

氏名(本籍)	わか 若	い 井	たく 拓	や 哉
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 8 6 0 号			
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	ミニブタ体細胞クローン産子作出技術の確立と医科学研究への応用			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤 英 明	
	(副 査)	教 授	小 原 嘉 昭	
		教 授	山 口 高 弘	
		助教授	佐々田 比呂志	

論文内容要旨

1. 緒言

クローン技術とは、核移植により遺伝的に同一な複数の個体を生産する技術で、ドナー細胞として初期胚の割球を用いる受精卵クローンと体細胞を用いる体細胞クローンの二つに大別される。前者のクローン個体は産業動物では優良な家畜を増産することを主な目的とし、1986年に Willadsen がヒツジの8~16細胞期胚の割球を除核した成熟卵子に核移植することで作出することに成功した。一方、体細胞クローン個体の作出は長い間哺乳動物では困難とされていたが、1997年に Wilmut らがヒツジの乳腺細胞の核を核移植して“ドリー”の作出を報告した。この報告は乳腺細胞にヒトの治療を目的とした物質の遺伝子を組み込み、動物工場の機能をもつ遺伝子改変動物を開発することを構想したものであり、体細胞クローン技術が基礎研究のみならず、医療の分野などで社会に貢献する可能性を示すものであった。しかしながら、ドリーの誕生以降、これまでに様々な哺乳動物種で体細胞クローン動物が作出されたものの、いずれにおいてもその出生率は低く、また、産まれた産子の出生直後死や先天性奇形が高頻度に観察され、この低い生産性が遺伝子改変動物を用いた構想の実現における大きな障害となっている。こうした体細胞クローンの異常の原因は現在でも解明されていないが、体細胞クローン技術は核移植操作単独の技術ではなく、レシピエント卵母細胞の成熟培養、ドナー細胞の調整、核移植、活性化処理、胚の発生培養、仮親の発情同期化、胚移植、妊娠仮親の管理と分娩と、一連の過程からなる総合的な技術であり、これらの技術一つ一つを確立することが最終的なクローン動物の効率的な作出に不可欠である。

ブタにおける体細胞クローン技術は、ブタがヒトに近い特性（体サイズ、代謝、食性など）をもつことから、ヒトへの外挿を目的としたモデル動物の開発、あるいは異種移植を目的とした臓器生産ブタを作出する方法として注目されている。しかしながら、ブタの場合、産子を得るための基盤となる繁殖技術の確立がマウスやウシなど他の動物種と比べ立ち遅れていることが大きな問題の一つとなっている。特に、核移植に供するレシピエント卵子の品質の問題が

あげられる。核移植に用いるレシピエント卵子として体内または体外で成熟したものをを用いることが可能であるが、体内成熟卵子の利用は労力・経費の面から非効率的である。一方、体外成熟培養は食肉処理場で採取した卵巣を利用することが可能であり効率的であるが、このようにして得られた体外成熟卵子はその後の発生能力が体内成熟した卵子と比べ劣ることが報告されている。また、良質なクローン胚を作出するだけでなく、仮親の条件も産子を得るための重要な因子である。これまでにミニブタでクローン個体を作出した報告では、胚移植の仮親に家畜ブタを使用しているが、繁殖などを試験するうえで家畜ブタは大規模な管理フィールドを必要とし、一般の研究所での利用が難しい。この点、ミニブタはその体サイズから管理が比較的容易で、遺伝子改変動物を含めた実験・医用動物としての利用に適している。

以上の背景下、本研究では遺伝子改変ミニブタの開発を目的とした体細胞クローン技術の確立を行った。まず、第一に良質なレシピエント卵子を得るための体外成熟培養条件を調べ、ミニブタクローン胚の発生能の改良を行った。次に、胚移植する仮親にミニブタを選択し、仮親の発情を安定的に同期化するためのミニブタ発情誘起法の確立を行った。続いて、確立した方法により作出した胚を発情同期化した仮親へ移植し、体内で個体まで発生するかを検証した。最後に、クローン技術の応用として現在、医科学研究で求められている遺伝子改変ミニブタの開発を目的とした実験を行い、その可能性を検索した。

2. 最適なレシピエント卵子の体外成熟培養条件の確立

体細胞クローン胚が個体発生するためには、分化した核の情報がレシピエント卵細胞質内で初期化され個体発生へのプロセスに再プログラムされる必要がある。この正確な機構については未だ解明されていないが、レシピエント卵子には第二減数分裂中期 (MII) へ成熟した卵子を用いることが不可欠であることから、卵細胞質中には高い卵成熟促進因子 (Maturation Promoting Factor, MPF) 活性が必要であることが指摘されている。しかしながら、この MPF 活性レベル

