

平成15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

# 目 次

課題番号

KH11001

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の  
開発研究

川西 徹 …… 1

KH11002

ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・応用に関  
する研究

今井一洋 …… 11

KH11003

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

小倉淳郎 …… 19

KH11004

トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バ  
ンクの検討

小林英司 …… 25

KH11005

癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；単クローン抗体  
からペプチドへの展開

石坂幸人 …… 32

KH11006

遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解  
析

田上昭人 …… 37

KH11007

新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移  
抑制方法の開発研究

鈴木和博 …… 53

KH11008

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関す  
る研究

切替照雄 …… 65

KH12079

超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス医薬品の開  
発とその実践的応用

今西 武 …… 78

KH12084

コンディショナルノックインによる受容体機能変換マウス作成  
と情報伝達機構の解析

笹岡俊邦 …… 82

## 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

研究要旨 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、マウス核移植クローン実験から、成体幹細胞ゲノムは必ずしも再プログラム化されやすくはないこと、生殖細胞ゲノムは完全に再プログラム化されうることを明らかにした。また、ラットの ES 細胞を作出するための技術的問題点を明らかにした。ウサギの顕微授精では、未成熟精子(精子細胞)を用いて正常産子を得られることを明らかにした。また、これらの発生工学技術の基礎となる、卵子発生能獲得に関与する遺伝子の候補を挙げる事ができた。

### 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

### A. 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。さらに、これらの発生工学技術に必須である発生能の高い卵子採取のための基礎遺伝子研究も実施した。

### B. 研究方法

核移植クローン技術は、除核未受精卵子へ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、始原生殖細胞、成体幹細胞、分化リンパ球を用いた。顕微授精技術は、マウス、ウサギいずれも通常

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。胚移植は、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。

卵子成熟過程に関する遺伝子検索のためには、17 および 24 日齢の Slc:B6D2F1 マウス卵巣内卵胞から卵丘細胞に囲まれた卵子を採取し、体外成熟した。またサブトラクション法による 24 日齢由来卵子特異的遺伝子の検索のために、17 日齢及び 24 日齢の Slc:B6D2F1 マウスに由来する体外成熟卵子から Cell-to-cDNA kit (Ambion)にて TotalRNA を抽出し、それぞれ卵子 10 個相当の Total RNA を用いて BD Super SMART PCR cDNA Synthesis kit (Clontech)により cDNA ライブラリを作成した。今回は、17 日齢由来卵子に比べ 24 日齢由来卵子に多く発現している産物を検出するため、PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech)を用いて、24 日齢由来卵子特異発現サブトラクションライブラリを作成した。得られたライブラリを pGEM-T ベクターにサブクローニングの後、得られたサブクローンについてサンガー法を用いて DSQ-2000L (島津製作所)にて核酸配列を決定した。得られた配列について NCBI BLAST 検索により既知配列との比較を行った。同定された遺伝子のうち、いくつかについて SYBR Green 法 (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; QIAGEN)を用いて ABI PRISM7900HT (アプライドバイオシステムズ)にて定量的リアルタイム PCR 法により差次的発現を確認した。  
(倫理面への配慮)

QIAGEN)を用いてABI PRISM7900HT(アプライドバイオシステムズ)にて定量的リアルタイム PCR 法により差次的発現を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、それぞれの動物実験施設の関連委員会で動物福祉上の倫理的問題がないことを了承された後に実施した。

## C. 研究結果

### 1 核移植クローン技術

造血幹細胞を用いた核移植クローン:胚盤胞期クローン胚の細胞数はHSCが平均25.6個(n=27)、卵丘細胞が27.8個(n=11)で、両者に差は見られなかった。また、活性化11.5時間後の両クローン胚において、BrUTPの取り込み量によりそれぞれの転写活性を比較したところ、やはり両者に差は見られなかった。更に、血球細胞に特異的に発現しているCD45はHSCクローン胚では発現していないことを抗体染色により確認した。従って、HSCクローン胚におけるリプログラミングは卵丘細胞と同程度に行われていると推測された。しかしながら、活性化48時間後における両クローン胚の4/8cellへの発生率はHSCクローン胚が21.8%(120/550)、卵丘細胞クローン胚が52.1%(1941/3695)であり、HSCクローン胚の発生率は卵丘細胞に比べて有意に低かった( $P < 5.0 \times 10^{-6}$ )。従って *in vitro* では、幹細胞におけるクローン作出効率に対する優位性は見られていない。

