギ異種間核移植胚(サル-ウサギ胚)の作出を試み、サル-ウサギ胚の作出法の検討、胚発生における特徴、トリコスタチン A (TSA) による胚発生の改善および胚性幹細胞の樹立を試みた。

第2章では、サル-ウサギ胚の作出するにあたり、サル-ウサギ胚作出の条件検討を行った。はじめに、胚培養液を決定するため、サル-ウサギ胚及びウサギ-ウサギ胚を、ウサギ胚の培養液である M199 とカニクイザル胚の培養液である mCMRL-1066 それぞれで培養した。その結果、サル-ウサギ胚を M199 で培養した場合、4細胞期までに全ての胚が発生を停止した。一方、mCMRL-1066を用いた場合、4細胞期での発生停止を回避し、胚盤胞期胚への発生が観察された(18.6%)。ウサギ-ウサギ胚はどちらの培養液で培養した場合でも有意な差は見られなかった(16.1% vs. 21.8%)。次に、細胞核注入から活性化処理までの時間の検討するため、サル-ウサギ胚をドナー細胞核注入から30、90、150分で活性化処理を行った。その結果、30分と比較して、90、150分の区で偽前核形成率が有意に高くなった(39% vs. 83%, 80%)($p < 0.05$)。ドナー細胞核注入から活性化処理までの時間は90分が有効であった。卵割率や胚盤胞期までの発生に有意な差は無かったものの、90分が最も有効だった。続いて

6-dimethyl amino purine (6-DMAP)の処理時間を検討するため、サルウサギ胚を活性化処理後、0、1、2、3、4時間2mMの6-DMAPで処理した。その結果、無処理の区と比較して、6-DMAP処理を行う事で偽前核の形成率が有意に向上した(37% vs. 80%, 83%, 79%, 79%)($p<0.05$)。卵割率(58% vs. 27%, 34%, 33%, 29%)、胚盤胞期までの発生率が(24% vs. 0%, 9%, 13%, 0%)と、他の区と比較して2時間曝露において有意に高い発生を示した($p<0.05$)。これらの事から、培養液の選択や体細胞核移植の条件を検討する事で、サルウサギ胚の作出が可能であり、胚盤胞期までの発生が可能であると示された。

第3章では、作出したサルウサギ胚の発生における特徴として、胚の発生速度や、胚盤胞期における細胞数を検討した。さらに、サルウサギ胚のミトコンドリアについてPCRにより解析を行った。サルウサギ胚の発生速度を、ウサギ顕微授精(ICSI)胚、ウサギーウサギ胚、カニクイザル ICSI 胚と比較した。その結果、ウサギ ICSI 胚は ICSI から96時間で、ウサギーウサギ胚およびサルウサギ胚は活性化処理から120時間で、カニクイザル ICSI 胚は ICSI から168時間で胚盤胞期まで発生し、サルウサギ胚の発生速度はウサギーウサギ胚と類似していた。次に、胚盤胞期の細胞数を計測した結果、ウサギ ICSI 胚は 306 ± 16 、ウサギーウサギ胚は 149 ± 43 、サルウサギ胚は 136 ± 39 、カニクイザル ICSI 胚は 243 ± 32 であり、サルウサギ胚の胚盤胞期の細胞数はウサギーウサギ胚と同程度だった。続いて、サルウサギ胚のミトコンドリアDNA(mtDNA)を検出するため、カニクイザル mtDNA 上の *cytochrome b* 遺伝子、ウサギ mtDNA 上の *cytochrome b* 遺伝子それぞれを特異的に検出できるプライマーを設計し、PCR法によりmtDNAの検出を行った。その結果、サルウサギ胚から、カニクイザル、ウサギ両方の mtDNA が検出され、複数のミトコンドリアが混在するヘテロプラスミーである事が示された。

第4章では、サルウサギ胚の発生率の改善を試みるため、体細胞核移植胚の発生を改善出来る事が報告されている、TSA処理を試みた。まず、ウサギーウサギ胚を用いてTSAの処理条件を検討した。初めに、TSA処理時間を検討するため、ウサギーウサギ胚を0、3、6、9、12、18、24時間、5nMのTSAで処理した。その結果、偽前核形成率(0h:98%, 3h:98%, 6h:89%, 9h:89%, 12h:89%, 18h:97%, 24h:100%)や卵割率(0h:93%, 3h:94%, 6h:95%, 9h:90%, 12h:83%, 18h:87%, 24h:96%)に差は見られなかった。胚盤胞期までの発生において、無処理区と比較して、6、9、12時間TSA処理を行った区において有意な改善が観察された(21% vs. 58%, 48%, 55%)($p<0.05$)。特に、6時間のTSA処理により最も高い改善効果が見られた。次に、TSA処理濃度を検討するため、ウサギーウサギ胚を0、5、50、500nM、5 μ Mで6時間TSA処理を行った。そ

