

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19380161  
 研究課題名(和文)  
 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による初期化促進の分子機構解明とその応用  
 研究課題名(英文)  
 Elucidation of the molecular mechanism underlying the enhancement of somatic-cell reprogramming by a histone deacetylase inhibitor, and its applications  
 研究代表者  
 岸上 哲士 (SATOSHI KISHIGAMI)  
 近畿大学・生物理工学部・准教授  
 研究者番号：10291064

## 研究成果の概要(和文)：

世界初のクローンヒツジ「ドリー」の報告以来、クローン動物の作出効率は動物種によらずわずか数%と低率であった。本研究代表者は、クローン胚をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)、トリコスタチンA(trichostatin A, TSA)で処理することでクローンマウスの作出効率が大幅に改善されることを発見した。本課題ではその作出効率改善の機構解明として発生におけるHDAC酵素やタンパク質アセチル化の重要性を明らかにし、さらにこれまで不可能であったマウス系統からのクローンマウスの作出に世界で初めて成功した。

## 研究成果の概要(英文)：

Somatic-cell nuclear transfer (SCNT) has been extremely inefficient with rates less than 5 percentage points since the first clone, “Dolly” the sheep. The representative researcher for this grant found that treatment of cloned embryos with trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor (HDACi), dramatically increase the production rate of cloned mice more than six-times. Supported by this grant, the importance of HDAC in embryonic development and a mechanism underlying improvement of SCNT by HDACi treatment were revealed and, further cloning of “unclonable” mouse strains were achieved for the first time..

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：発生工学、核の初期化

## 1. 研究開始当初の背景

1997年クローンヒツジ「ドリー」の報告以降、マウス、ブタ、ウシを含む数多くの哺乳動物において、未受精卵を用いて核移植により体細胞から動物を作出するいわゆる体細胞クローン動物が報告されてきた。このことは哺乳類の未受精卵には種を超えて共通に分化した細胞核をリプログラミング（初期化）し、個体発生を行う能力を有していることを示唆している。これまでこの汎用な体細胞クローン技術を用いて、良質のクローンウシの生産、マウスでは免疫拒絶のない体細胞由来 NT-ES 細胞 (nuclear transfer embryonic stem cell) の樹立、ヒトへの臓器移植を目的とした  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase 抗原遺伝子欠損ブタの作出、ヒト第9血液凝固因子を生産するヒツジの作出などの様々な応用研究がなされてきた。しかしながら一方でこのクローン技術の実用化上の大きな問題点として、その成功率が低いこと、クローン動物の発生異常、体細胞の初期化のメカニズムが不明であることなどが挙げられる。特に、クローン動物作出率の大きな改善についてはこれまでほとんど成功していなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでほとんど明らかになっていない卵子における初期化の分子機構の解明および次世代クローン技術の開発を最終目標とし、最近（当時）著者らが発見したヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) の一つであるトリコスタチン A (TSA) を用いた新しいクローン技術において、1) 発生および初期化における HDAC の役割を解明し、2) これまでクローン作出が困難であった系統マウスのクローン作出に応用、さらに3) マウス以外の他種における HDACi 用いたクローン技術の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

各研究目的に合わせて以下のような方法で研究を行った。

### 1) 発生および初期化における HDAC の役割の解明

HDACi のクローン胚の発生向上リプログラミング促進における作用機構を明らかにするため、卵子におけるヒストン脱アセチル化酵素を解析し、また HDACi 処理により誘導されるヒストンアセチル化などエピジェネティックな修飾等の変化を明らかにする。さらにヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の発生における働きを明らかにするため、受精胚や単為発生における HDACi 処理の発生に与える影響を調べる。