始原生殖細胞(PGC)を用いた核移植クローン: PGC特異マーカーを持つトランスジェニックマウス胎仔からPGCを採取し、核移植クローンを行った。これまでに産子3匹が得られており、生殖細胞として分化を開始した後も、ゲノム刷込みが残っている限り、完全な再プログラム化が生じる。また、分娩期まで達した産子および胎盤計11例について、3種類のゲノム刷込み遺伝子(*Peg3*, *Peg5*, *H19*)のdifferentially methylated regions(DMRs)のメチル化を調べたところ、すべてメチル化と脱メチル化のalleleが観察された(図1)。よって、刷込み遺伝子記憶が消去されていないPGCのみが分娩期まで発生することが明らかになった。

129系マウスの核移植における正常性について:129系マウスドナーの高効率クローンの原因を検討するために、まず全能性維持に関わる因子であるOct-3/4のプロモーター+GFP遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて卵丘細胞由来胚盤胞の蛍光を観察した。129系背景の場合に蛍光強度が強いことが明らかになった。また、着床後に核移植胚では胎盤外円錐細胞が著減するが、129系由来では正常に増殖していた。129系卵丘細胞クローンの胎盤は、その大きさも組織学的構造も正常であった。以上から、129系マウスのゲノムは、マウス体細胞核移植クローンの典型的な初期胎盤形成不全を生じることがなく、これが129系体細胞核移植ク

ローンの良好な効率につながっていることが示唆された。

### 2. 顕微授精技術

繁殖障害マウス系統の継代への応用:遺伝子改変によって精子の異常(形態、運動性)等の繁殖障害が生じ、かつ体外受精も困難なマウス系統(ノックアウト3系統およびトランスジェニック1系統)に対し、精子あるいは未熟精子(精子細胞)を用いて顕微授精を行った。精子頭部および尾部の奇形の程度にかかわらず、全ての系統で産仔を得ることができた。また、BRCにおいて繁殖率の低下が著しい近交系2系統についても産仔獲得に成功した。以上のように、顕微授精を用いた低繁殖マウス系統の維持は、実用化したと言える。

精原幹細胞移植由来精細胞からの産仔の作出:様々な条件下で実施した精原幹細胞移植由来の精細胞を用いて顕微授精を行い、正常産仔が得られるかどうかを検討した(京大篠原研究室との共同研究)。1)胎齢8.5日および12.5日由来の始原生殖細胞、2)新生仔精巣細胞を体外培養した40日後の株化精原幹細胞、3)凍結保存した株化精原幹細胞をそれぞれ未成熟雄マウス精細管に移植した。移植細胞由来の精子あるいは精細胞を用いて顕微授精を行ったところ、全ての試験区において正常産仔を得ることが出来た。この株化精原幹細胞はES細胞と異なり、生後の個体からも樹立でき、生体環境に戻すことにより容易に正常精子に分化し産仔が得られる。今後、生殖工学あるいは医学に新しい可能性をもたらすと期待される。

ウサギの顕微授精技術の開発:マウス卵子に注入した際の卵子活性化率は新鮮精子、伸長精子細胞、円形精子細胞でそれぞれ77、61、73%だった。同種間顕微授精では活性化(前核形成)率はそれぞれ100、59、29%、分割率は74、55、20%、120時間後の胚盤胞への発生率は47、33、4%であった。円形精子細胞については異種間で得られた活性化能は同種間では反映されていないことが分かった。そこで円形精子細胞注入直後に卵子に活性化刺激を与えたところ、前核形成から胚盤胞まで全てのステージにおいて発生率が向上した。顕微注入後120時間における胚盤胞の細胞数は、伸長および円形精子細胞由来胚が*in vivo*受精胚よりも有意に少なかった( $P < 0.01$ )。また精子由来胚のばらつきが最も大きかった。胚移植後、精子(4匹/16個移植)および伸長精子細胞(3/26)からは産仔が得られたが、円形精子細胞からは得られていない。