の結果、偽前核形成率(0nM:89%, 5nM:83%, 50nM:89%, 500nM:92%, 5 μ M:89%)や卵割率(0nM:95%, 5nM:96%, 50nM:88%, 500nM:100%, 5 μ M:94%)に差は見られなかった。胚盤胞期までの発生において、無処理区と比較して、500nM、5 μ M処理区で有意な改善が観察された(9% vs. 64%, 59%)($p<0.05$)。特に、500nMのTSA処理により最も高い改善効果が見られた。この事から、500nM、6時間のTSA処理が、最も効率よくウサギーウサギ胚の発生を改善出来る事が示された。また、TSA処理を行わない場合、ウサギーウサギ胚は8-16細胞期での発生停止が多く観察された。一方で、6時間、500nMのTSA処理によりその発生停止が回避された。続いて、この条件をサルウサギ胚に応用した。その結果、偽前核形成率(82% vs. 82%)、卵割率(78% vs. 80%)、8細胞期までの発生率(33% vs. 30%)に改善は見られず、どちらの区においても胚盤胞期までの発生が観察されなかった。この結果から、サルウサギ胚へのTSA処理は、その発生改善に有効ではないと示された。

第5章では、サルウサギ胚からの胚性幹細胞(ES細胞)の樹立を試みた。まず、サルウサギ胚より内部細胞塊(ICM; inner cell mass)を単離するため、サルウサギ胚を抗カニクイザル抗血清、または抗カニクイザル抗血清と抗ウサギ抗血清の混合抗血清を用いて免疫手術を行った。その結果、抗カニクイザル抗血清のみではICMの単離が困難であった。一方、抗カニクイザル抗血清と抗ウサギ抗血清を混ぜたものを用いた場合、ICMの単離が可能であった。続いて、得られたサルウサギ胚由来のICMをカニクイザルES細胞の樹立と同様の条件で培養を行った。その結果、サルウサギ胚由来のICMは培養1-3日でフィーダ細胞上に進展していった。培養7日目に、一度ICM由来細胞が観察できなくなった。しかし培養を続けた結果、培養9日目に初期コロニーが観察された。得られたコロニーは大きな核、明瞭な核小体、扁平なコロニーの形状など、外見上はカニクイザル受精卵由来ES細胞と類似していた。培養12日目にコロニーが継代可能な大きさまで増殖したためコロニーの継代を行った。しかしながら、コロニーの再増殖は観察されなかった。

本研究の結果より、1)ウサギ卵母細胞はカニクイザル線維芽細胞核をリプログラミングし、胚盤胞期までの発生をサポートできる事、2)サルウサギ胚の特徴に、核ドナー細胞とレシピエント卵母細胞の動物種両方の胚の特徴が混在する事、3)活性化処理後のTSA処理はサルウサギ胚の発生改善に有効ではない事、4)サルウサギ胚のICMは初期コロニーを形成する能力がある事を明らかにした。この本研究の結果を用いて異種間核移植を絶滅危惧種の繁殖や胚性幹細胞樹立に応用する事が出来ると考えられる。

論文審査結果の要旨

絶滅危惧種の繁殖方法の一つとして体細胞核移植技術を用いる試みがなされている。通常、体細胞核移植ではドナー細胞の核を同種の卵母細胞により初期化する方法が用いられている。しかし、絶滅危惧種においては卵母細胞を採取する事は非常に困難である。これまでに異種間核移植によるクローン動物作出に成功した報告では、卵母細胞の供給源として、過剰排卵処理等の卵母細胞の採取技術が確立されている、家畜化や実験動物化された近縁種を用いている。しかし、ほとんどの絶滅危惧種においては、必ずしも家畜化や実験動物化された近縁種が存在するわけではない。そのため、より系統学的な遠縁関係の遠い動物種間での異種間核移植が必要とされている。しかしながら、系統学的に遠い動物種間での異種間核移植にたいする知見が乏しく、作出される胚の性質も明らかとなっていない。そこで、本研究では、異種間核移植技術を産仔作出とともにES細胞の樹立に応用するため、異種間核移植の基礎的知見を得る事を目的に、レシピエントとしてウサギ卵母細胞を、核ドナーとしてカンクイザルを用いてカンクイザル-ウサギ異種間核移植胚(サル-ウサギ胚)の作出を試み、サル-ウサギ胚の作出法の検討、胚発生における特徴、トリコスタチンAによる胚発生の改善および胚性幹細胞の樹立を試み、その結果を2章から5章までに示した。

