

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 理化学研究所バイオリソースセンター

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
- (3) 国立感染症研究所獣医科学部 松田潤一郎

要 旨

疾患モデル動物のための新規発生工学技術の開発を進めた。その結果、マウス、ウサギ、ラットの体細胞クローン技術の効率改善および応用としてマウス、ウサギ、ラット、マストミス、カニクイザルの顕微授精技術の新規開発およびその応用に成功した。

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他の齧歯類、ウサギ、サルなど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、マストミス、ウサギ、カニクイザルを用いて新規開発あるいは実用化を行った。また、ラットについては核移植クローン技術が極めて難しいことから、ジーンターゲットングのためのもう一つの方法である胚性幹細胞(ES 細胞)の樹立をめざした。

2. 研究方法

核移植クローン技術:除核未受精卵子ヘドナー体細胞核を注入、あるいは電気融合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、成体線維芽細胞、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:マウス、ラット、マストミス、ウサギ、カニクイザルいずれの動物種においても通常の成熟精子に加えて精子細胞(円形あるいは伸張精子細胞)を用いて顕微授精を行った。一部卵子活性化因子を欠くあるいは不十分な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。

ES 細胞の作出:ラットおよびウサギの受精卵あるいは核移植胚の内細胞塊を用いてマウスあるいはサルの既報に従って実施した。

3. 研究成果

3-1 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: 2種類のドナー細胞(卵丘細胞および新生仔セルトリ細胞)と9種類の遺伝子型の18通りの組合せでクローンを行い、その結果を2x6 factorialの2-way ANOVAで解析した(表1)。胚移植後に細胞種による有意差が観察され(セルトリ細胞で高効率)、また2要因間に交互作用が観察された(表2)。セルトリ細胞で4種類の遺伝子型を組み合わせた時に胚移植当たり約10%の産子率を得るまでに改善した。

2) 始原生殖細胞を用いた核移植クローン: 昨年までのマウス始原生殖細胞(PGC)を用いた核移植クローン

実験により、PGCは胎齢11.5日には刷込み遺伝子の differentially methylated region(DMR)の脱メチル化が開始され、12.5日には終了することを明らかにした。そこで、11.5日のPGCにおけるメチル化状態およびゲノムの全能性をさらに検討するために、1)で述べた有効な遺伝子型を用いて核移植クローンを実施した。その結果、初めて正常12.5日齢クローン胎仔を得ることができた(図1)。

3) マウス着床後の胚の脱落原因の解明: マウス核移植クローン胚は、およそ半数が桑実期胚/胚盤胞に達し、そのまた約半数が着床するが、実際に産子まで発生するのは数%に過ぎない。そこで Day 9.5 日のレシピエント子宮を組織学的に観察したところ、i) 約60%の着床部位に栄養膜細胞浸潤(trophoblastic invasion)が見られず、実質的な着床をしていない(脱落膜反応のみ)、ii) 残りの多くは卵黄囊胎盤および尿膜絨毛膜胎盤を形成するが、未分化の二倍体栄養膜細胞の数が著しく少ないため、胎盤基底層(basal layer)が発達していないことが判明した。よって着床直後の栄養膜層の増生低下がクローン胚の着床直後の致死発生低下の大きな原因であると考えられた。この栄養膜層の増生低下を補償する目的で、通常受精卵四倍体胚とクローン胚のキメラを作製し、胚移植を行って正常なクローン胎仔を得た。

4) ラットの核移植クローン技術およびES細胞作出の試み: 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。ラットES細胞の樹立・培養にはマウスES細胞培養用培地の組成では不十分であること、未分化状態の維持が困難であること、そして、ラット未分化幹細胞の増殖能を持続させるための培地組成を検討する必要があることが判明した。

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終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の電位操作を行った。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。

3-2 顕微授精技術

1) マウス新生仔期生殖細胞からの産子の作出: 新生仔の雄性生殖細胞、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) マウス精原幹細胞移植由来精細胞による産子の作出: 最も幼弱な精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成することができれば、系統の保存手段として有効である。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。2ヶ月において拒絶直前に発見された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) マウス不妊遺伝子治療による産子の作出: 雄SI/Sldマウスは、セルトリ細胞の機能不全により精細胞が分化せず、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SI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) マウス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3pg/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。

5) 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成することに成功した。

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、卵子活性化能を失った凍結精子を用いても人為的活性化により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。

7) マストミスの顕微授精: マストミスは、アフリカ産の小型齧歯類実験動物である。体外受精が困難で、またラットと同様に精子頭部が大きく顕微授精が難しい。そこで、より注入が容易な精子細胞を用いて顕微授精を行ったところ、伸長精子細胞から正常産子を得た。ラット型齧歯類の顕微授精の良いモデルであると思われる。

