

2 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究

（3）ドナー体細胞の選定とクローン胚の効率的生産技術の確立

Effect of the cell treatments with some pharmacological agents on bovine cloned embryo derived from somatic cells

志村 英明・梅木 英伸・藤田 達男・志賀 一穂

要 旨

牛の体細胞核移植において、クローン胚の高メチル化状態とクローン胚・クローン産子の異常との関連性を指摘する報告がある。そこで、薬剤により脱メチル化等の化学的処理を行ったドナー細胞を用いて核移植を行い、クローン胚発生に及ぼす影響を調べた。

ドナー体細胞は腎臓および筋肉組織由来の細胞を使用し、継代時に50 μ M 5-Azacytidine, 1mM DMSO, 0.1mM Theophyllineをそれぞれ添加した培養液で4日間培養した後、処理した体細胞を使って核移植を行いクローン胚を作出した。

その結果、腎臓組織由来ドナー細胞における核移植成績は融合率(26.6~49.0%)、分割率(76.5~84.0%)、胚盤胞発生率(5.6~52.9%)、筋肉組織由来ドナー細胞における核移植成績は融合率(54.2~75.6%)、分割率(85.3~100%)、胚盤胞発生率(28.1~47.1%)となった。

以上のことから、上記3種類の薬剤を本実験の濃度で培養液に添加し4日間培養後、核移植を行いクローン胚を作成することが可能であることが判明した。

（キーワード：体細胞クローン胚、脱メチル化、リプログラミング）

背景及び目的

1997年にクローン羊ドリーの生誕が報告されて以来、牛、マウス、豚、ヤギ、猫、猿などの多くの動物におけるクローン動物が作成された。しかし体細胞核移植胚の生産効率の低いこと¹⁾や、受胎後の早期胚死滅、胎児の死産や呼吸器障害による生後直死、過大児など多くの問題^{2~9)}が生じているため、核移植によるクローン技術の実用化にはまだ多くの課題がある。体細胞核移植におけるドナー細胞はすでに個体となり分化したものを扱うため、クローン胚となり発生するには分化した細胞のDNAをリセット（初期化）し、細胞が様々な組織に分化できる多分化能を獲得するためのリプログラミングの重要性が注目されている。なかでも近年、クローン胚DNAの遺伝子発現やメチル化パターンの異常を示す報告がされ^{10~13)}、クローン初期胚各ステージにおける遺伝子発現様式が通常胚とは異なるパターン

を示すことはクローン胚におけるDNAメチル化異常が原因の一つと考えられている^{14,15)}。DNAのメチル化とはシトシンにメチル基を付加することであり、これにより遺伝子発現を抑制すると考えられ、分化が進み特定の機能を有する細胞は高メチル化状態にある。通常、受精直後の胚は高いメチル化状態であるが、その後低メチル化状態になり、胚細胞の分化に伴って高メチル化状態に移行していく¹⁶⁾。核移植に供試するドナー体細胞は、筋肉組織などのように分化し、ある特定の機能のみを有する細胞を扱うため高メチル化状態にある。牛クローン胚においてもあるDNA領域において高メチル化状態であることが報告され^{17,18)}、クローンにおける異常の原因の一つと考えられている。そのため、低メチル化ドナー細胞を使い核移植を行えば、クローン胚の高メチル化状態が改善できる可能性がある。特に5-AzacytidineはDNAメチルトランフェラーゼインヒビター

であり、ドナー細胞DNAのメチル化を低下させることが期待できる。DMSO（dimethylsulphoxide）については核移植の際、活性化処理の時に添加することでクローン胚発生や出生を改善するとの報告¹⁹⁾がある。そのため、薬剤処理することによりクローン胚における問題を改善できる可能性があると考え、脱メチル化薬剤および活性化処理薬剤により処理した細胞を核移植に供試し、クローン胚の発生に及ぼす影響を調べた。