は培養時間や核移植の顕微操作中に大きく変動する可能性が考えられる。そこで本章では、MPF 活性の変動に焦点をあて最適なレシピエント卵子を得るための体外成熟培養条件の確立を目的とした。

体外成熟培養後 36 時間で約 70 %の卵子が MII 期に達した成熟卵子であった (図 1A)。核移植前後での MPF 活性の変化を調べた結果、培養後 44 および 52 時間の成熟卵子を用いた場合、核移植操作により MPF 活性が大きく低下し対照区の未操作卵子と比べ低かった (図 1B)。一方、培養後 36 時間の成熟卵子を用いた場合、核移植後も MPF が高く維持された。この核移植後の高い MPF 活性を反映して、培養後 36 および 40 時間の成熟卵子へ移植した体細胞核で高い割合の染色体凝集が観察された (図 2)。これに対し、培養後 44 および 52 時間では異常な紡錘体を形成するものが多くみられた (図 2)。次に、クローン胚の発生能力を調べた結果、培養後 36 および 40 時間の成熟卵子を用いた場合、卵割率および胚盤胞期への発生率が他の時間に比べ高かった (表 1 および図 3)。

以上、本章の結果、成熟後早期の卵子 (成熟培養後 36 および 40 時間) を用いることでドナー核を MPF 活性の高い卵細胞質中に暴露することが可能であることが示され、核の初期化やクローン胚の発生能を向上させるための最適な体外成熟培養条件が確立された。さらに、これまでのクローンブタ作出に成功した報告では、体外受精などに適応される成熟培養後 44 から 48 時間の成熟卵子をレシピエント卵子として用いた報告が多いが、本章の結果は体外受精胚と体細胞クローン胚では最適な体外成熟時間が異なる可能性を示唆した。

3. 仮親の発情同期化を目的としたミニブタ発情誘起法の確立

胚移植により産子を得るためには、仮親ブタの発情周期を確実に制御することが不可欠であるが、ミニブタでの発情誘起法に関する報告が少なく、胚移植のための効果的な方法が確立されていない。そこで、家畜ブタの発情誘起法の中で最も一般的で簡便な PMSG と hCG を投与する方法を基本に種々の組み合わせを行い、最適な発情誘起法を検索した。

供試ブタとして、クラウン系（8 ヶ月齢）、中国系小型ブタ（6～9 ヶ月齢）、メキシカンヘアレス（5～10 ヶ月齢）および三元交雑種（クラウン系×中国系×ゲッチングン系）（4.5～9.5 ヶ月齢）と対照として家畜ブタ（6 ヶ月齢）を用いた。ホルモン投与方法として、低単位投与方法 A では1日目に PMSG 200 IU+hCG 100 IU を投与し、4日目に hCG 100 IU を投与した。低単位投与方法 B では1日目に PMSG 300 IU+hCG 150IU、4日目に hCG 150 IU を投与した。高単位投与方法では1日目に PMSG1500 IU、4日目に hCG 750 IU を投与した。最終ホルモン投与後 40～48 時間に麻酔下で供試ブタを開腹し、卵巣の所見を観察した。

その結果、低単位投与方法 A で最も高い発情誘起率が得られ、推定排卵卵胞数も他の群と比べ有意に高かった(表 2)。一方、通常家畜ブタで用いられている高単位投与方法では卵胞のう腫などの異常卵胞が観察された(図 4)。本章の結果から、仮親ミニブタの発情同期化法として低単位投与方法 A が最も有効であることが明らかとなった。

4. 胚移植によるミニブタクローン個体の作出

前章までに確立した方法を用い、本章では作出したクローン胚を仮親へ胚移植しクローン産子の作出を目的とした。ブタは多胎であることから妊娠 12 日目に 4 つ以上の受胎産物がないとその後の妊娠が成立しない特性を持つことが知られている。したがって、胚移植により産子を得ようとする場合、他の産業動物よりも多くの良質の胚を用意する必要がある。そこで本研究では、受胎産物を増やす目的で単為発生胚を同時に胚移植した。

体外成熟培養後 40 時間の成熟卵子をレシピエント卵子として、胚移植予定日の前日まで 3 日間核移植を行い、クローン胚を作出した。胚移植日に排卵が始まるように仮親ミニブタを低単位投与方法 A で発情誘起した。胚移植試験 I では作出したミニブタクローン胚のみを仮親へ胚移植し、胚移植試験 II ではクローン胚と共に仮親 1 頭あたり約 40 個の単為発生胚を移植した。妊娠判定を発情周期の回帰を指標とするノンリターン法と超音波診断で行った。