### 2) クローニング困難なマウス系統への応用

本技術を用いてこれまで成功していない系統のマウスクローン作出を試み、さらにクローン技術に適した新しい HDACi のスクリーニングを行う。

### 3) マウスで確立した HDACi を用いたクローン技術の他種への応用

マウス以外の他種における HDACi の効果を検証する。

## 4. 研究成果

### 1) 発生および初期化における HDAC の役割の解明

受精胚では TSA 処理時間に応じて、胚盤胞への発生率の低下に加えて胎児や胎盤の巨大化や矮小化を誘導することが明らかとなった。さらに興味深いことに、単為発生胚では受精胚と異なりクローン胚同様に TSA 処理による胚盤胞への発生率の向上に加えて、着床後の生存率も大きく改善することを発見した (Kishigami et al., 2006 において一部公表済み)。このように胚の TSA 処理は受精胚、単為発生胚、クローン胚のそれぞれの発生率において異なる影響を及ぼすことが示された。以上の結果から、HDAC の制御は“核の種類” (体細胞由来核、受精核、単為発生核) により個体の発生能を決定する因子であることが明らかとなった。さらに、胚におけるアセチル化タンパク質の網羅的な解析を行ったところ、核のヒストンタンパク質に加えて、細胞質中のタンパク質のアセチル化状態が“核の種類”により異なることを発見した (岸上ら、未発表)。またこれらの胚を TSA 処理した場合、ヒストンタンパク質に加えてチューブリンや細胞質タンパク質など非ヒストンタンパク質のアセチル化状態が大きく変化することを見出した。以上の結果から、クローン胚などの TSA 処理はヒストンおよび非ヒストンタンパク質のアセチル化状態を大きく変えることが示唆された。このように、胚の TSA 処理に関する本研究から、ヒストンタンパク質を高アセチル化状態にしてリプログラミングを促進するという従来の単純なモデルではないことが示唆された。現在、胚の HDACi 処理に関する研究は、胚の発生能とタンパク質 (ヒストンおよび非ヒストンタンパク質) のアセチル化という新しい研究段階に入りつつある。

2) クローニング困難なマウス系統への応用  
TSA を用いた核移植技術によりこれまで不可能だった非近交系成体マウスからのクローンマウス作出に世界で初めて成功した (Kishigami et al., 2007)。さらに TSA と同じ HDACi の一つである scriptaid を用いることでこれまで不可能であった C57/BL6 などの近交系からもクローンマウスの作出が可能になった (Van Thuan et al., 2009)。これら

の結果、本技術により主要なマウス系統からのクローンマウス作出が可能になった。

3) マウスで確立した HDACi を用いたクローン技術の他種への応用

TSA 処理技術をウシへのクローン技術に応用したところ、最適処理時間がマウスの10時間と異なり48時間が最適であることが明らかとなった。その結果、胚盤胞の作出効率が2倍にまで改善された (Iwamoto et al., 2008 学会発表)。これらの結果から、HDACi を用いた新しいクローン技術はマウス以外の種においても有効であることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ①Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T., How to improve the success rate of mouse cloning technology, J Reprod Dev. 査読有、Vol. 56, No.2, 2010, pp. 20-30.
- ②Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, Hikichi T, Wakayama S, Kishigami S, Mizutani E, Wakayama T., The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice, Reproduction, 査読有、Vol. 138, No.2, 2009, pp. 309-317.
- ③Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Kim JH, Van Thuan N, Wakayama T., The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming, Development, 査読有、Vol. 135, No.23, 2008, pp. 3935-3945.
- ④ Kishigami S, Wakayama S, Hosoi Y, Iritani A, Wakayama T., Somatic cell nuclear transfer: infinite reproduction of a unique diploid genome, Exp Cell Res., 査読有、Vol. 314, No.9, 2008, pp. 1945-1950.
- ⑤ Kishigami S, Wakayama T., Efficient strontium-induced activation of mouse oocytes in standard culture media by chelating calcium, J Reprod Dev., 査読有、Vol. 53, No.6, 2007, pp. 1207-1215.
- ⑥ Bui HT, Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama S, Hikichi T, Ohta H, Mizutani E, Yamaoka E, Wakayama T, Miyano T., Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes, Reproduction, 査読有、Vol. 133, No.2, 2007, pp. 371-382.
- ⑦ Kishigami S, et al., Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer.