### 3. 卵子成熟過程責任遺伝子の検索

サブトラクションライブラリのサブクローン20個についてシーケンスを行ったところ、ライブラリ由来配列を含むものは15個で、そのうちNCBIのBLAST検索により同定できたものは12個であった。そのうち、8遺伝子について定量用プライマーを設計し、GAPDHを内部標準としてmRNA量を測定した。

#### D. 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。

昨年度までに、顕微授精も試みたすべての実験動物(マウス、ラット、ウサギ、マストミス、カニクイザル)で成功した。今年度は、その応用として、1) 繁殖障害マウス系統の継代への応用、2) 精原幹細胞移植由来精細胞からの産子の作出、3) ウサギの未成熟精子を用いた顕微授精の開発を行った。これらはすべて、産子の作出に成功し、顕微授精技術が、他の生殖工学技術あるいは遺伝子工学技術と組み合わせて、さらに高度な研究に利用できることが明らかになった。以上のように、核移植クローン技術および顕微授精技術は、今後の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。これまでの核移植クローンが成功したドナー細胞種とその性質を表1にまとめた。また、顕微授精技術の開発結果を表2にまとめた。

前年度の成果として、各日齢のマウスから得られた体外成熟卵子の受精後の胚発生率の結果により17日齢以降からB6D2F1卵子の発生能獲得が行われること、特に18日齢から24日齢の間で胚盤胞形成能が高まる傾向があることが判明している。このことを踏まえて、発生能を反映する遺伝子の検索をサブトラクション法を用いて行ったところ、24日齢由来体外成熟卵子には、17日齢由来体外成熟卵子に比べてOB-RGRPやTacc3, LipoTなどが優位に発現している傾向が示唆されたが、培養群によりバラつきも大きく、今後さらなる検討が必要であると考えている。卵子における、これら遺伝子の差次的発現が「発生能獲得のために産生される(原因としての発現)」のか「発生能獲得の結果として産生される(結果としての発現)」のかは現時点では確定できてはいない。OB-RGRPはLeptin Receptorと遺伝子座位を共有するが、異なる発現形式をとる遺伝子として見つかっており、Leptinに関連する成長因子がオートクライン型(分泌物が自分自身に効く)や、卵子を囲む卵丘細胞へのパラクライン型(分泌物が近接細胞へ効く)で関与する機構も考えられる。体外成熟培養系へ各種成長因子等の付加を試みるのも手であろう。一方、後者であれば「発生能獲得のマーカ一遺伝子」としての利用が考えられ、得られた卵子において何らかの方法でこれら遺伝子の発現量がモニター

可能であれば、それをもとに良質卵子を選定する方法として使う可能性も考えられよう。

#### E. 結論

マウス核移植クローン実験から、成体幹細胞ゲノムは必ずしも再プログラム化されやすくないこと、生殖細胞ゲノムは完全に再プログラム化されうることを明らかにした。また、ラットのES細胞を作出するための技術的問題点を明らかにした。ウサギの顕微授精では、未成熟精子(精子細胞)を用いて正常産子を得られることを明らかにした。また、これらの発生工学技術の基礎となる、卵子発生能獲得に関与する遺伝子の候補を挙げることができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Yamamoto, Y., Takano, K., Kohda, T., Ishino, F., and Ogura, A. Effects of Donor Cell Type and Genotype on the Efficiency of Mouse Somatic Cell Cloning. *Biol. Reprod.*, 69: 1394-1400, 2003.
- 2) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells. *Biol. Reprod.*, 69: 612-616, 2003.
- 3) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum. Reprod.*, 18: 2660-2667, 2003.
- 4) Ogonuki, N., Mochida, K., Inoue, K., Matsuda, J., Yamamoto, Y., Takano, K., and Ogura, A. Fertilization of Oocytes and Birth of Normal Pups Following Intracytoplasmic Injection with Spermatids in *Mastomys (Praomys coucha)*. *Biol. Reprod.*, 68: 1821-1827, 2003.
- 5) Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Hirose, Y., Okada, H., Ogura, A., and 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.*, 18: 1273-1280, 2003.
- 6) Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., and Mochida, K. New microinsemination techniques for laboratory animals. *Theriogenology*, 59: 87-94, 2003.
- 7) Fulka-Jr, J., Miyashita, N., Nagai, T., and Ogura, A. Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nat Biotechnol*, 22: 25-26, 2004.
- 8) Goto, Y., Manabe, N., Uchio, K., Yamaguchi-Yamada, M., Inoue, N., Yamamoto, Y., Ogura, A., Nagano, N.,