胚移植試験Ⅰでは計 1,437 個（卵割胚数 891 個を含む）のクローン胚を 7 頭の仮親へ移植したが、妊娠個体は得られなかった（表 3）。一方、胚移植試験Ⅱでは計 756（卵割胚数 398 個を含む）のクローン胚を 4 頭の仮親に移植した結果、1 頭が妊娠し、正常な妊娠期間を経て 1 頭の正常なミニブタクローン産子が誕生した（表 4、図 5 および図 6）。本章の結果、前章までに確立した方法および単為発生胚を共移植する胚移植法がミニブタクローン個体を得るために有効な方法であることが示された。

5. 医科学研究に有用な遺伝子改変ミニブタ開発戦略

前章までの研究により確立された体細胞クローン技術の応用として現在、医科学研究で求められている遺伝子改変ミニブタの開発を目的とした実験を行い、その可能性を検索した。

5.1 GFP 遺伝子導入トランスジェニックミニブタの開発

Green fluorescence protein(GFP)遺伝子導入ミニブタは細胞・臓器移植などの移植医療の研究や幹細胞移植をベースとした再生医療の研究のためのツールとして有効利用が期待されている。そこで本節では、GFP 遺伝子導入体細胞クローン胚の体外における発生能を検索した。その結果、GFP 導入体細胞クローン胚は体外で胚盤胞期まで発生し、遺伝子非導入の体細胞クローン胚と同程度の発生能を有することがわかった（表 5 および図 7）。

5.2 肝障害トランスジェニックミニブタの開発

最近、肝障害免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植することによりヒト肝細胞を持つキメラマウスが開発されている。ブタでも同様のモデルが確立されれば、よりヒトに近い前臨床モデルとしての利用が可能であり、さらにヒト肝組織を生産する動物工場としての利用も構想される。そこで本節では、あらかじめ導入遺伝子が目的の臓器で機能するかを検索するために、マウスアルブミンプロモーターがブタ肝臓において特異的に遺伝子発現を誘導する可能性を Gene-gun システムを用いて *In vivo* における評価を行った。その結果、CMV プロモーター

がブタ肝臓と膀胱粘膜の両方で強いルシフェラーゼ活性を示したのに対し、マウスアルブミンプロモーターはブタ肝臓でのみ活性を示した(表 6 および図 8)。これらの結果、マウスアルブミンプロモーターがブタ肝臓においても特異的に活性化することがわかり、トランスジェニックブタを作出する前のプロモーターの評価に Gene-gun システムが有効であることが示された。

以上、本研究で得られた成果を総括すると、医科学研究への応用が可能な遺伝子改変ミニブタの開発を目的とした体細胞クローン技術の確立を行い、

1. ミニブタクローン胚の発生に最適なレシピエント卵子体外成熟時間を決定し、高い発生能を持つクローン胚の作出を可能にした。
2. 仮親ミニブタの発情同期化を可能にするミニブタ発情誘起法を確立した。
3. ミニブタクローン産子の作出系を確立した。
4. 医科学研究に有用な遺伝子改変ミニブタ開発の可能性を示した。