J Reprod Dev., 査読有、Vol. 53, No.1, 2007, pp. 165-170.

⑧Hikichi T, Wakayama S, Mizutani E, Takashima Y, Kishigami S, Van Thuan N, Ohta H, Thuy Bui H, Nishikawa S, Wakayama T, Differentiation potential of parthenogenetic embryonic stem cells is improved by nuclear transfer, Stem Cells, 査読有、Vol. 25, No.1, 2007, pp. 46-53.

⑨Wakayama S, Suetsugu R, Thuan NV, Ohta H, Kishigami S, Wakayama T, Establishment of mouse embryonic stem cell lines from somatic cell nuclei by nuclear transfer into aged, fertilization-failure mouse oocytes, Curr Biol. 査読有、Vol. 17, No.4, 2007, pp. R120-121.

[学会発表] (計 14 件)

- ①Kishigami S. et al., A unique property of specified mouse blastomere in Cdx2 expression, 6th Asian Reproductive Biotechnology Conference, Siem Reap, Cambodia, Nov 24, 2009, invited.
- ② Iwamoto D, et al., Effects of trichostatin A on gene expression and in-vitro development of bovine embryos cloned from transfected fibroblasts carrying a luciferase gene. 16th International Congress on Animal Reproduction, Budapest, Hungary, July 13-17, 2008 (Reproduction in Domestic Animals, 43, 191).
- ③ Iwamoto D, et al., Effects of trichostatin A on DNA methylation in cloned bovine embryos. 34th Annual Conference of International Embryo Transfer Society, Denver, USA, January 5-9, 2008 (Reproduction, Fertility and Development, 20, 99).
- ④Tsumimoto Y. et al., The impact of EGTA as chelating calcium on oocyte activation in mice, 5th Asian Reproductive Biotechnology Conference, Yunnan, China, Nov 26-30, 2008.
- ⑤Kishigami S. and Wakayama T., Oocyte activation by strontium in the presence of calcium supports full-term development of somatic cell cloned embryos, 40th Annual meeting of the Society of Reproduction (SSR), San Antonio, TX, USA, July 21, 2007
- ⑥ Kishigami S, Somatic cell nuclear transfer with HDACi, 4th JSAR-KSAR Joint Symposium, Seoul, Korea, June 20, 2008, invited.
- ⑦高橋千明ら、ウシ体細胞核移植胚におけるトリコスタチン A 処理の至適時間の検討. 平

成 20 年度 (第 58 回大会) 関西畜産学会 (神戸市、2008 年 9 月 2~3 日)、[平成 20 年度 (第 58 回大会) 関西畜産学会報、5 頁]。

⑧岸上哲土、オーダーメイド胚培養：移植される核の種類に適した体外培養を考える、第 11 回日本 IVF 学会、大阪、2008/10/14 (招待講演)。

⑨ Iwamoto D, et al. Effects of trichostatin A on development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. 33th Annual Conference of International Embryo Transfer Society, Kyoto, Japan, January 6-10, 2007 (Reproduction, Fertility and Development, 19, 142).

⑩Kishigami S. et al., Success of mouse cloning from an outbred strain by trichostatin a treatment after somatic nuclear transfer, 3rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Kyoto, Japan, January 6-10, 2007.

⑪Kishigami S., Histone deacetylases: key regulators to determine the efficiency of reprogramming after somatic-cell nuclear transfer, 5th Anniversary Congress of International Drug Discovery Science & Technology (IDDST), Shanghai, China, May, 2007, invited.

⑫Kishigami S. and Wakayama T., Efficient strontium-induced activation of mouse oocytes in standard culture media by chelating calcium, 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, Singapore, Nov 24, 2007, invited.