材料及び方法

1. 薬剤を添加し培養したドナー体細胞が核移植に及ぼす影響

細胞は筋肉組織由来及び腎臓組織由来の繊維芽細胞を用い、継代時にそれぞれ各薬剤（50 μ M 5-Azacytidine, 1mM DMSO, 0.1mM Theophylline）を添加した培養液で4日間培養後核移植に供試した。卵巣は屠場で採取し、卵丘細胞-卵子複合体（Cumulus-oocyte Complexes, 以下COCs）の回収は2～5mm径の卵胞から18Gの注射針を付けた5mlディスポーサブル注射器を用い卵胞液を吸引した。その後、100IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin を加えた20%非働化子牛血清（以下、CS）添加ダルベッコの燐酸緩衝液（Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco BRL、以下mPBS）中でCOCsを選別し、ミネラルオイルをカバーした5%CS加TCM199（Gibco BRL）100 μ lドロップに20個前後入れ38.9、5%CO₂、95%空気の湿潤気相下で20時間成熟培養後の牛体外成熟卵子を体細胞クローン胚作出に使用した。成熟培養終了後、1%ヒアルロニダーゼ添加Hank's液（Gibco BRL）中でピペティングにより卵丘細胞を卵子より剥離し裸化した。これら裸化した卵子を実体顕微鏡下で第1極体が観察された成熟卵子（M期卵母細胞）を選別し、これらの中から均一な細胞質をもつ卵子を選別して受核卵子として用いた。これら成熟卵子を0.05 μ g/ml Cytocalasin B（Sigma）を含んだmPBS中で第1極体付近の透明帯をガラス微細針で切開後、同針を使って透明帯上部から押し下げて細胞質の一部とともに第1極体を押し出すことによって除核を行った。除核終了後、同液中で除核卵子の囲卵腔にドナー体細胞を挿入した。ドナー体細胞を

挿入した除核卵子を1mm間隔のワイヤーチャンパーと融合装置（BTX社 ECM2001、USA）を使い、0.01%BSA添加Zimmerman Cell Fusion Medium²⁰⁾を満たしたチャンパー内でドナー体細胞と除核卵子の細胞質膜接着面が平行になるように調整し、1kV/cmの直流パルス50 μ 秒間、2回印加し融合を行った。活性化処理はCa ionophore A23187（Sigma）を10 μ M含んだTCM199に5分間引き続き10 μ g/ml Cycloheximide（Sigma）を含んだTCM199中で4時間おこなった。発生培養は5%CS加 modified synthetic oviductal fluid²¹⁾にアミノ酸を加えた（以下 mSOF）もので38.9、5%O₂、5%CO₂、90%N₂の湿潤気相下で行った。体細胞の継代は、容器の分量の細胞を新しい同容器で培養することで、理論上1回の分裂増殖を行われたものとした。

成績の統計処理方法

試験成績の統計解析は²検定によりおこない、危険率5%未満を有意差有りとした（P<0.05）。

結果および考察

1. 薬剤を添加し培養したドナー体細胞が核移植に及ぼす影響

各種薬剤を添加した培養液で処理した腎臓由来ドナー細胞を用いた核移植成績を表1、同じく筋肉組織由来ドナー細胞を用いた核移植成績を表2に示した。腎臓、筋肉組織由来の細胞を上記薬剤処理後、核移植を行っても移植可能なクローン胚が発生することが判明した。腎臓由来の核移植成績については、融合率が低く胚盤胞発生率も大きくばらついているが、対照区の融合率や胚盤胞発生率が低いことを考慮すると薬剤処理が核移植成績に大きな影響を与えたとは考えにくい。筋肉組織由来の細胞をドナー細胞として核移植を行った場合では融合率がやや低い傾向がみられるが、対照区の融合率が低いことを考慮すると薬剤による影響は本試験の核移植成績において無いと考えられる。しかし、Enright²²⁾やJones²³⁾らは、5-Azacytidine を本試験の濃度よりも低い（0.08～5 μ M）濃度で処理した細胞でのクローン胚発生率は低下することを報告し、低メチル化が必ずしもクローン胚発生を改善するとは限らず、高い濃

表1 腎臓組織由来細胞を各種脱メチル化剤を培養液に添加、培養後の核移植成績

処理 薬剤	試験 回数	融合処理 個 数	融合 個数（％）	分割 個数（％）	胚盤胞 発生個数（％）
試験区	1	47	18(38.0) ^a	14(78.0)	1(6) ^a
試験区	1	64	17(27.0)	13(76.0)	9(53) ^b
試験区	1	51	25(49.0) ^a	21(84.0)	7(28)
対照区	1	54	7(13.0) ^b	5(71.0)	1(14)

注) 同列異符号間に有意差有り：a-b(p<0.05)

試験区：50 μM 5-Azacytidine処理、試験区：1mM DMSO処理、試験区：0.1mM Theophylline処理

表2 筋肉組織由来細胞を各種脱メチル化剤を培養液に添加、培養後の核移植成績

処理 薬剤	試験 回数	融合処理 個 数	融合 個数（％）	分割 個数（％）	胚盤胞 発生個数（％）
試験区	1	45	34(76.0)	34(100)	16(47)
試験区	1	55	34(62.0)	29(85.3)	10(29.4)
試験区	1	59	32(54.0)	30(93.8)	9(28.1)
対照区	1	56	33(58.9)	30(90.9)	16(48.4)

