

ブタ前駆脂肪細胞を核ドナーとする体細胞核移植によるクローン産仔の作出

誌名	明治大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji University
ISSN	04656083
著者名	富井,亮 長嶋,比呂志
発行元	明治大学農学部
巻/号	57巻3号
掲載ページ	p. 109-113
発行年月	2008年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ブタ前駆脂肪細胞を核ドナーとする体細胞核移植による クローン産仔の作出

富井 亮・長嶋比呂志

(2007年9月28日受理)

Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocyte

Ryo Tomii, Hiroshi Nagashima

1. はじめに

核移植とは、ある卵子の核を取り除き、その卵細胞質に別の細胞の核を移植することを言う (図1)。1997年に、6歳の雌ヒツジから採取した乳腺細胞をドナー細胞とする核移植によって、世界初の体細胞核移植クローンヒツジ、ドリーが誕生した (Wilmut et al. 1997)。体細胞核移植によるクローン動物の誕生は、細胞の分化は遺伝子の不可逆的な変化によるものでなく、可逆的な変化によるものであることの証明となった。この成功をきっかけに、核移植技術を用いた研究は、胚発生、分化の初期化機構などの重要な生物学的な知見を得ることが出来る新たな研究手法を提供した。例えば、2004年に河野らが、未成長期卵母細胞を用いた核移植によって、母性染色体しか含まない単為生殖胚が発生異常を起こす原因はゲノミックインプリンティングにあることを証明した (Kono et al. 2004)。この研究は、核移植技術を用いて生物学的な問題にアプローチした好例である。現在では、核移植技術は学術分野だけでなく、農業や医療分野などでの利用も期待されている。

2. 種の保存方法としての利用

国際自然保護連合 (the International Union for Con-

servation of Nature and Natural Resources: IUCN) のレッドリストにおいて絶滅危惧種に指定されている哺乳動物は、1000種類以上に及んでおり (IUCN: <http://www.iucnredlist.org>)、これらの動物種を維持、保存することは国際的な課題となっている。このような希少品種を対象とする場合、生殖細胞を採取すること自体が困難であるという理由から、従来の生殖工学技術の応用が難しい。そこで、一つの細胞から個体を作出できる体細胞核移植技術が、系統維持や希少品種の保存に利用されている。体細胞を保存する場合は、性別、繁殖可能年齢や、動物の生理的状态に関係なく採取が可能で、技術的にも胚を保存する場合よりも容易である。実際に、絶滅危惧種のエンデビー牛や、アメリカンワイルドキャットのクローンの誕生が報告されている (Wells 1998; Gomez et al. 2004)。

3. 優良遺伝形質を持つ動物の増産への利用

畜産においては、ヒツジ、ヤギ、ウシといった家畜動物の体細胞核移植が、優良家畜の増産、育種改良の効率化に役立つと考えられている。スーパーカウと呼ばれる極めて高い泌乳能力を持つ雌ウシや、高品質の牛肉を生産することができる種畜を体細胞核移植によって複製・増産することで、生産性を高めることができる。