本研究で得られた成果は、今後、医科学研究への応用が可能な遺伝子改変ミニブタを作出するうえで有効な技術を提供するものと評価できる。

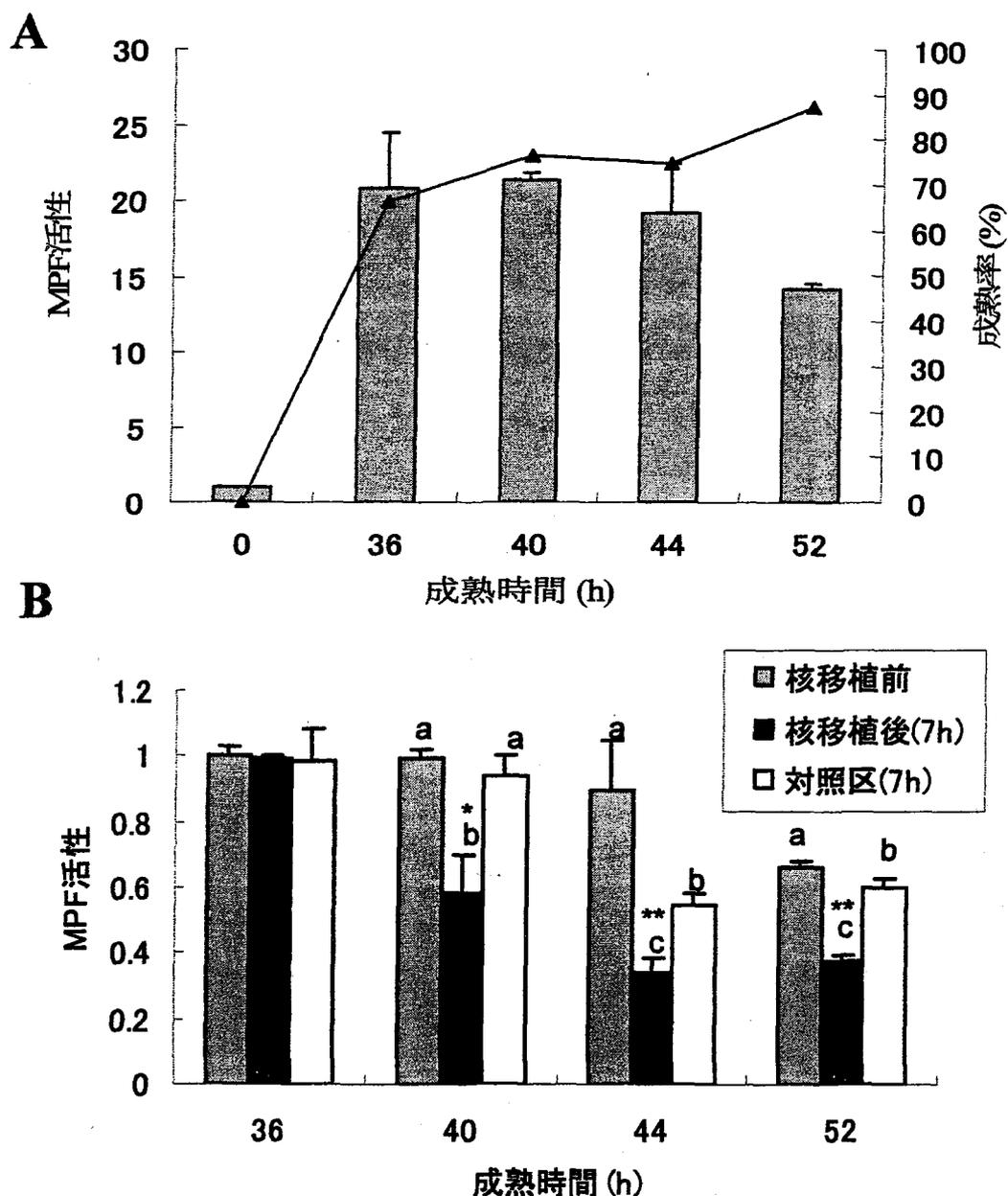


図1. 核移植前後でのMPF活性の変化.

(A) 体外成熟培養後の成熟率とMPF活性

成熟は第一極体の放出の有無により判定した。成熟率は培養した卵子中の成熟卵子の割合で示した。MPF活性は成熟0時間の卵子の活性を1として相対的に表した。値は平均値±S.E.で示した(n=3)。

(B) 核移植前後でのMPF活性の変化

MPF活性は成熟36時間の核移植前の卵子の活性を1として相対的に示した。括弧内の数字は成熟培養後からの経過時間を示した。^{a-b}: 同じ成熟時間において各処理区で有意差あり(P<0.05)。^{***}: 同じ処理区において各成熟時間で有意差あり(P<0.05)。値は平均値±S.E.で示した(n=3)。