試験区：50 μM 5-Azacytidine処理、試験区：1mM DMSO処理、試験区：0.1mM Theophylline処理

度の 5-Azacytidine 処理はドナー細胞に毒性効果を及ぼすおそれがあると指摘している。そのため、本試験の結果からは上記の薬剤処理をした細胞を用い核移植を行ってもクローン胚作成には大きな影響を及ぼさないことが推察できるが、試験回数が少なく試験ごとのバラツキが大きいことから断定は出来ない。

2. 薬剤を添加した培養ドナー体細胞の形態変化

今回の実験では50μM 5-Azacytidine 処理した腎臓細胞では著しい細胞増殖抑制がみられたため（データ不掲載）、筋肉組織由来細胞においては濃度を6.25,12.5,25,50μM 5-Azacytidine に調整したものとDMSO、Theophylline については先と同じ濃度での培養を行い比較した。核移植に供試した核移植直前（4日目）の細胞を図1～8に示した。図2のDMSO 添加区の細胞については一見対照区と変わらず良好な増殖を示したが、よく見ると対照区が紡錘形をしているのに対し少し平面的で不定形なものが多数見られた。図3、4のTheophylline 添加区に

については明らかに細胞の変性がみられ、神経細胞の樹状突起のような形状をした細胞が多数見られた。図5～8の 5-Azacytidine 添加区については濃度依存性に細胞増殖抑制がみられ、50μM 濃度では細胞はわずかに壁に付着し浮いている状態に近いためであると思われるが、丸い形状を示した。Enright ら²²⁾も 5-Azacytidine を処理した際に細胞の形態が変わることを報告しているため、5-Azacytidine 処理が細胞の形態や増殖に影響を及ぼしたものと考えられる。今回の試験では得られたクローン胚の分子生物学的な評価は行っていない。今後正常なクローン牛生産のためには、処理したドナー細胞を核移植に供試し作成されたクローン胚をメチル化などの分子生物学的な評価を行い通常胚に近づける研究が必要だと考えられた。

