

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

## 疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工 学技術の確立

所 属 国立感染症研究所獣医科学部  
研究者 小倉 淳郎

### 分担研究者

- (1) 北山ラベス(株) 竹入修二  
(2) (株)ワイエスニューテクノロジー研究所 上田正次

### 要 旨

より確実かつ効率的な疾患モデル動物の開発および保存法の新規開発を進めた。その結果、マウスの体細胞核移植クローンおよび顕微授精技術の効率改善、ラットの顕微授精技術の新規開発、ウサギの体細胞核移植クローン技術の新規開発に成功した。

### 1. 研究目的

ヒトゲノム解析の成果は、創薬や疾患治療技術開発など医学分野への応用に迅速にかつ最大限に活かされるのが理想である。このためには、遺伝子改変動物を始めとした疾患モデル動物の作成法の抜本的技術改善あるいは新規開発が望まれ、また結果として作り出された疾患モデル動物の確実かつ容易な保存技術の開発が必須である。さらには疾患モデルの表現形に関わる多様性を拡大するためには、マウスだけでなく、貴重な生理学的特質を持つラットやウサギでもこれらの技術が活かされる必要がある。そこで本研究では、将来の中心的技術として期待される体細胞核移植クローン技術と顕微授精技術などの発生工学技術をマウス、ラット、ウサギを用いて新規開発あるいは実用化を行った。

### 2. 研究方法

核移植クローン技術：除核未受精卵子へドナー体細胞核を注入する方法により核移植を行った。ドナー細胞としてマウスでは卵丘細胞、未成熟セルトリ細胞、胎児線維芽細胞、成体線維芽細胞、始原生殖細胞(PGC)、ラットおよびウサギでは卵丘細胞を用いた。

顕微授精技術：いずれの動物種においても通常の成熟精子に加えて円形精子細胞および伸張精子細胞を用いて顕微授精を行った。一部卵子活性化因子を欠く後者の未成熟雄性細胞については、適宜人為的卵子活性化処理を行った。

胚移植：いずれの動物種でも、得られた胚を適切な培養液で体外培養した後、偽妊娠レシピエント動物の卵管あるいは子宮へ胚移植をおこない、妊娠中の途中開腹あるいは妊娠末期にて帝王切開を行った。

遺伝子発現解析：マウスにおいては、得られたクローン胎仔あるいは産子の遺伝子解析を実施した。

### 3. 研究成果

#### 3-1 マウス核移植クローン技術

1) マウス核移植クローン技術の効率の改善：マウス核移植クローン技術をさらに改善するために、唯一近交系ドナーとしてクローン産子が得られている 129 系と他の系統との F1 を作出し、さらに効率が改善するかどうか検討を行った。その結果、DBA/2 x 129/Sv-ter の遺伝子型による未成熟セルトリ細胞を用いた核移植クローンの効率が最も高く、胚移植あたり 10% の効率で出生することが明らかになった。また発現アレルを特定するために必要な実験用マウスと野生マウス (JF1 など) の F1 も、129 系と JF1 の F1 をドナーとして用いたところ、卵丘細胞、セルトリ細胞、成体線維芽細胞のいずれからも体細胞クローンを作成することができ、129 系ゲノムが核移植クローンの効率を改善することが確認できた。

2) クローン胎仔および胎盤の遺伝子発現および表現型解析：クローン胎仔および胎盤の内在性遺伝子発現および発現型を詳細に解析した結果、体細胞核移植クローン技術は、配偶子形成時に確立したゲノム刷込み記憶には影響を与えないが、マウス体細胞クローン特有の胎盤過形成には、一部の遺伝子発現の低下が関与していることが明らかになり、完全なコピーは作製できないことが明らかになった。しかし分娩期まで発生した胎仔の 93% (144/155) が正常に呼吸し、育つことを確認した。そこで核移植クローン技術の長期的な影

