

小課題名：初期胚の生命活動センシングと分子機構の解明

研究の背景とねらい

細胞工学や遺伝子工学の劇的な進歩にともなって、家畜の生産は大きく変貌を遂げつつある。特に、イギリス・ロスリン研究所が体細胞クローン羊作出に成功して以来、世界的な競争の中で細胞工学的手法による効率的な家畜生産や、遺伝子工学的手法による迅速な育種、さらにヒトの遺伝子を導入した家畜によるペプチド性医薬品生産など、次々に新しい技術が考案され、実際に開発されつつある。しかし実際には、体細胞クローン家畜は受胎率が低く、発生異常や、流産、奇形の高リスクが高く、作出の効率はかなり悪い。また、すでに第一号の体細胞クローン羊が死亡したように、寿命が短く、病気になりやすい可能性もあるが、その根本的原因はよくわかっていない。このように、これらの技術には解決しなければならない問題が多く、未だ技術の確立にはほど遠い。

そこで、全国的ブランドである山形牛を産する本県ではウシをターゲットとして、細胞工学的手法による効率的な生産法、遺伝子工学的手法による迅速な新品種作出法、および生体センシング技術による胚診断法を導入し、本県における畜産業の転換および将来的な家畜によるペプチド性医薬品製造の事業展開を目指して、下記の研究に取り組んだ。本課題では、1) 牛体細胞の培養技術を確立し、体細胞を用いた遺伝子組換え技術を開発し、培地・培養器具等を製品化すること、2) 胚由来未分化細胞の培養技術、クローン胚作製技術を確立して培地・培養器具、樹立した細胞株等を製品化し、また実際にクローン牛作出の実証試験をおこなうこと、3) 良質な初期胚の診断法を確立し、複合技術融合グループと協力して初期胚診断装置を開発して製品化することを目標とした。

共同研究の体制と役割分担

研究代表者：半澤直人（山形大学理学部生物学科）

研究副代表者：小林正人（山形県農業研究研修センター畜産研究部）

（フェーズⅠ段階）

- ・ 遺伝子導入及び遺伝子改変家畜胚作出の研究開発（星宏良、千代豊、阿部宏之：株式会社機能性ペプチド研究所）
- ・ 初期胚における初期発生障害の分子病理学的研究（小林正人、齋藤真希、齋藤朗子、伊藤博康、青柳和重：山形県農業研究研修センター畜産研究部）
- ・ 初期胚の膜電位測定用微小電極の作製（戸嶋茂郎：鶴岡工業高等専門学校）
（フェーズⅡ段階）
- ・ 初期胚の生命活動センシングと分子機構の解明（星宏良、千代豊、阿部宏之：株式会社機能性ペプチド研究所、青柳和重：山形県農業研究研修センター畜産研究部）

研究の経過

(フェーズⅠ段階)

- i. 遺伝子導入または遺伝子改変に適したウシ由来体細胞等の単離方法、およびこれらの細胞の至適な培養条件の決定と長期継代培養法の確立を目指した。また、体細胞等の寿命を左右するとされる染色体テロメアの長さを調べ、ドナー細胞として用いる体細胞等のテロメアの長さや核移植によって作出されたクローン胚の発生能との相関を検討した。
- ii. 微小電極によるミトコンドリア膜電位測定によって、良質な胚と発生を停止した胚の識別性について検討した。

(フェーズⅡ段階)

当初は、フェーズⅠでの成果を活用してより高度な遺伝子操作を体細胞に行うための技術開発、さらに核移植による形質転換クローン胚を効率的に作製する技術の開発を目標としていた。しかし、体細胞クローン胚作出および体細胞を用いた遺伝子組換え系については、新たな技術開発をしてもほとんどの特許が先行するイギリス・ロスリン研究所の基本特許等に抵触するため、フェーズⅡ以降は体細胞クローン胚と差別化して事業化・製品化が見込める胚由来未分化細胞(ES様細胞等)に焦点を絞り込んで、新たに研究を展開した。

- i. 家畜の育種および遺伝子改変家畜生産の効率化に寄与する技術としてその開発が切望されている胚由来未分化細胞(ES様細胞等)の樹立法・培養法(培養液・培養システム)の開発、および胚由来未分化細胞をドナーとしたクローン胚作製システム(クローン牛生産)の開発を行った。その結果、効率的に胚由来未分化細胞株を樹立する新規培養法を確立した。さらに、樹立細胞をドナー細胞としたクローン胚・クローン牛生産システム(クローン胚発生用培地)も確立しつつある。
- ii. 高い受胎率および正常産仔の出生には良質なクローン胚の選択が不可欠であるため、複合技術融合グループと共同で、電気化学顕微鏡による胚呼吸測定装置を優良クローン胚選択へ活用し、装置およびクローン胚評価法の有効性を実証した。

成果とその意義

(フェーズⅠ)