図1 核移植直前の細胞（対照区）

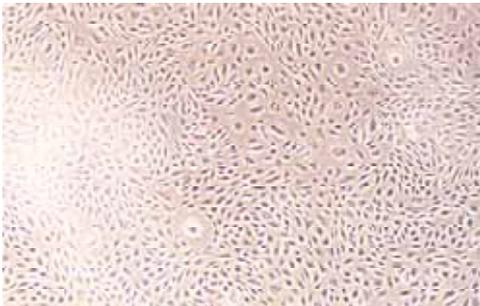


図2 核移植直前の細胞（試験区）

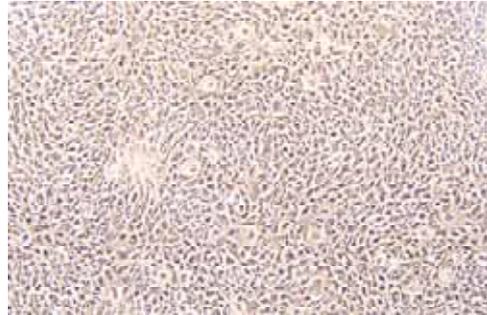


図3 核移植直前の細胞（試験区）

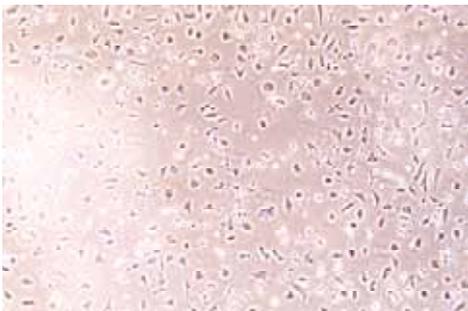


図4 核移植直前の細胞（試験区）

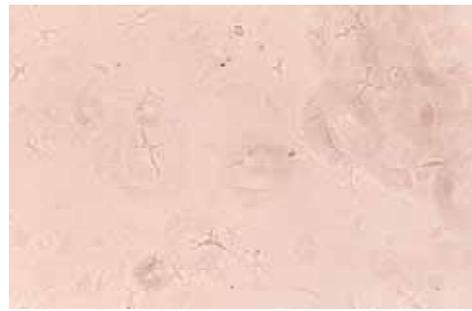


図5-1 核移植直前の細胞（試験区、6.25 μ M）



図5-2 核移植直前の細胞（試験区、6.25 μ M）

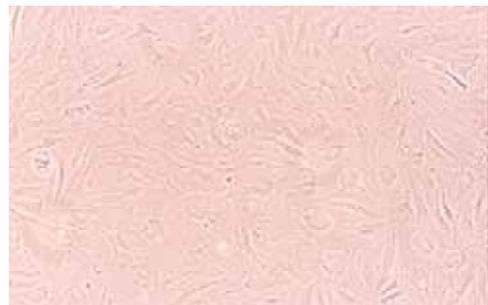


図6-1 核移植直前の細胞（試験区、12.5 μ M）



図6-2 核移植直前の細胞（試験区、12.5 μ M）



図7-1 核移植直前の細胞（試験区、25 μ M）



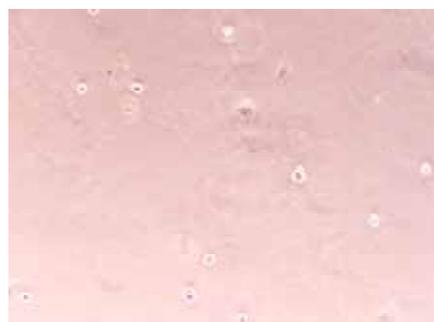
図7-2 核移植直前の細胞（試験区、25 μ M）



図8-1 核移植直前の細胞（試験区、50 μ M）



図8-2 核移植直前の細胞（試験区、50 μ M）



謝辞

本試験を遂行するにあたり、牛の卵巣の提供と採取にご協力頂いた大分県畜産公社ならびに食肉衛生検査所の方々に深謝いたします。なお、本試験は地域先端技術共同研究開発促進事業によって行った。

引用文献

- 1) Campbell KHS. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1:3-15, 1999.
- 2) Hill JR, Roussel AG, Cibelli JB, Edwards EJ, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. Clinical and pathological features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51:1451-1465, 1999.
- 3) Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic

cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 63:1787-1794, 2000.4) Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 120:231-237, 2000.

- 5) Taneja M, French R, Levine H, Tauro-Miller D, Yang X. Clinical and pathological status of cloned calves born pre-term. *Theriogenology* 55:293(abstract), 2001.
- 6) Renard J-P, Chastnat S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 353:1489-1491, 1999.
- 7) Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 399:316-317, 1999.
- 8) Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro KL, Niida H, Blanchard DC, Ogura A, Tanemura K, Tachibana M, Perry AC, Colgan DF, Mombaerts P, Yanagimati R.

- Cloning of mice to six generations. *Nature* 407:318-319,2000.
- 9) Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 66:6-13,2002.
- 10) Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine Blastocysts. *Biology of reproduction* 65:309-317,2001.
- 11) Fei Xue, X. Cindy Tian, Fuliang Du, Chikara Kubota, Maneesh Taneja, Andras Dinnyes, Yunping Dai, Howard Levine, Lygina V. Pereira, Xiangzhong Yang. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature* 31:216-220, 2002.
- 12) Fahrudin M, Otoi T, Karja NWK, Mori M, Murakami M, Suzuki T. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124:813-819, 2002.
- 13) Baran V, Vignon X, LeBourhis D, Renard JP, Flechon JE. Nucleolar changes in bovine nucleotransferred embryos. *Biology of reproduction* 66:534-543,2002.
- 1) Young Gie Chung, Sarayu Ratnam, J. Richard Chaillet, Keith E. Katham. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol Reprod* 69:146-153,2003.
- 15) Mellissa R. W. Mann, Young Gie Chung, Leisha D. Nolen, Raluca I. Verona, Keith E. Latham. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod* 69:902-914,2003.
- 16) Wolf Reik, Wendy Dean, Jorn Walter. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1092,2001.
- 17) Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genet* 28:173-177,2001.
- 18) Yong-Kook Kang, Jung Sun Park, Deog-Bon Koo, Youn-Hee Choi, Sun-UK Kim, Kyung-Kwang Lee and Yong-Mahn Han. *The EMBO Journal* Vol 21 No5:1092-1100,2002.
- 19) T. Wakayama, R. Yanagimachi. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122:49-60,2001.
- 20) Wolfe BA, Kraemer DC. *Methods in bovine nuclear transfer. Theriogenology* 31:5-15, 1992.
- 21) Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978,1992.
- 22) Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by Trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biology of reproduction* 69:896-901,2003.
- 23) Jones KL, Hill J, Shin TY, Lui L, Westhusin M. DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation. *Mol Reprod Dev* 60:208-213,2001.