響については明らかにするために、12匹の B6D2F1 セルトリクローンマウスを長期飼育し、その間に体重変化、血清生化学値を測定し、さらに寿命の観察を行った。体重の増加に対照と差は認められなかったが、調べた 16 項目の血清生化学値のうち LDH と アンモニアの有意な上昇が認められた。最終的にクローンマウスでは有意に早期の死亡が生じたが、12 匹すべてについて繁殖力は確認できた。死亡したクローン個体の病理学的観察から、以上のように、体細胞核移植クローン技術により長期的に予想困難な表現形が現れる可能性が示唆されたが、繁殖力には影響は与えず、マウスの系統維持に有効な手段であることがわかった。

### 3-2 マウスの顕微授精技術

1) 新生仔期生殖細胞からの産子の作出：雄性生殖細胞、いわゆる「first wave」でのゲノム刷込みの進行を確認するために、生後 15 日から 22 日までの雄マウスの精巣から取り出した円形精子細胞を用いて顕微授精を行った。すでに報告されているとおり、17 日から明らかな円形精子細胞が発生しており、これらの精子細胞から産子が得られた。よって少なくとも大部分の刷込み遺伝子は、性成熟前の精子発生の段階で正常なゲノム刷込みを受けていることが確認された。この技術は、コンジェニック近交系の早期確立にも役立つことが期待される。

2) 精原幹細胞移植由来精子細胞による産子の作出：最も幼弱な精子細胞である精原幹細胞を allogeneic の精細管内へ移植し産子を作ることができれば、系統の保存手段として有効である。そこでマーカーとして EGFP 遺伝子を有する C57BL マウスの精原幹細胞を C3H/HeJ の精細管内へ移植し、精子発生の観察を行った。その結果、2 ヶ月より減数分裂終了後の円形精子細胞が出現するが、3 ヶ月以降は拒絶反応により精子細胞が脱落するため、交配による産子作出は困難であった。そこで、2 ヶ月においてこれらの円形精子細胞を用いて顕微授精を実施した結果、正常な産子が得られ、allogeneic な組み合わせでも顕微授精技術を応用することにより移植精原幹細胞由来の産子の作出が可能であることが明らかになった。

3) 不妊遺伝子治療による産子の作出：雄 Sl/Slid マウスは、セルトリ細胞の機能不全により精子細胞が分化せず、完全雄性不妊を呈することが知られている。そこでセルトリ細胞へ欠失した Sl 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入した。その結果、一部のマウスの精細管で精子発生が誘起され、得られた精子細胞を顕微授精に用いることにより、正常産子が得られることを明らかにした。

4) 顕微授精によるトランスジェニックマウスの作出：顕微授精と同時に DNA を導入することによりトランスジェニックマウスが作出できることが報告されている。さらにその技術を実用化するために、DNA 濃度の適正化、および精子細胞への応用を実施した。その結果、DNA 濃度は 3 pg/ul 程度が適切であり、また精子細胞を用いても効率よくトランスジェニックマウスが作出できることが明らかになった。

### 3-3. ラットの核移植クローン技術

ラットの卵子は、採卵後に急速に MII 期（第二減数分裂中期）から脱してしまうのが欠点であり、これは核移植クローンを実施する上での最大の障害になる。その時間的経過を追ったところ、採卵用雌の屠殺直後から卵子が活性化することが明らかになった。核移植後の卵子活性化方法には、ストロンチウム処理が有効であることを明らかにした。

### 3-4. ラットの顕微授精技術

ラットの顕微授精をピエゾマイクロマニピュレーターを用いて実施することに成功した。注入ピペットを可能な限り細くし、分離精子頭部全体をピペットへ吸引するのではなく、先端にひっかける形で注入後の生存率を改善した。その結果、約 80% の卵子が生存し、その一部は胚移植後に産子へ発生した。精子を採取したラットは GFP 遺伝子のトランスジェニックラットであり、同時にこの方法がトランスジェニックラットの継代に有効であることを示した。同様に円形精子細胞を用いて産子を作出することに成功した。