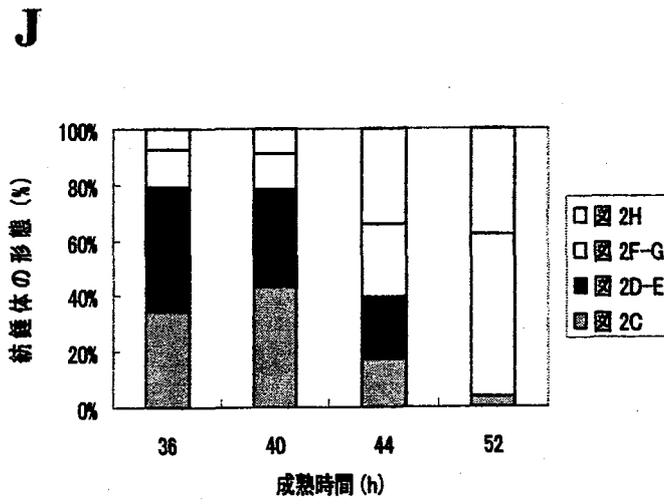
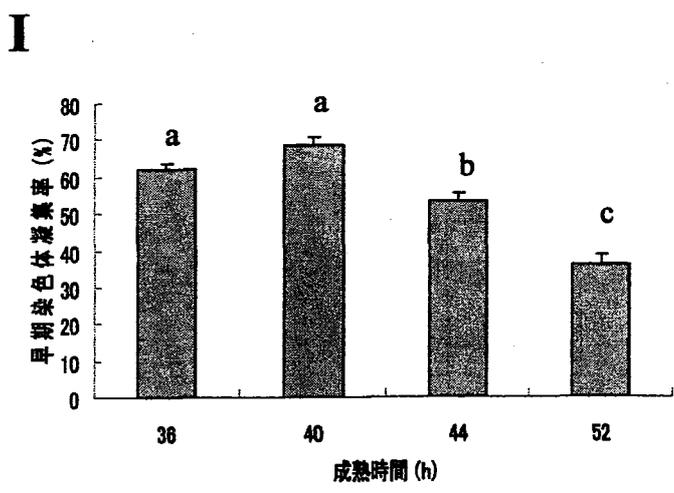
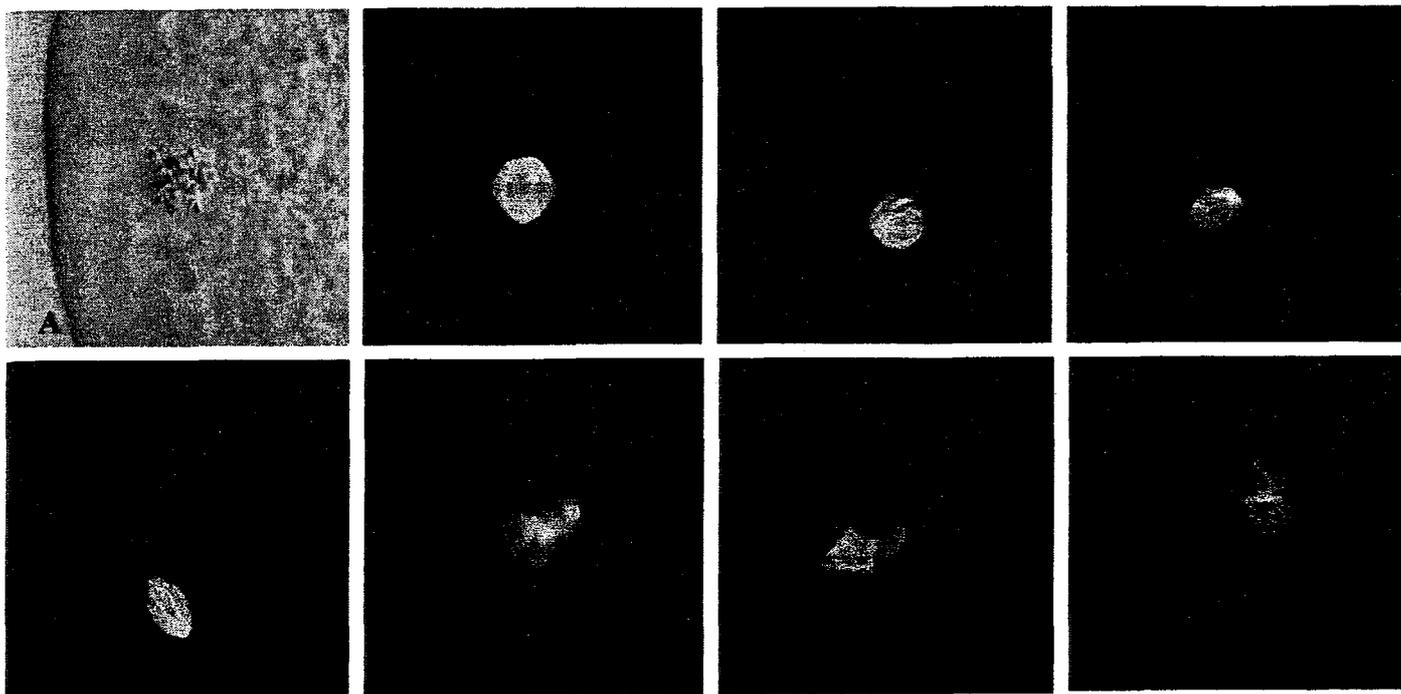


図2. クローン胚における核の再構築。

体細胞核移植後の核の形態パターン。

(A) 早期染色体凝集

(B) 正常な紡錘体(成熟卵子)

(C) 正常な紡錘体(クローン胚)