第2章では、サル-ウサギ胚の作出するにあたり、サル-ウサギ胚作出の条件検討を行っている。はじめに、胚培養液を決定するため、サル-ウサギ胚及びウサギ-ウサギ胚を、ウサギ胚の培養液であるM199とカンクイザル胚の培養液であるmCMRL-1066それぞれで培養している。その結果、サル-ウサギ胚の培養には、カンクイザル胚の培養液であるmCMRL-1066が有効であることが示された。続いて、ドナー核注入から活性化までの時間を検討した結果、90分が有効であった。次に、活性化処理後に6-DMAPで処理し、6-DMAP処理の効果及びその処理時間を検討している。その結果、無処理の区と比較して、6-DMAP処理を行う事で偽前核の形成率が有意に向上し、2時間の6-DMAP処理で卵割率、胚盤胞期までの発生率が有意に改善することを示している。これらの事から、培養液の選択や体細胞核移植の条件を検討する事で、サル-ウサギ胚が胚盤胞期まで発生できる事を明らかとした。また、ウサギ卵母細胞が、カンクイザル線維芽細胞核をリプログラミングし、初期発生をサポート出来る事を明らかとした。

第3章では、作出したサル-ウサギ胚の発生における特徴として、胚の発生速度や、胚盤胞期における細胞数を検討している。さらに、サル-ウサギ胚のミトコンドリアについてPCRにより解析を行っている。その結果、サル-ウサギ胚の発生速度はウサギ-ウサギ胚と類似していること、サル-ウサギ胚の胚盤胞期の細胞数も同様にウサギ-ウサギ胚と同程度であることを示した。続いて、サル-ウサギ胚のミトコンドリア

DNA(mtDNA)を検出するため、カンクイザル mtDNA 上の *cytochrome b* 遺伝子、ウサギ mtDNA 上の *cytochrome b* 遺伝子それぞれを特異的に検出できるプライマーを設計し、PCR法により mtDNA の検出を行っている。その結果、サル-ウサギ胚から、カンクイザル、ウサギ両方の mtDNA が検出され、複数のミトコンドリアが混在するヘテロプラスミーであることを示した。この事から、サル-ウサギ胚にはカンクイザル胚、ウサギ胚両方の特徴が備わっている事が明らかとなった。また、ミトコンドリアもカンクイザル、ウサギ両方が混在している事を明らかとした。さらに、異種間核移植胚のミトコンドリアヘテロプラスミーは胚盤胞期までの発生に大きく影響しない事も明らかとした。

第4章では、サル-ウサギ胚の発生率の改善を試みるため、体細胞核移植胚の発生を改善出来る事が報告されている、トリコスタチン A(TSA)処理を試みている。その結果、ウサギ-ウサギ胚において、TSA 処理により胚発生の改善が可能であり、その適切な処理条件は、500nM、6時間であることを明らかとした。続いて、この条件をサル-ウサギ胚に応用した。その結果、サル-ウサギ胚への TSA 処理は、その発生改善に有効ではない事を明らかとした。

第5章では、サル-ウサギ胚からの胚性幹細胞(ES細胞)の樹立を試みている。その結果、抗カンクイザル抗血清と抗ウサギ抗血清を混ぜたものを用いた場合、ICM の単離が可能であることを明らかにしている。さらに、得られたサル-ウサギ胚由来の ICM が、外見上はカンクイザル受精卵由来 ES 細胞と類似した初期コロニーを形成する能力がある事を明らかとした。

本研究の結果より、1)ウサギ卵母細胞はカンクイザル線維芽細胞核をリプログラミングし、胚盤胞期までの発生をサポートできる事、2)サル-ウサギ胚の特徴に、核ドナー細胞とレシピエント卵母細胞の動物種両方の胚の特徴が混在する事、3)活性化処理後の TSA 処理はサル-ウサギ胚の発生改善に有効ではない事、4)サル-ウサギ胚の ICM は初期コロニーを形成する能力がある事が明らかとなった。これらの結果は、異種間核移植を絶滅危惧種の繁殖や胚性幹細胞樹立に応用するに当たり、有用な知見であると考えられる。

以上のように、本論文は、異種間核移植の作出法を検討し、さらにその胚の特徴やES細胞樹立の可能性を示し、異種間核移植における基礎的知見を得ることに成功しており、博士(工学)論文として価値あるものと認める。