### 3-5. ウサギの核移植クローン技術

ウサギの核移植クローン技術を開発する目的で、除核方法、ドナー核移植法、卵子活性化方法の改良を行った。除核は、卵子を短時間遠心処理をすることにより MII 染色体を可視化し確実な除核を可能にした。ドナー核の移植は、卵子細胞質内注入法を応用することにより短時間で核移植を修了することを可能にした。

卵子活性化法は、単回の細胞内カルシウムイオン上昇でなく、正常の受精と同様の反復上昇（カルシウムオシレーション）を誘起するために IP3 のエレクトロポレーションを行った。これらの技術的改善により、これまで報告のなかった妊娠中期以降の器官発生の明らかな生存クローン胎児を得ることに成功した。

### 3-6. ウサギの顕微授精技術

マウスと同様のピエゾマイクロマニピュレーターをウサギ顕微授精に応用することにより、卵子の生存率および発生率を改善させることに成功した。新鮮精子から正常産子を得るとともに、凍結精子を用いても正常胎児を得ることに成功した。さらにその応用として、マウス精巣内へ移植したウサギ新生仔精細管で発生させた精子を用いて産子を得ることに成功した。

## 4. 考察

核移植クローン技術および顕微授精技術はいずれも系統動物の保存および新規開発に非常に有効な手段である。しかし、マウスは未受精卵が体外での操作に敏感であるために、これらの技術は家畜に比べて高度な技術が必要であると言える。本研究では、用いるドナー細胞の種類を検討や各種実験条件の適正化をすることにより核移植クローン技術および顕微授精技術の2つの技術の効率を実用レベルまで上げ、さらに核移植技術由来胎児および産子の解析、そして顕微授精技術のさらなる高度な応用の可能性を示すことができた。

ラットはまたマウスとは異なり、卵子が体外で MII から脱しやすいという欠点があるが、採卵後の時間を短縮することにより、顕微授精由来の産子を得ることができた。一方、ラットクローン作出は培養液の改善などさらなる技術的改良が必要である。

ウサギはこれまで報告のなかった妊娠中期以降の器官発生の明らかな生存クローン胎児を得ることに成功した。卵子活性化法には、単回の細胞内カルシウムイオン上昇でなく、正常の受精と同様の反復上昇（カルシウムオシレーション）を誘起するために IP3 のエレクトロポレーションを行った。ウサギの卵子は、他の動物の卵子と異なり、活性化に反復刺激が必要であることが知られており、より自然な刺激により卵子が活性化していることが推測される。今後はこれらのクローン胎仔が産子まで発生するかどうか確認する予定である。ウサギの顕微授精では、新鮮精子を用いる限りは安定した成績が得られることを明らかにした。凍結融解精子が卵子活性化能を欠失しているのは原因が不明であるが、同じウサギ凍結融解精子を用いてマウスの卵子が活性化されることから、ウサギの卵子の活性化のための条件がより高いことが示唆される。いずれの実験においてもウサギ卵子活性化処理の改善が今後の成功のカギになると思われる。次年度はより安定した、卵子へダメージの少ない卵子活性化処理を開発する予定である。

## 5. まとめ

マウス、ラット、ウサギについて核移植クローン技術および顕微授精技術の開発を行った。卵子の性質から最も困難であることが判明したラット核移植クローン以外は、それぞれ胎児あるいは正常産子を得ることに初めて成功、あるいは効率を実用レベルまで改善できた。これらは疾患モデル動物の保存あるいは開発に大いに役立つと期待される。

## 6. 研究発表

- 1) Hirabayashi, M., Kato, M., Aoto, T., Sekimoto, A., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N., & Hochi, S. Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Research*, 2002 (in press).
- 2) Hirabayashi, M., Kato, M., Aoto, T., Ueda, M., & Hochi, S. Rescue of infertile transgenic rat lines by intracytoplasmic injection of cryopreserved round spermatids. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002 (in press).
- 3) Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., & Ogura, A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 295, 297, 2002.
- 4) Itoh, M., Matsuda, J., Suzuki, O., Ogura, A., Oshima, A., Tai, T., Suzuki, Y., & Takashima, S. Development of lysosomal storage in mice with targeted disruption of the beta-galactosidase gene: a

model of human GM1-gangliosidosis. *Brain Dev.*, 23, 379-384, 2001.