(D-H) 異常な紡錘体(クローン胚)

:紡錘体の形態は正常だが、染色体が中央に整列していない(D-E); 紡錘体の形態が異常 (F-G);

微小管が卵細胞質内に散在(H)

(I) 早期染色体凝集に及ぼす体外成熟時間の影響

a-c: 異符号間に有意差あり (P<0.05)。値は平均値±S.E.で示した(n=3)。

(J) 紡錘体形成に及ぼす体外成熟時間の影響

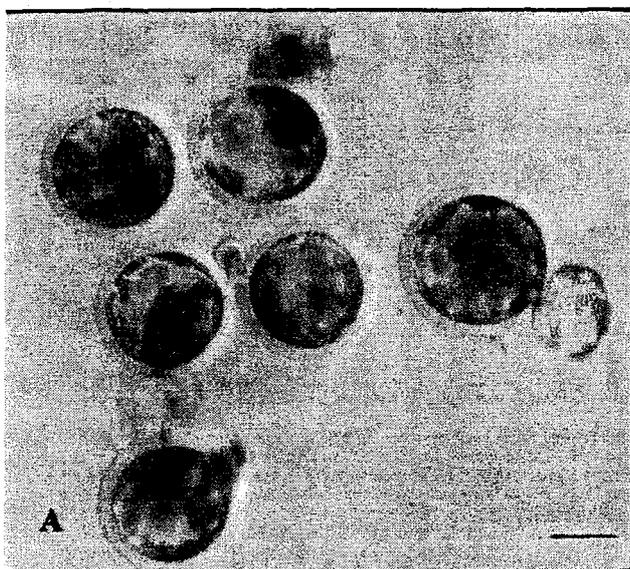
紡錘体形態のパターンは図2C-Hに示した。

表1. クローン胚の発生に及ぼす体外成熟時間の影響

成熟時間 h	培養胚数 n	卵割胚数 n (%) [*]	胚盤胞期胚数 n (%) [*]	胚盤胞細胞数 n ± s.e.
36	107	50 (46.7) ^a	9 (8.4) ^{ab}	29 ± 1.8 ^{ab}
40	98	53 (54.1) ^a	14 (14.3) ^a	42 ± 4.9 ^a
44	108	50 (46.3) ^a	5 (4.6) ^b	24 ± 12.7 ^{ab}
52	56	12 (21.4) ^b	2 (3.6) ^b	20 ± 10.4 ^b

*: % 培養胚数

a-c: 異符号間に有意差あり(P < 0.05)。



(Bar=100 μm)

図3. 胚盤胞期まで発生したクローン胚.

成熟40時間の卵子をレシピエント卵子として用い核移植を行い、活性化処理後、体外で6日間発生培養した。

(A) 明視野

(B) UV照射下(Hoechst33342染色)

表2. 異なるホルモン投与によるミニブタの発情誘起

投与法	供試頭数 n	月齢 ^a	発情誘起率 %	推定排卵数 ^a (排卵点, 排卵前卵胞数)
低単位 A	18	13.4±1.6	83.3	22.5±1.8** (7.5±3.5, 14.6±3.3)
低単位 B	21	9.3±7.2	81.0	12.7±2.8* (4.2±1.4, 10.0±5.3)
高単位	5	8.8±0.5	60.0	20±0.0* (17, 3)
高単位 (家畜ブタ)	6	5.8±2.5	66.7	14.5±3.7* (14.5±3.7, 0)

a: Mean±S.E.

* **: 異符号間に有意差あり. (P<0.05)

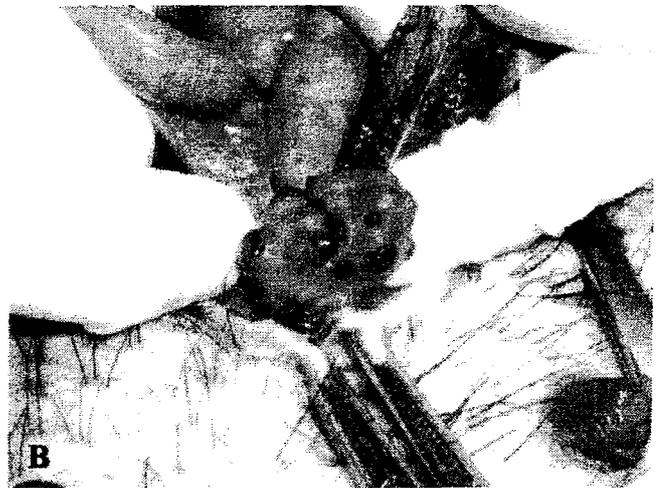


図4. hCG投与後43-48時間におけるのミニブタの卵巣の所見.