家畜以外の動物としては、盲導犬、介助犬、救助犬などの特殊能力を持った動物の増産に利用できる可能

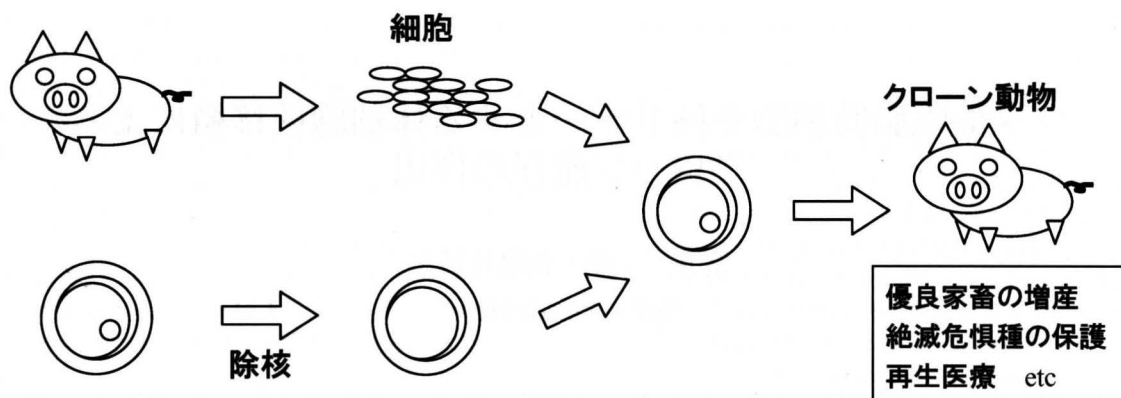


図1 クローンブタの生産

性がある。財団法人日本盲導犬協会の2001年のデータによると、国内では約850頭の盲導犬が活躍しているが、盲導犬との生活を希望している視覚障害者は4800人にもものぼり、盲導犬は大幅に不足している。盲導犬としての資質は遺伝によるところが大きく、候補として産まれてきた子犬のうち、実際に盲導犬になるのは全体の約3割でしかない。また、盲導犬は幼犬の時に避妊手術されてしまうため、たとえ優秀であっても子孫を残すことが出来ないという問題がある。盲導犬から細胞を採取し、体細胞核移植を行うことで優秀な遺伝形質を持った子犬を確保出来る可能性がある。

4. 再生医療分野への利用

胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ES細胞) は、未分化性を維持したまま増殖が可能な初期胚由来の培養細胞であり、様々な細胞への多分化能を有するため、再生医療の分野での利用が期待されている。しかし、これまで樹立が報告されているES細胞のほとんどは受精卵・単為発生胚由来であり、それらの細胞を、治療を目的として患者に移植すると免疫拒絶が起こる可能性がある。ES細胞を自分自身の細胞で作ることが出来れば、免疫の問題は解決すると考えられる。2001年に若山らは、核移植技術を用いることでマウスの核移植胚性幹細胞 (Nuclear Transfer-ES Cell: NT-ES細胞) を作製することに成功した (Wakayama et al. 2001)。これと同様に患者の核を用いてNT-ES細胞を樹立すれば、患者と同じ免疫学的 (遺伝学的) バックグラウンドを持つ細胞が取得可能であり、

移植医療において最大の障壁である拒絶反応を回避することが可能になる。

幹細胞を用いた細胞移植治療の実現のためには、細胞の加工方法 (培養, 分化処理) および機能の評価, 安全性・品質の保証などのさらなる検討が必要であると考えられる。体細胞核移植を用いて作製したクローン動物は、遺伝的に同一であるためにドナー細胞に対して免疫拒絶反応を示さない。従って、幹細胞治療の効果を調べるための対象として非常に優れた評価モデルとなる可能性がある。

5. 遺伝子改変動物の作製への利用

遺伝子改変ブタの作出の手段としては、従来、前核注入法が主に用いられてきた。しかし、前核注入法には、染色体上のランダムな位置に遺伝子導入が起こること、導入遺伝子のコピー数を制御できないこと、導入効率が低いことなどの問題があり (Rulicke & Hubscher 2000; Brinster et al. 1985), そのため遺伝子改変ブタの生産は非常に非効率的であった。これに対し、遺伝子改変を施された細胞をレシピエント卵細胞質に核移植する方法 (図2) には、得られた産仔が確実に遺伝子改変されているという利点がある。さらに、この方法を用いることによって、遺伝子ノックアウトのような高度な遺伝子修飾も可能となる (Dai et al. 2002)。以上のことから体細胞核移植を用いることによって、遺伝子改変ブタ作出を画期的に効率化することが出来ると期待される。

