

氏 名 (本 籍)	岡 原 純 子 (滋 賀 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 5 0 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 5 月 3 1 日
学 位 論 文 題 目	Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>) (カニクイザル (<i>Macaca fascicularis</i>) における体細胞核移植によるクローン胚盤胞期胚の作製)
審 査 委 員	主 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 後 藤 敏 副 査 教 授 岡 田 裕 作

論文内容要旨

*整理番号	549	(ふりがな) 氏名	おかほら じゅんこ 岡原 純子
学位論文題目	Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>) (カニクイザル (<i>Macaca fascicularis</i>) における体細胞核移植による クローン胚盤胞期胚の作製)		
<p>[目的]</p> <p>分化した細胞を除核未受精卵子に核移植することによって 1995 年世界で初めてクローン動物が作られて以来、様々な種類の体細胞から多くの動物種 (ヒツジ、ウシ、マウス等) でその作製が報告されている。この核移植法を用いれば分化した体細胞が未分化細胞にリセットされ、作製されたクローン胚から移植核由来の遺伝子を持つ ES 細胞を樹立出来ることが、すでにマウスやウサギ等で確認されている。これはまた、疾病等による機能細胞の欠損をもつ患者の体細胞核を用いてクローン胚を作製しそこから ES 細胞を樹立後目的の機能細胞へ分化させ細胞移植することができれば、拒絶反応のない再生医療が可能になることを示している。本研究はマウスやウシなどで行われている体細胞クローン胚作製法をさらに発展させ、ヒトの再生医療に適した体細胞核移植法を確立することを目的に、形態や生理機能、行動などが最もヒトに近似するサルを用いて検討した。とくに、体細胞核移植に至適なドナー細胞の種類、核移植の方法に加え、ドナー核を移植した際の初期に認められる核膜崩壊 (NEBD) と未成熟染色体凝集 (PCC) の時間に注目し、さらに初期化時間 (注入または融合から活性化までの時間) と活性化の方法についても検討した。</p> <p>[方法]</p> <p>レシピエントの成熟未受精卵子は、成熟メス、カニクイザルの月経初日に GnRH を投与し、2 週間後から FSH を 9 日間連続投与、翌日 hCG を投与し 40 時間後に腹腔鏡観察下で吸引採取した。ドナー細胞は、32 日齢の胎子から採取した胎子繊維芽細胞 (FFC)、妊娠末期帝王切開時に採取した羊膜細胞 (AEC) をそれぞれコンフルエントの状態ですべて 7 日間培養することによって G0/G1 期へと同調し、また GFP-ES 細胞 (ESC)、卵丘細胞 (CC) をそれぞれ用いた。核移植に先立つ除核方法は、成熟未受精卵子をヘキストとサイトカラシン B 処理を行った後、ピエゾマイクロマニピュレーター (ピエゾと略) をつけた倒立顕微鏡下で卵子の染色体を除去した。核移植法は、ピエゾ注入法と電気融合法を行った。前者は、除核卵細胞質内にピエゾによりドナー核を注入した後、1、2、4 時間後に ionomycin (IM)/6-dimethylaminopurine (DMAP) により活性化を行った。後者は、除核卵子の卵胞腔にドナー細胞をピエゾにより注入し、電気刺激 (30V/100μm, 50μsec x 2) を加え卵子細胞質とドナー細胞を融合した後、1 時間後に calcium ionophore (IA)/DMAP、IM/DMAP、cycloheximide (CHX) により活性化を行った。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

[結果]

ピエゾ注入法ではESC、AEC、CC、FFCの除核率は71-97%、注入後の生存率はそれぞれ90、88、67、85%であった。その後2細胞期胚への分割率は、ESCの20%からAECの87%まで細胞間で差が見られ、この中で分割率66%を示したFFCの初期化時間1時間、活性化にIM/DMAPを用いた方法のみ胚盤胞期胚(22%)を得ることができた。なおNEBDとPCCは、注入直前と注入後10分では観察されなかったが1、2、4時間には確認でき、さらに活性化後には、染色体は脱凝集を起し核膜が再形成され移植核が再構築されたことを確認できた。一方電気融合法ではESC、AEC、CC、FFCで除核率は75-89%であったが、融合率はそれぞれ35、44、62、11%であった。サル卵子は電気刺激だけでは細胞質を活性化出来ず薬品による活性化が必要であることを確認していたことから、電気融合1時間後(初期化1時間)にIM/DMAP、IA/DMAPまたはCHXで活性化した核移植胚の発生を比較した。その結果、分割率は、20%(FFC)から100%(AEC)と細胞間で差が見られ、分割率の良かったAECにおいてのみCHX、IM/DMAPで胚盤胞期胚(9%、39%)を得ることができた。

[考察]

体細胞核移植法の確立を目指してドナー細胞の種類、核移植の方法、初期化時間、活性化処理法を比較検討した結果、カニクイザルの胎子繊維芽細胞(FFC)と羊膜細胞(AEC)において初期化時間は1時間、活性化方法はIM/DMAPにより核移植胚を高率に胚盤胞期胚へと発生させることができた。この時胎子繊維芽細胞はピエゾ注入法、羊膜細胞は電気融合法でそれぞれ胚盤胞期胚が得られたことは、ドナー細胞に適した核移植法があることを示唆している。また、核移植後ドナー核に最初に生じる形態的変化であり初期化の第一ステップとなるPCCが確認できたことは、除核卵細胞質へ移植されたG0/G1期のドナー細胞核が再構築されたことを示していた。また、ドナー核注入2時間後に活性化を行った再構築胚の核相は、活性化処理により染色体の脱凝集と核膜の再形成が観察され、発生に向けて細胞周期が再開されたことも確認できた。

[結論]

カニクイザルの体細胞核移植法について検討した結果、胎子繊維芽細胞はピエゾ注入法で、羊膜細胞は電気融合法でそれぞれ胚盤胞期胚の作製に世界で初めて成功した。このなかで、体細胞の核移植法は一律に行えるものではなくドナーの細胞の種類によりそれぞれ至適な方法があること、またそれには初期化に見られるPCCが重要な指標になることを明らかにし、今後ヒトの再生医療の実用化に向けドナー細胞の選択とそれに適した核移植方法を検討する必要があることを指摘した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	19	氏名	岡原 純子
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、体細胞核移植由来 ES 細胞をヒト再生医療に応用するために、カニクイザル体細胞核移植方法を検討したものである。</p> <p>その結果、次のことを明らかにした。</p> <ul style="list-style-type: none">● 体細胞核移植方法として、初期化時間は 1 時間、活性化試薬はイオノマイシン+DMAP が適していた。● この条件下で、羊膜細胞と胎子線維芽細胞を用いたときに胚盤胞期胚の作製に成功した。● 核移植法は、羊膜細胞は電気融合法、胎子線維芽細胞はピエゾ注入法が適していた。● 体細胞核移植を行い、移植核の再編成(PCC)を確認した。● 活性化により核膜の再形成を確認し、細胞周期が再開されたことを示した。 <p>以上のことから、カニクイザル体細胞核移植方法は、ドナー細胞の種類により核移植法(電気融合法/ピエゾ注入法)、初期化時間、活性化試薬の最適な組み合わせが異なることが明らかになった。</p> <p>このように、本研究はカニクイザル体細胞核移植により胚盤胞期胚を作製することに初めて成功し、あわせて体細胞核移植技術を再生医療へ応用することの可能性を示唆した論文であり、博士(医学)の学位論文に値する。</p>			
(平成 19 年 2 月 8 日)			