8) カニクイザルの顕微授精: カニクイザルの顕微授精を試みた。これまでに、カニクイザルでは注入が容易な円形精子細胞でも卵子が活性化されることから、この細胞を用いた顕微授精と胚移植を試みた。胚移植後、1例の妊娠を得たが、妊娠後期に原因不明で流産した。これは、サル類初めての円形精子細胞に妊娠であり、今後さらなる応用が期待される。

4. 考察・まとめ

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、マウスは未受精卵子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。

ウサギクローンも昨年、フランスから成功例が報告されたのみで極めて技術的にむずかしいが、今回、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。ウサギの ES 細胞は樹立されていないので、核移植クローンを用いたジーンターゲットングが期待される。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。

マストミスおよびカニクイザルも、疾患モデルや再生医療などさまざまな利用が期待される実験動物である。本研究では、これらの動物の顕微授精技術の確立に成功したことから、安定した維持供給に役立つことが期待される。

以上のように、核移植クローンは、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。また、顕微授精も試みたすべての実験動物で成功した。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。

5. 研究発表

- 1) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, K., Kogishi, T., Honjo, T., & Shinohara, T. Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. *Biol. Reprod.* **68**, 167-173 (2003).
- 2) Ogonuki, N., Mochida, K., Inoue, K., Matsuda, J., Yamamoto, Y., Takano, K., & Ogura, A. Fertilization of Oocytes and Birth of Normal Pups Following intracytoplasmic Injection with Spermatids in Mastomys (*Praomys coucha*). *Biol. Reprod.*, in press (2003).
- 3) Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Hirose, Y., Okada, H., Ogura, A., & Sankai, T. Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.*, in press (2003).
- 4) Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., & Mochida, K. New microinsemination techniques for laboratory animals. *Theriogenology* **59**, 87-94 (2003).
- 5) 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* **11**, 221-228 (2002).
- 6) 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.* **62**, 295-299 (2002).
- 7) Ikawa, M., Tergaonkar, V., Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., & Verma, I. M. Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: Offspring from infertile mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7524-7529 (2002).
 - 8) 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).
 - 9) Inoue, K., Ogonuki, N., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Takeiri, S., Nakata, K., Miki, H., Kurome, M., Nagashima, H., & Ogura, A. Improved postimplantation development of rabbit nuclear transfer embryos by activation with inositol 1,4,5-trisphosphate. *Cloning Stem Cell* **4**, 311-317 (2002).
 - 10) Inoue, K., Ogura, A., & Hayashi, J. Production of mitochondrial DNA transgenic mice using zygotes. *Methods* **26**, 358-63 (2002).
 - 11) 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).
 - 12) Kashiwabara, S., Noguchi, J., Zhuang, T., Ohmura, K., Honda, A., Sugiura, S., Miyamoto, K., Takahashi, S., Inoue, K., Ogura, A., & Baba, T. Regulation of spermatogenesis by testis-specific, cytoplasmic poly(A) polymerase TPAP. *Science* **298**, 1999-2002 (2002).
 - 13) 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.* **67F760-766**, 67F760-766 (2002).
 - 14) 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).
 - 15) Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., 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* **129**, 1807-1817 (2002).
 - 16) 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).
 - 17) Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Lee, J., Kohda, T., & Ishino, F. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning Stem Cell* **4**, 397-405 (2002).
 - 18) Ogura, A., Ogonuki, N., & Inoue, K. 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, 2002, p. 175-186.
 - 19) Shinohara, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Nakata, K., Kurome, M., Nagashima, H., Toyokuni, S., Kogishi, K., Honjo, T., & Ogura, A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular piece and in vitro microinsemination. *Hum. Reprod.* **17**, 3039-3045 (2002).
 - 20) 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).
 - 21) 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).
 - 22) 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).
 - 23) 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).

- 24) 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).
- 25) 井上貴美子, 越後貫成美, 持田慶司, & 小倉淳郎 体細胞クローンマウスの異常 蛋白質核酸酵素 47, 1789-1796 (2002).
- 26) 小倉淳郎 クローンは正常か? 遺伝 56, 24-26 (2002).
- 27) 小倉淳郎 疾患モデルとしてのクローンマウス 医学のあゆみ 203, 499-502 (2002).

6. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

表 1. ささまざまなドナー細胞種および遺伝子背景を用いたクローン胚の発生.