遺伝子改変動物の農業分野への利用としては、家畜

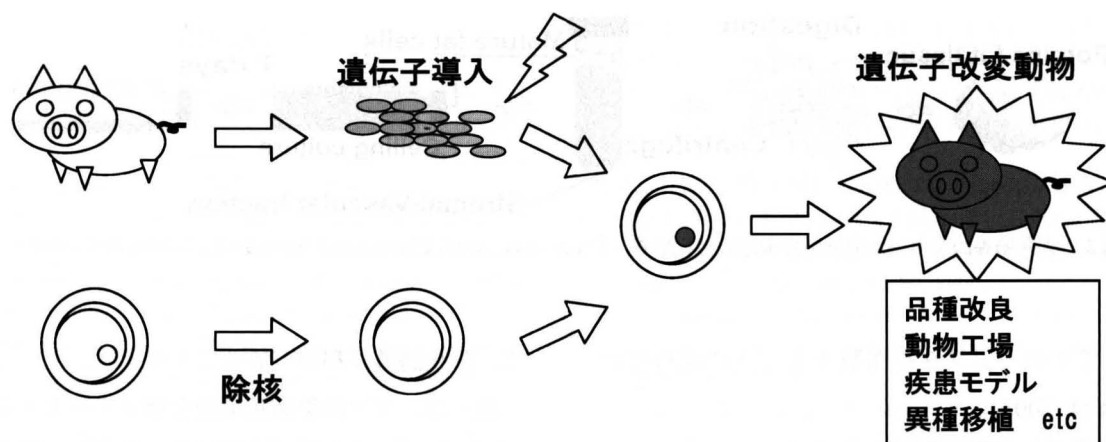


図2 遺伝子改変ブタの生産

の成長促進や産肉性の向上、ウイルスに対する抵抗性の付与や、家畜の生産物の成分組成を改変するといった品種改良が挙げられる (Pursel et al. 1993; Prather et al. 2003)。また、医療品原料や抗体などの有用な生理活性物質を動物体内で大量に生産させる、いわゆる動物工場 (Animal Bioreactor) (Velandar et al. 1992) や、ヒトの疾患モデル動物 (Petters et al. 1997) の作製に利用されている。さらに、ヒトへの移植用代替臓器ドナーを目的として、異種移植における超急性拒絶反応の原因となる糖鎖抗原を除去した遺伝子改変ブタ (Dai et al. 2002) などの作製が行われている。

6. 体細胞核移植における課題

体細胞核移植によるクローンブタの生産効率率は5%以下である。クローンブタの生産効率の低さの理由としては、胚移植後の胎子の早期死滅や死産、産後直死などが挙げられる (Wilmut et al. 2002)。これらの異常の原因は、核移植胚の初期発生過程における遺伝子のリプログラミング不全にあると考えられている (Li et al. 2003)。また、体細胞核移植は、ドナー細胞の培養、レシピエント卵の除核、レシピエント細胞質内への核の導入、再構築胚の活性化と体外培養、胚移植などから構成される multi-step technology であるため、これらすべての工程の最適化がクローン動物の効率的な生産に不可欠である。今後、クローンブタや遺伝子改変ブタの利用を一層推進するためには、より生

産効率の高い体細胞核移植のシステムが構築されることが必要である。

7. ドナー細胞の種類

ドナー細胞の種類は、体細胞核移植によってクローン個体が得られるか否かを決定する重要な要素である。ドナー細胞の種類が、核移植胚の発生能 (Wakayama & Yanagimachi 2001; Yin et al. 2002) や、DNAのメチル化パターン (Santos et al. 2003)、初期発生に必要な遺伝子の発現 (Bortvin et al. 2003) に影響を与えることが報告されている。よって、高い増殖能を持ち、かつリプログラミングを受け易いという、核移植のドナー細胞に適した性質を持った細胞を見つけることは重要な課題である。これまで、様々な研究グループが核移植によりクローンブタの作出に成功しているが、その際に用いられたドナー細胞は、胎仔繊維芽細胞とその他数種類の細胞に限られている。