⑬ Suetsugu, S. et al., Abnormal cell adhesion in cloned mouse embryos, 第 40 回日本発生生物学学会大会 (細胞生物学会合同)、福岡国際会議場、福岡、2007 年 5 月。

⑭岸上哲土、発生工学におけるドラッグディスプレイ：クローン技術改善への試み、発生工・疾患モデル研究会、東京、2007 年 10 月 (招待講演)。

[図書] (計 9 件)

【邦文図書】

(1) 岸上哲土、矢持隆之、松原圭吾、細井美彦 著：再生医療 (メディカルレビュー社) 8 巻 3 号、「体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発」 pp. 43-46、2009 年 8 月

(2) 岸上哲土、辻本賀子、矢持隆之、細井美彦 著：細胞工学 (秀潤社) 28 巻 3 号、「核移植と iPS 細胞技術の比較：リプログラミングの効率化を目指して」 pp. 223-227、2009 年 2 月

(3) 岸上哲土、細井美彦 著：再生医療 (メディカルレビュー社) 7 巻 3 号、「体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開

発」 pp. 270-273、2008 年 8 月

(4) 若山静香、岸上哲土、若山照彦 著：蛋白核酸酵素 (共立出版) 52 巻 16 号、「体細胞核移植クローンとクローン ES 細胞の樹立」 pp. 2197-2202、2007 年 12 月

【英文図書】

(5) Satoshi Kishigami, Daisaku Iwamoto, Kazuhiro Saeki, Kazuya Matsumoto, Akira Iritani, Yoshihiko Hosoi 著：Animal Reproduction: New Research Developments (Lucas T. Dahnof 編) Nova Science Pub Inc (2010/4/30)、361 ページ (担当分：Somatic Cell Nuclear Transfer with HDACi as a New Cloning Method; pp. 329-334)

(6) Sayaka Wakayama, Satoshi Kishigami, Teruhiko Wakayama 著：Gene knockout Protocols (Methods in Molecular Biology シリーズ, Vol. 530) (Wolfgang Wurst 編) Humana Press; 2nd ed. 版 (2009/3/27)、516 ページ (担当分：Chapter 13、Cloning of ES cells and Mice by Nuclear Transfer)。

(7) Satoshi Kishigami and Teruhiko Wakayama 著：Microinjection: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology シリーズ, Vol. 518) (David Carrol 編) Humana Press; 1st ed. 版 (2008/12/12)、224 ページ (担当分：Somatic Cell Nuclear Transfer in the Mouse; pp. 207-218)。

(8) Satoshi Kishigami, Hiroshi Ohta and Teruhiko Wakayama 著：Genetic and Epigenetic Control of Mammalian Germ Cell Development and Function (Masami Nozaki 編) Research Signpost (2008)、(担当分：Epigenetic remodeling and developmental potentials after intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatids; pp. 133-152)。

(9) Satoshi Kishigami 著：Progress in DNA Methylation Research (Hans P. Neumann 編) Nova Science Publishers Inc; illustrated edition 版 (2008/2/19)、256 ページ (担当分：Epigenetic Reprogramming and Developmental Potentials of Cloned Embryos after Somatic Cell Nuclear Transfer; pp. 153-171)

【産業財産権】

○出願状況 (計 1 件)

名称：核移植卵子の作製方法

発明者：岸上哲土

権利者：独立行政法人理化学研究所、学校法人近畿大学、独立行政法人科学技術振興機構

種類：PCT 出願

番号：PCT/JP2006/319311

出願年月日：2006 年 9 月 28 日

国内外の別： 国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸上 哲士 (SATOSHI KISHIGAMI)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：10291064

(2) 研究協力者

若山 照彦 (TERUHIKO WAKAYAMA)

理化学研究所・神戸研究所・チームリーダー

研究者番号：40360672

佐伯 和弘 (KAZUHIRO SAEKI)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10298937