- i. 遺伝子導入または遺伝子改変に適したウシ由来体細胞等の単離方法、およびこれらの細胞の至適な培養条件の決定と長期継代培養法の確立を目指した。また、体細胞等の寿命を左右するとされる染色体テロメアの長さを調べ、ドナー細胞として用いる体細胞等のテロメアの長さや核移植によって作出されたクローン胚の発生能との相関を検討した。その結果、核移植用ドナー体細胞(線維芽細胞)の最適な培養条件が明らかになり、効率的な遺伝子導入・遺伝子改変ドナー体細胞の分離が可能となった。

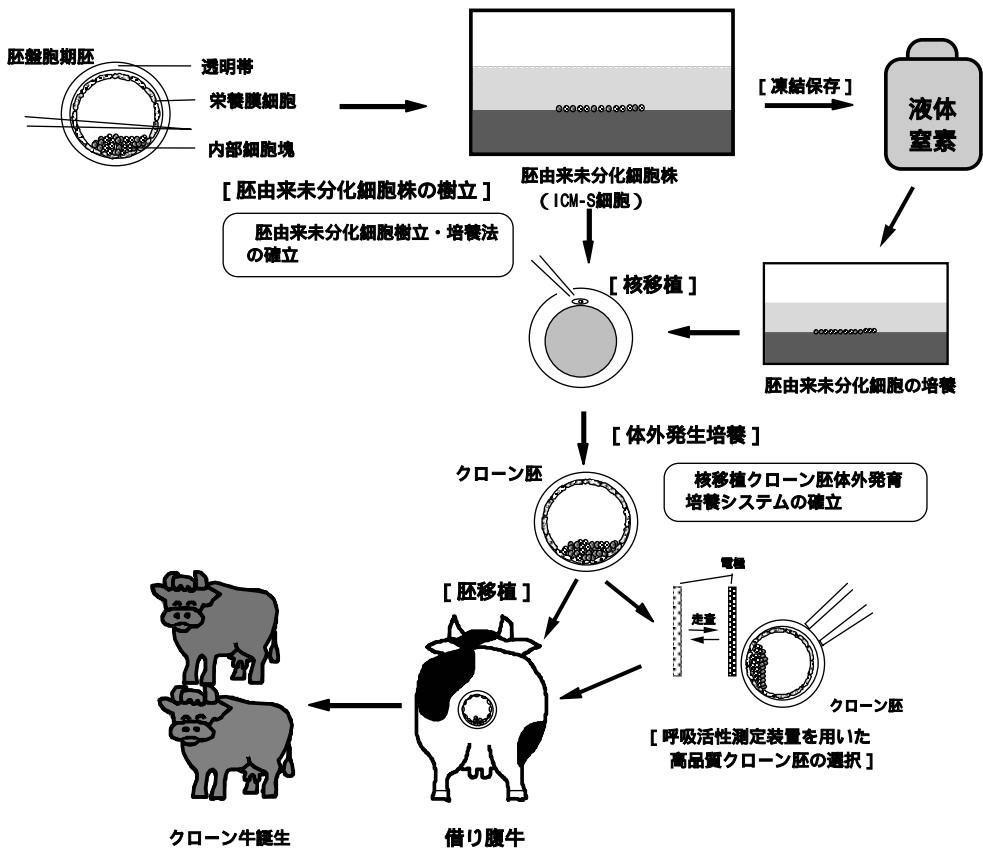
- ii. 微小電極によるミトコンドリア膜電位測定によって、良質な胚と発生を停止した胚が識別できることが明らかになった。また、発生を停止した胚では、DNA 損傷による断片化が起こっていることがわかったが、ミトコンドリア膜電位測定では DNA 断片化が起こる前の発生の異常も検出できることが明らかになった。

(フェーズ)