我々は体細胞核移植のドナー細胞として、ブタ前駆脂肪細胞に着目した。前駆脂肪細胞は、成体の脂肪組織から採取した成熟脂肪細胞を脱分化させることによって樹立した細胞である (Yagi et al. 2004) (図3)。前駆脂肪細胞は繊維芽細胞様の形態を有し、継代培養が容易である。また、生体組織由来の細胞であるが胎仔繊維芽細胞と同程度の増殖性を有する。我々は、この前駆脂肪細胞で再構築された核移植胚が、胎仔繊維芽細胞で再構築した核移植胚と同等の発達能を持つことを示した。また、前駆脂肪細胞を核ドナーとする核移

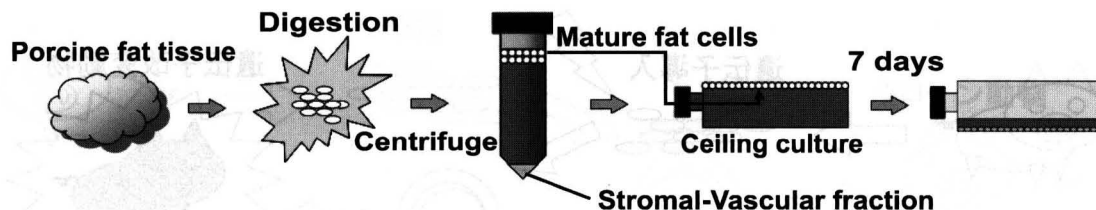


図3 天井培養法を用いた前駆脂肪細胞の初代培養 (Tomii et al., 2005 Cloning and Stem Cells, 7: 279-288. 2005.)

植によってクローンブタを作製することに成功した (Tomii et al. 2005)。

8. ドナー細胞の細胞周期同調法

レシピエント細胞質に第二減数分裂中期の卵を使用する時、核移植胚が正常な2倍性の染色体を維持するためには、G0/G1期の細胞を核ドナーとする必要があるとされている (Capmbell et al. 1996)。細胞周期をG0/G1期へと同調する方法としては、血清飢餓の他に、接触阻止、細胞分裂阻害剤を用いる方法が報告されている (Ploējaeva et al. 2000; Onishi et al. 2000; Kues et al. 2000)。実際、血清飢餓、接触阻止で細胞周期を同調した細胞をドナー核とする核移植によって、正常なクローンブタ産仔が誕生している。

しかし、ドナー細胞の種類や培養期間などの条件によっては、細胞周期同調処理により細胞にアポトーシスが誘導されることが指摘されている (Kues et al. 2000)。アポトーシスが引き起こされた細胞を核移植に使用しても再構築胚の正常な発達は望めないであろう。また、細胞周期同調処理がクローン胚の発達一特に妊娠後期一に悪影響を及ぼすことも報告されている (Gibbons et al. 2002)。従って、G0/G1期に細胞周期を高効率に同調させ、かつ、アポトーシス誘導や胚発生への悪影響などのリスクが低い方法を利用出来れば、核移植の効率を向上できる可能性がある。

前駆脂肪細胞は、体外で分化を誘導することにより、成熟脂肪細胞に再分化するだけでなく、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞などへと分化することが報告されている (Yagi et al. 2004; Miyazaki et al. 2005)。分化過程の細胞は、細胞周期がG0期に入ることが知られている。このことは核移植において、ドナー細胞の細胞周期を同調するための新しい方法とし

て、分化誘導が利用可能なことを示す。

我々は、ブタ前駆脂肪細胞を核ドナーとする核移植において、血清飢餓、接触阻止、細胞分裂阻害剤、分化誘導による細胞周期同調法を比較した。その結果、分化誘導法はアポトーシスを引き起こすリスクを伴わず、高効率に細胞をG0/G1期に同期化出来る優れた細胞周期同調方法であることが示された。さらに、分化誘導法で細胞周期同調された前駆脂肪細胞を核ドナーとする核移植によって、クローンブタ産仔を高効率に生産することが可能であった。我々が知る限り、この産仔は分化誘導を細胞周期同調法として利用して作製された初めてのクローン動物である。