and Miyamoto, H. Augmented cytoplasmic Smad4 induces acceleration of TGF-beta1 signaling in renal tubulointerstitial cells of hereditary nephrotic ICGN mice with chronic renal fibrosis; possible role for myofibroblastic differentiation. *Cell Tissue Res*, 315: 209-221, 2004.

9) Inoue, K., Ogonuki, N., Yamamoto, Y., Takano, K., Miki, H., Mochida, K., and Ogura, A. Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis*, (in press), 2004.

10) Kai, M., Irie, M., Okutsu, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Yokoyama, M., Migishima, R., Muguruma, K., Fujimura, H., Kohda, T., Ogura, A., Kaneko-Ishino, T., and Ishino, F. The Novel Dominant Mutation Dspd Leads to a Severe Spermiogenesis Defect in Mice. *Biol. Reprod.*, 70: 1213-1221, 2004.

11) Miki, H., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, Y., Mochida, K., Kohda, T., Nagashima, H., Ishino, F., and Ogura, A. Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *J. Reprod. Dev.*, 50: 131-137, 2004.

12) Nakamura, T., Yao, R., Ogawa, T., Suzuki, T., Ito, C., Tsunekawa, N., Inoue, K., Ajima, R., Miyasaka, T., Yoshida, Y., Ogura, A., Toshimori, K., Noce, T., Yamamoto, T., and Noda, T. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking CCR4-associated factor 1, a novel regulator of RXRb. *Nat Genet*, (in press), 2004.

13) Ohgane, J., Wakayama, T., Senda, S., Yamazaki, Y., Inoue, K., Ogura, A., Marh, J., Tanaka, S., Yanagimachi, R., and Shiota, K. The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells*, 9: 253-60, 2004.

14) Noguchi A, Takekawa N, Einarsdottir T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, and Suzuki O. Chromosomal mapping and zygoty check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking. *Exp. Anim.* 53:103-111, 2004 (in press).

15) Koura M, Handa H, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, and Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone  $\beta$ -subunits in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004, (in press).

#### G. 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. 本研究でクローン産子の作出を明らかにしたドナー細胞種とその性質

細胞	特徴	産子/移植
卵丘細胞	細胞の準備、注入が容易。産子を得やすい。	1%
未成熟セルトリ細胞*	注入が容易。産子を得やすい。	4-10%
胎仔線維芽細胞	細胞周期の調節が必要。増殖が早い。	4%
尾部線維芽細胞	個体を生かしたまま細胞を採取できる。細胞膜が強固で、注入法に向かない。	4%
胎仔生殖細胞*	ドナー採取胎齢により胚発生が異なる。	2%
リンパ球*	DNA rearrangement を残したまま個体になる	8%
成体幹細胞*	G0 のため、2-cell 率は高い	1%

\*本研究で初めて可能になった細胞種

表2 本研究における各動物種における顕微授精の成果

種	顕微授精			
	射出精子	精巣上体精子	精巣内精子	精子細胞
マウス		産子	産子	産子
ラット		産子		産子
マストミス		前核期		産子*
ウサギ	産子	産子		産子*
カニクイザル				胎仔