Cell type	Genotype	No. of replicates	No. cultured	% morula/blastocyst±SE		No. transferred	% implanted±SE	No. of pups	% pups±SE
				% cleaved±SE	per cultured				
Cumulus	BDF1	12	689	76.6± 2.8	55.3± 3.5	72.0± 3.5	53.7± 5.3	10	2.2± 0.8
	129×B6	5	455	69.3± 8.2	46.6± 5.5	67.3± 4.3	49.9± 4.3	5	3.2± 1.3
	B6×129	3	293	66.6± 4.8	47.6± 6.9	70.7± 5.2	51.9± 5.8	0	0.0
	129	4	451	77.0± 2.7	56.2± 3.1	72.9± 1.6	55.3± 6.5	1	0.3± 0.3
	129×129	3	594	73.6± 7.2	52.8± 3.2	72.4± 3.4	50.2± 7.5	4	1.3± 0.2
	DBA×129	2	475	81.7± 0.0	61.9± 4.7	75.9± 5.8	30.7± 9.1	4	1.3± 0.6
	(Cumulus total)	(29)	(2957)	(74.4± 2.1)	(53.3± 2.0)	(71.5± 1.7)	(51.2± 2.8)	(24)	(1.6± 0.4)
Sertoli	BDF1	14	875	58.8± 4.0	31.7± 4.0	53.5± 6.3	42.3± 4.8	9	3.1± 1.2
	129×B6	3	421	77.4± 6.8	53.9± 2.0	71.1± 8.1	47.0± 1.7	12	5.1± 1.1
	B6×129	3	205	66.0± 9.8	53.4± 9.3	80.2± 3.6	55.5± 5.0	12	10.8± 2.1
	129	3	368	65.0± 8.4	58.1± 9.2	89.0± 3.4	57.8± 2.7	10	5.0± 0.3
	129×129	3	316	52.9± 3.2	36.7± 8.0	68.3± 12.8	40.5± 6.5	6	5.8± 1.0
	DBA×129	2	298	67.1± 6.0	59.7± 6.0	88.9± 10.0	55.7± 6.8	16	9.5± 5.5
	(Sertoli total)	(28)	(2483)	(62.2± 2.7)	(42.1± 3.3)	(66.6± 4.3)	(46.7± 2.8)	(65)	(5.1± 0.9)

表 2. クローンの効率に対するドナー細胞種および遺伝子背景の影響 (二元分散分析)

	2-cell	Morula/ blastocyst (per cultured)	Morula/ blastocyst (per cleaved)	Implantatio n	Pups
Cell type	<0.005	<0.001	NS	NS	<0.005
Genotype	NS	NS	NS	NS	NS
Interaction	NS	<0.01	<0.05	NS	<0.05

NS, no significant difference.

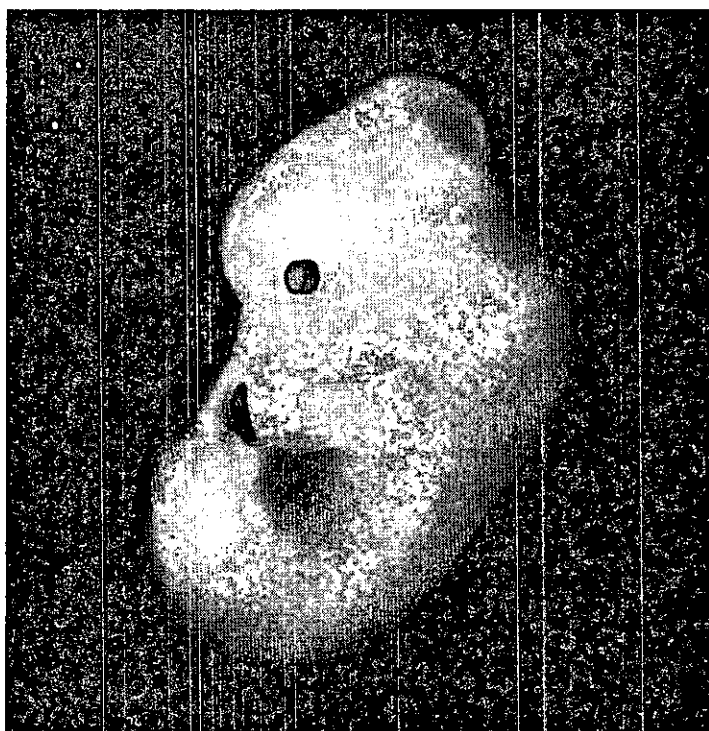


図 1. 胎齢 11.5 日始原生殖細胞由来の核移植クローン胎仔。初の 12.5 日齢正常胎仔。