9. 今後の展開

全能性を持つES細胞で再構築された核移植胚は、体細胞で再構築された核移植胚よりも産仔までの発達能が高いことが報告されている (Wakayama et al. 1999)。しかしその一方で、多分化能を持つ体性幹細胞を核ドナーとする核移植胚からの産仔の生産効率は、体細胞を核ドナーとする核移植胚と同等かそれ以下であることが報告されている (Inoue et al. 2006; Kato et al. 2004; Mizutani et al. 2006)。このように、未分化な細胞が核移植のドナー細胞として有利であるかどうかについては不明な点が多い。前駆脂肪細胞は、任意の時期に分化させることが可能であるため、体細胞核移植におけるドナー核の分化状態とリプログラミングの関係を解明するためのツールとして利用されることが期待される。今後、体細胞核移植におけるドナー核のリプログラミングに関する研究が進むことによって、クローン動物の作製効率が飛躍的に向上する事が期待される。

引用文献

- Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*, 130: 1673-1680. 2003.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82: 4438-4442. 1985.
- Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of Reproduction*, 1: 40-46. 1996.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the alpha1, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*, 20: 251-255. 2002.
- Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biology of Reproduction*, 66: 895-900. 2002.
- Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*. 6: 247-258. 2004.
- Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim JM, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J Cell Sci*, 119: 1985-1991. 2006.
- Kato Y, Imabayashi H, Mori T, Tani T, Taniguchi M, Higashi M, Matsumoto M, Umezawa A, Tsunoda Y. Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. *Biol Reprod*, 70: 415-418. 2004.
- Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS, Ogawa H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 428: 860-864. 2004.
- Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biology of Reproduction*, 62: 412-419. 2000.
- Li X, Li Z, Jouneau A, Zhou Q, Renard JP. Nuclear transfer: progress and quandaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 1: 84. 2003. Review.
- Miyazaki T, Kitagawa Y, Toriyama K, Kobori M, Torii S. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue. *Differentiation*. 73: 69-78. 2005.
- Mizutani E, Ohta H, Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T, Wakayama S, Kosaka M, Sato E, Wakayama T. Developmental ability of cloned embryos from neural stem cells. *Reproduction*, 132: 849-857. 2006.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289: 1188-1190. 2000.
- Petters RM, Alexander CA, Wells KD, Collins EB, Sommer JR, Blanton MR, Rojas G, Hao Y, Flowers WL, Banin E, Cideciyan AV, Jacobson SG, Wong F. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol*, 15: 947-948. 1997.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407: 86-90. 2000.
- Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology*, 59: 115-123. 2003.
- Pursel VG, Rexroad CE Jr. Status of Research with transgenic farm animals. *Journal of Animal Science*, 71: 10-19. 1993.
- Rulicke T, Hubscher U. Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Experimental Physiology*, 85: 589-601. 2000.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 13: 1116-21. 2003.
- Tomii R, Kurome M, Ochiai T, Wako N, Ueda H, Hirakawa K, Kano K, Nagashima H. Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes established from adult mature adipocytes. *Cloning and Stem Cells*. 7: 279-288. 2005.
- Velander WH, Johnson JL, Page RL, Russell CG, Subramanian A, Wilkins TD, Gwazdauskas FC, Pittius C, Drohan WN. High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 12003-12007. 1992.
- Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 14984-14989. 1999.
- Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*. 292: 740-743. 2001.
- Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 58: 376-383. 2001.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*, 10: 369-378. 1998.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813. 1997.
- Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 419: 583-586. 2002.
- Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321: 967-974. 2004.
- Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod*, 67: 442-446. 2002.