- (A) 排卵中の卵巣(低単位A)
- (B) 排卵後の卵巣(低単位A)
- (C) 卵胞嚢腫(高単位)

表3. 胚移植試験 I の成績

仮親 No.	仮親の 系統	ドナー細胞の 系統	移植胚数 (卵割胚数)	妊娠状態
1	C	C	116 (55)	発情回帰(21日目)
2	C	C	96 (14)	発情回帰(25日目)
3	C	C	84 (41)	発情回帰(22日目)
4	KCG	C	311 (229)	発情回帰(25日目)
5	KCG	C	217 (148)	発情回帰(25日目)
6	K	C	217 (148)	発情回帰(18日目)
7	K	C	396 (256)	発情回帰(18日目)
total			1437 (891)	

表4. 胚移植試験 II の成績

仮親 No.	仮親の 系統	ドナー細胞 の系統	移植胚数 (卵割胚数)	単為発生 卵子数	妊娠状態
1	K	C	60 (34)	44	発情回帰(42日目)
		G	84 (55)		
2	K	C	61 (34)	41	発情回帰(46日目)
		G	82 (54)		
3	K	C	112 (28)	46	発情回帰(21日目)
		G	131 (57)		
4	KCG	C	100 (60)	40	115日目に1頭出産
		G	126 (76)		
5	KCG	C	275 (165)	35	(妊娠中)
6	K	C	257 (143)	32	(妊娠中)
total			1288 (706)		

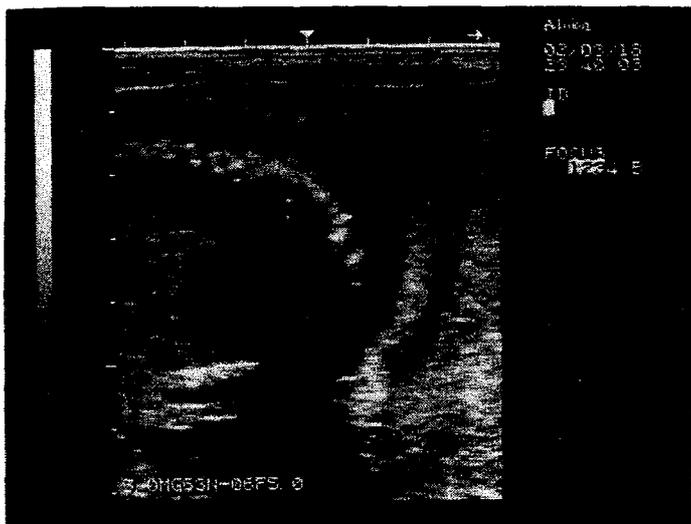


図5. 胚移植後の妊娠状況.

(A) 超音波診断(胚移植後91日目)

(B) 妊娠ブタ(胚移植後105日目)



図6. ミニブタクローン産子.

表5. GFP遺伝子を導入したクローン胚の体外発生能

ドナー細胞	培養胚数	卵割胚数 (%)*	胚盤胞期胚数 (%)*
GFP+	46	20 (43)	2 (4)
GFP-	376	163 (44)	13 (3)

*: % 培養胚数

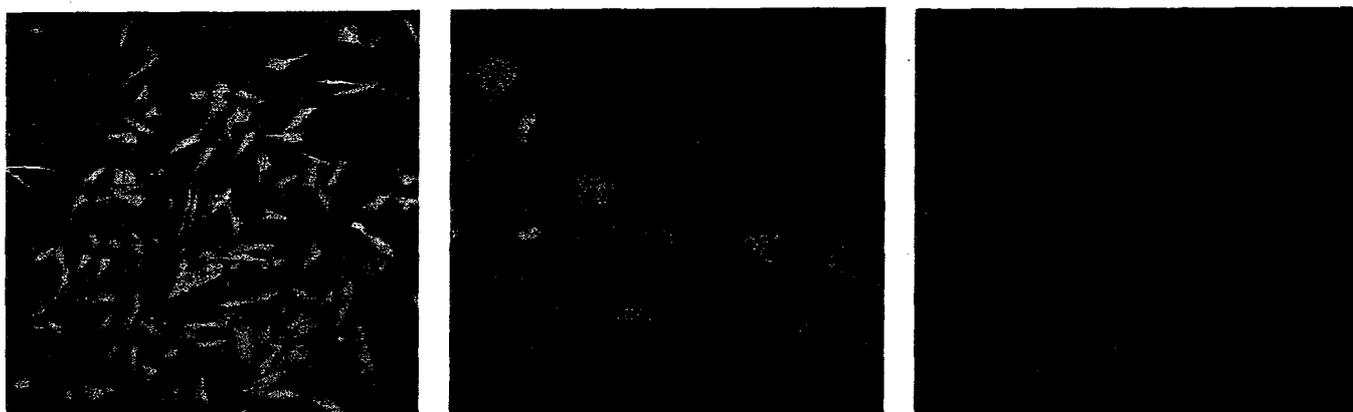


図7. GFP遺伝子を導入したクローン胚.