5) Kanatsu-Shinohara, M., Ogura, A., Ikegawa, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Tashiro, K., Toyokuni, S., Honjo, T., & Shinohara, T. Adenovirus-mediated gene delivery and in vitro microinsemination produce offspring from infertile male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 1383-1388, 2002.

6) Kato, M., Hirabayashi, M., Aoto, T., Ito, K., Ueda, M., & Hochi, S. Strontium-induced activation regimen for rat oocytes in somatic cell nuclear transplantation. *J. Reprod. Dev.*, 47, 407-413, 2001.

7) Kim, J. M., Ogura, A., Nagata, M., & Aoki, F. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in the embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 2002 (in press).

8) Kobayashi, S., Kohda, T., Ichikawa, H., Ogura, A., Ohki, M., Kaneko-Ishino, T., & Ishino, F. Paternal Expression of a Novel Imprinted Gene, Peg12/Frat3, in the mouse 7C Region Homologous to the Prader-Willi Syndrome Region. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 403-408, 2002.

9) Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuk, R., Kohda, K., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A., & Ishino, F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 2002 (in press).

10) Mochida, K., Matsuda, J., Suzuki, O., Nakahira, M., Noguchi, A., Nakayama, K., Kurosawa, S., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., & Ogura, A. Development of reproductive biotechniques in mastomys. In: *Reproductive Biotechnology*, edited by Manabe, N. and Miyamoto, H. Kyoto:Hokuto Shobo, 2001, p. 279-284.

11) Nakada, K., Inoue, K., Chen, C. S., Nonaka, I., Goto, Y., Ogura, A., & Hayashi, J. I. Correlation of functional and ultrastructural abnormalities of mitochondria in mouse heart carrying a pathogenic mutant mtDNA with a 4696-bp deletion. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 901-907, 2001.

12) Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y., Nonaka, I., & Hayashi, J. I. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med*, 7, 934-9, 2001.

13) Ogonuki, N., Inoue, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Tanemura, K., Suzuki, O., Nakayama, H., Doi, K., Ohtomo, K., Satoh, M., Nshida, A., & Ogura, A. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet*, 30, 253-254, 2002.

14) Ogonuki, N., Sankai, T., Yagami, K., Shikano, T., Oda, S., Miyazaki, S., & Ogura, A. Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biol. Reprod.*, 65, 351-357, 2001.

15) Ogura, A. Microinsemination and nuclear transfer with male germ cells. In: *Principles of Cloning*, edited by Cibelli, J. B., Lanza, R., Campbell, K., and West, M. D. San Diego:Academic Press, 2001, p. .

16) Ogura, A., Inoue, K., Mochida, K., Ogonuki, N., & Yanagimachi, R. Fertilization without spermatozoa. *Ital J Anat Embryol.*, 106, 3-10, 2001.

17) Ogura, A., Ogonuki, N., Takano, K., & Inoue, K. Microinsemination, nuclear transfer, and cytoplasmic transfer: the application of new reproductive engineering techniques to mouse genetics. *Mammalian Genome*, 12, 803-812, 2001.

18) Ohba, Y., Ikuta, K., Ogura, A., Matsuda, J., Mochizuki, N., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mayer, B. J., Maki, K., Miyazaki, J., & Matsuda, M. Requirement of C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J.*, 20, 3333-3341, 2001.

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社