

研究成果

<p>サブテーマ名：動物生体高分子による機能制御技術の開発 小テーマ名：初期胚の生命活動センシングと分子機構の解明</p>
<p>サブテマリーダー 山形大学理学部助教授 半澤直人 研究従事者 (株)機能性ペプチド研究所派遣 千代豊・星宏良・阿部宏之 山形県農業研究研修センター 青柳和重</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>研究の概要 クローン胚の体外受精培養システムの開発、初期胚の診断技術を活用する技術の確立</p> <p>研究の独自性・新規性 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、及び胚由来未分化細胞をドナーとするクローン胚作成システム（クローン牛生産）は、独自性が高く事業化・製品化に結びつく研究である。</p> <p>研究の目標</p> <p>フェーズ 体細胞等の単離と遺伝子導入技術の開発、再構築胚の評価試験と酸化ストレス検出系の確立</p> <p>フェーズ 再構築胚の評価基準の確立、体細胞によるジーンターゲット法の開発、再構築胚の酸化ストレスによる発生障害の予防技術開発</p> <p>フェーズ 移植可能なクローン胚の安定生産、モレキュラーファーミングへの展開</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況</p> <p>クローン胚の体外受精培養システムの開発に関しては、フェーズⅠでは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を目指し、核移植用ドナー体細胞（線維芽細胞）の最適な培養条件を明らかにし、効率的な遺伝子導入・遺伝子改変ドナー体細胞の分離を可能とした。しかし、体細胞クローンについては新たに技術を開発しても、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、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)を確立しつつある。</p> <p>初期胚の診断技術を活用する技術の確立に関しては、フェーズⅡで微小電極を用いたミトコンドリア膜電位測定によって、良質な胚と発生停止胚の識別、発生停止胚のDNA損傷による断片化とDNA断片化前の発生の異常の検出を可能とした。フェーズⅢでは、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。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <p>(1) 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、リポソーム法（改良型）が最も導入効率が良いことを明らかにした。</p> <p>(2) 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。</p> <p>(3) 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。</p> <p>(4) 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（現在、安定性試験を実施中）。</p>

特許出願件数：2（審査請求中1）

論文数：5

口頭発表件数：15

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

MEM 培地による核移植用ドナー体細胞（ウシ線維芽細胞）の培養、リボゾーム法（改良型）による線維芽細胞への遺伝子導入法は、今後基盤技術として普及する可能性が十分ある。

様々な質の初期胚の呼吸量測定結果から、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。

2 実用化に向けた波及効果

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））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見通しなので、この培養システムも広く購入される可能性が高い。

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。

新規クローン胚発生培地：IVD-CL1培地は、体外培養法の需用拡大に見合った購入が期待される。

残された課題と対応方針について

現時点では、胚由来未分化細胞に由来する健全なクローン牛が効率良く生産される状況には至っていない。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、胚由来未分化細胞の優位性を明らかにするための研究を継続する予定である。また、品質の良いクローン胚の選択は高い受胎率と正常産仔の効率的生産には不可欠であるため、電気化学顕微鏡による胚呼吸測定システムを活用した品質評価法の実証試験を継続する予定である。

	J S T 負担分（千円）							地域負担分（千円）							合計
	H10	H11	H12	H13	H14	H15	小計	H10	H11	H12	H13	H14	H15	小計	
人件費	2,148	5,850	6,642	6,548	6,615	3,361	31,164	10,267	17,588	17,588	3,566	3,500	1,750	54,259	85,423
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他研究費（消耗品費、材料費等）	1,751	2,422	5,409	2,919	2,847	2,748	18,096	3,228	5,555	2,971	1,588	600	300	14,242	32,338
旅費	547	773	324	46	38	13	1,741	220	434	144	107	0	0	905	2,646
その他	0	295	27	113	92	139	666	0	0	0	0	0	0	0	666
小 計	4,446	9,340	12,402	9,626	9,592	6,261	51,667	13,715	23,577	20,703	5,261	4,100	2,050	69,406	121,073

代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]

J S T 負担による設備：なし

地域負担による設備：なし