\* 伸長精子細胞

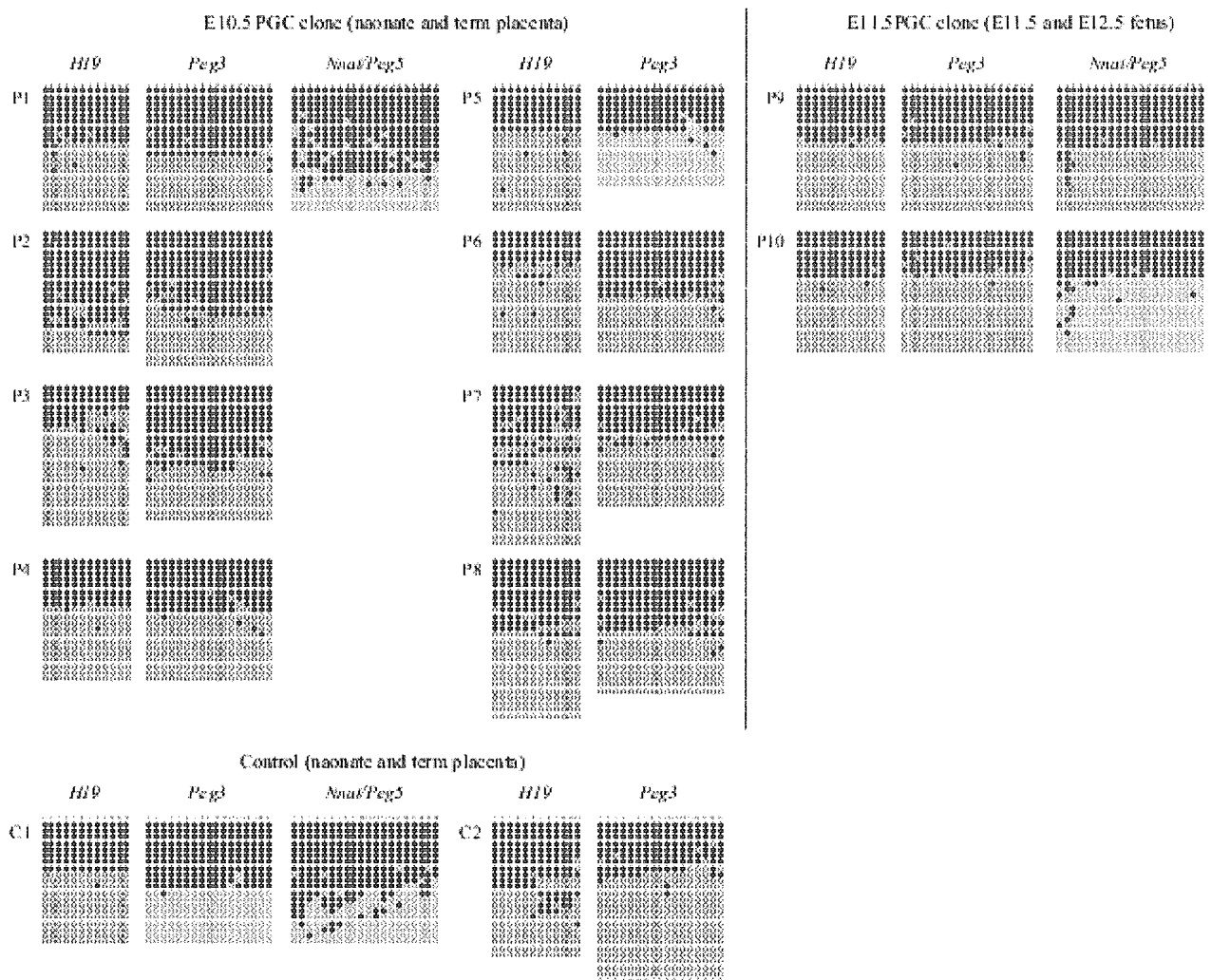


図1. 始原生殖細胞由来クローン(P)およびコントロール(C)の胎仔と胎盤の刷込み遺伝子(*H19*, *Peg3*, *Peg5*)のメチル化状態のbisulfite 解析。メチル化が黒丸、脱メチル化を白丸で表した。メチル化および脱メチル化の両アリルが存在、すなわち刷込み記憶が保たれている始原生殖細胞ゲノムのみがクローンの発生を支持している。



---

平成15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16年9月30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