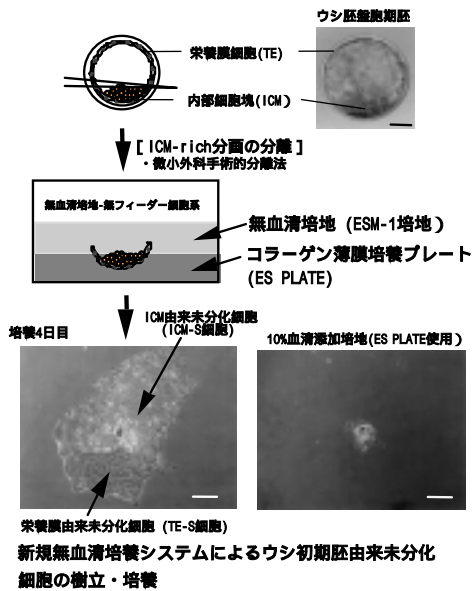
- i. MEM 培地が核移植用ドナー体細胞(ウシ線維芽細胞)の培養において最適基礎培地であることを明らかにするとともに、線維芽細胞への遺伝子導入法として、リポゾーム法(改良型)が最も導入効率が良いことを明らかにした。
- ii. 従来法(血清培地-フィーダー細胞培養系)とは全く異なる新規のウシ胚由来未分化細胞樹立・培養法(無血清培地(ESM-1 培地:血清アルブミンと数種の細胞成長因子を含む)-無フィーダー細胞培養系(コラーゲン薄膜培養プレート:ES-PLATE))を開発した。この培養システムはすでに製品化し、販売の準備を行った。胚由来未分化細胞は、体細胞より優れたドナー細胞として、今後広く使用されるはずなので、この培養システムも広く購入される可能性が高い。
- iii. 胚由来未分化細胞(ES 様細胞)をドナーとして3頭のクローン牛を作出し、うち1頭では正常な出生を確認した。クローン個体作出の成功率は体細胞クローンより数十倍以上高く、ES 様細胞の有効性が実証されつつある。
- iv. 高品質クローン胚を効率良く作製する体外培養法(新規クローン胚発生培地:IVD-CL1 培地)を開発した。この培養システムについては、製品化の準備を進めた。
- v. 様々な質の初期胚を用いて、呼吸測定装置によって測定を行い、発生率との相関性を調べた。呼吸活性が高い胚ほど発生率が高いことが明らかになり、胚呼吸測定装置の有効性が実証された。

今後の研究展開

- i. 胚由来未分化細胞に由来する健全なクローン牛の効率的生産には至っていない。そこで今後も、核移植クローン胚・クローン牛生産のためのドナー細胞として、胚由来未分化細胞が体細胞に比べてどのくらい優れているかどうかを明らかにするための試験研究を継続して実施する。
- ii. ESM-1 培地と ES-PLATE を販売する。IVD-CL1 培地の製品化をさらに進め、販売する。



ウシ胚由来未分化細胞の培養とこの細胞を利用した核移植クローン牛生産の概略



新規無血清培養システムによるウシ胚由来未分化細胞株の初代細胞樹立効率

試験区	供試胚数	コロニー形成率 (%)
1	24	19 (79.2)
2	18	13 (72.2)
3	15	10 (66.7)
4	12	11 (91.7)
5	24	18 (75.0)
6	24	16 (66.7)
7	24	19 (79.2)
Total	141	106 (75.2)

樹立された胚由来未分化細胞株の特徴

	ICM-S細胞	TE-S細胞
アルカリフォスファターゼ活性	+	-
テロメラーゼ活性	+	+
Oct-4遺伝子発現	+	+
SSEA-1抗原発現	-	+
IFN- γ 遺伝子発現	-	+
キメラ胚形成能	+	+
	ES細胞	栄養膜幹細胞

胚由来未分化細胞(ICM-S細胞)をドナーとした核移植
クローン胚の移植成績

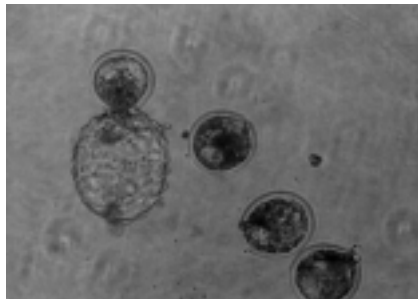
移植頭数	受胎数(%)	流産数	死産	生産数
1	8 (44.4)	5	1	2

- 1) 流産時胎齢(53日、66日、92日、133日、145日)
- 2) 死産(母牛の胎膜水腫)
- 3) 生産数(分娩事故により1頭死亡、1頭は生後12日で死亡)

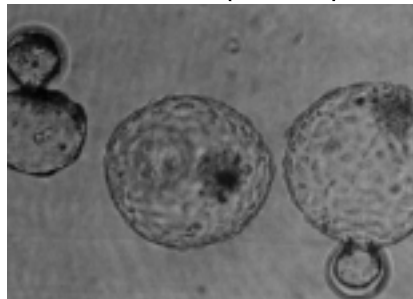


生産された未分化細胞(ICM-S細胞)由来のクローン牛(生後1日目)

IVD-101 培地(従来培地)



IVD-CL1 培地(新規培地)



IVD-101 又は IVD-CL1 培地を使用して作製した核移植クローン胚(融合後9日目)

IVD-101培地又はIVD-CL1D培地を使用した核移植胚の発生成績

発生培地	核移植卵子数	融合卵子数 ¹⁾	分割胚数 ²⁾	胚盤胞発生数 ³⁾
IVD-101	202	176(87.1%)	171(97.2%)	89(52.0%)
IVD-CL1	130	113(86.9%)	101(89.4%)	53(52.5%)

- 1) 融合後24時間に蛍光顕微鏡下で観察した。
- 2) 融合後48時間に観察した。
- 3) 融合後9日目に観察した。