- (A) GFP遺伝子を導入したミニブタ線維芽細胞
- (B) 卵割期のGFP導入クローン胚
- (C) 胚盤胞期のGFP導入クローン胚

表6. マウスアルブミンおよびCMVプロモーターのプロモーター活性

プロモーターの種類	ルシフェラーゼ活性* (RLU × 10 ⁴)	
	肝臓	膀胱
マウスアルブミン	10.1 ± 1.4	1.8 ± 0.3
CMV	172.7 ± 18.3	212.7.1 ± 100.1

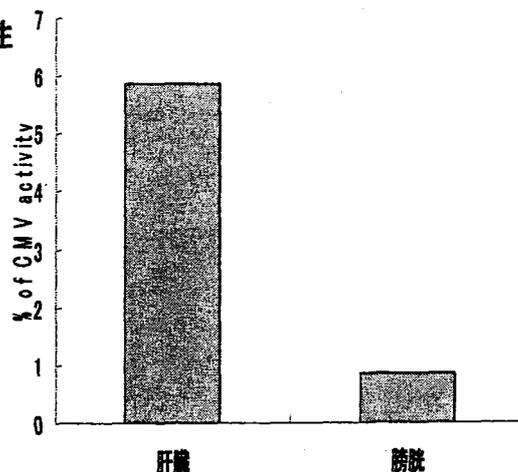


図8. ブタ肝臓および膀胱におけるマウスアルブミンプロモーターの活性の比較.

データはブタ肝臓および膀胱におけるマウスアルブミンプロモーターのルシフェラーゼ活性をCMVプロモーターのルシフェラーゼ活性を内部スタンダード(100%)として表わした。

*: 平均 ± S.D. (n=3)

論文審査結果要旨

ブタにおける体細胞クローン技術は、ブタがヒトに近い特性（体サイズ、代謝、食性など）をもつことから、ヒトの疾患モデル動物の開発、あるいはヒトへの異種移植を目的とした臓器生産用ミニブタを作出する方法として注目されている。本研究では、ミニブタ体細胞クローン産子作出技術の確立を目的とした実験を行い、以下の研究成果を得た。第1に、高い発生能を有するミニブタクローン胚の作出系を確立することを目的として、MPF活性の変動に焦点をあて、良質なレシピエント卵子を得るための体外成熟培養条件を検索した。その結果、核移植操作がMPF活性を低下させる一因となること、また通常体外受精などに適用されるよりも体外成熟時間の短い成熟後早期の卵子をレシピエント卵子として用いると核移植後も高いMPF活性レベルが維持され、正確なドナー細胞核の再構築が起こることを明らかにした。第2に、ミニブタクローン胚を移植する仮親にミニブタを選択し、安定的に仮親ミニブタを発情同期化させる条件を確立するために、ホルモン投与によるミニブタの発情誘起を行った。その結果、低単位のPMSG 200IUとhCG 100IUを同時に投与する方法が、高い発情誘起率を示し、多くの排卵を誘起することが分かった。第3に、本研究において確立した方法をもとにミニブタクローン産子の作出を目的として、作出したミニブタクローン胚が仮親の体内で個体まで発生するかを検証した。本研究では、仮親の妊娠維持を目的とした単為発生胚を同時移植する方法を試み、正常なミニブタクローン産子を作成することに成功した。第4に、GFPトランスジェニックミニブタと肝障害トランスジェニックミニブタの2種類の遺伝子改変ミニブタの開発を目指した実験を行い、その可能性を検索した。GFPトランスジェニックミニブタに関する研究では、作出したGFP発現クローン胚が体外で通常のクローン胚と同程度の発生能力を有していることを示した。また、肝障害トランスジェニックミニブタに関する研究では、Gene gun systemを利用して、in vivoにおいて肝臓特異的プロモーターの評価を行い、導入遺伝子がミニブタの肝臓で特異的に発現する可能性を示した。

本研究は応用動物科学において高く評価される。よって博士（農学）の学位を授与できるものと判定した。