

平成28年3月29日

各報道機関 御中

尿に含まれていた細胞からクローンマウスの作出に成功

— 絶滅危惧種保護の可能性を示す —

本学大学院総合研究部生命工学専攻の水谷英二助教、若山照彦教授、発生工学研究センターの若山清香特任助教らの研究グループは、尿に含まれていた細胞から直接クローンマウスを作出することに初めて成功し、イギリスの科学雑誌 Nature 姉妹誌の「Scientific Reports」(4月1日付け)にオンライン掲載されます。

Scientific Reports 掲載 URL

<http://www.nature.com/articles/srep23808>

本研究のポイント

- 個体を傷つけることなくドナー細胞の採取が可能
- 尿中の細胞からクローン個体作出およびクローン ES 細胞樹立に成功
- 劣悪な環境で回収した少量の尿を利用可能なため絶滅危惧種への応用も期待できる

本学は体細胞クローン技術の基礎研究を専門に行っていますが、応用を視野に入れた研究の一環として絶滅動物の復活や絶滅危惧種の救済についても検討しています。絶滅危惧種や野生動物にクローン技術を応用する場合、ヒトに慣れていないため、捕まえて体を押さえつけるだけでも死んでしまう危険性があることから、動物にストレスを与えずに簡便に体細胞を回収する必要があります。今回我々は、尿の中に存在する細胞から直接クローンマウスを作出することに初めて成功しました。

これまでも毛や唾液など個体を全く傷つけずに DNA を採取する方法はいくつか報告されています。しかしそれらに含まれる細胞は角質化しており、親子鑑定のための DNA 抽出には使えてもクローン動物の作出には使えませんでした※1。一方、尿の中に体細胞が含まれていることは古くから知られており、それらの細胞を無菌状態で回収できれば実験室で増殖させることも可能でした。しかし絶滅危惧種など野生動物から尿を無菌的に採取することは難しく、またげっ歯類など小型動物からはわずかな尿しか回収できないため、実際に尿が本目的に利用可能かわかっていませんでした。

我々は非無菌状態で尿を採取し、尿中にあった細胞を直接核移植に使用したところ、オスでもメスでも、あるいは高齢個体でも、その尿細胞からクローンマウスを作出することができました。また得られたオスとメスのクローンマウスを交配したところ、正常な繁殖能力を有することが確認されまし

た。さらに、クローン胚からクローン ES 細胞※2 の樹立にも成功しました。樹立成績は高く、尿細胞が 15 個あれば 1 株できる計算になります。

これらの成果から、本方法は絶滅危惧種など貴重な動物において、体をいっさい傷つけずにクローン個体を作出する重要な手段になり得ること、野生動物など尿を無菌状態で採取することが困難な動物や、小型で回収できる尿の量が少ない動物であっても、直接核移植であればクローン個体やクローン ES 細胞を作るために十分な細胞数が得られることが明らかとなりました。

1. 背景

絶滅危惧種の救済は、自然な交配が可能であればそれに越したことはありませんが、子孫に伝わらなかった遺伝子は親の死とともに失われてしまいます。遺伝子の多様性を維持し、絶滅危惧種を存続させるためには、個体の持つ全遺伝子資源を保全できるクローン技術が非常に効果的です。これまでに絶滅危惧種である水牛の一種やヤギの一種がクローン技術で作られています。

しかし野生動物の場合、体細胞を採取するために捕まえて体を押さえつけるだけでもストレスで死んでしまう場合があるため、ドナー細胞の採取が最初の関門となっています。毛髪や唾液などは、個体に触れずに DNA を採取できることが知られていますが、それらから回収された DNA は多数の細胞の核が混ざっており、親子鑑定や個人の特定などには利用できても核移植には使えません。核移植では 1 つの細胞の核を 1 つの卵子へ移植しなければならないからです。

他に細胞が回収できる試料としてはウシの初乳が知られており、実際にクローンウシが初乳の細胞から生まれています。しかし初乳は子牛を生んだ直後のメスしか出ません。絶滅動物の救済には、オスからでもメスからでも、若くても老齢でも、体を傷つけずに細胞を回収できる試料が必要です。

一方、尿には排尿の際に尿管上皮細胞などが一緒に流れ出ることが知られており、最近はそれらを無菌で培養して増やすことができるようになってきました。一度増やすことに成功したら、あとは通常の細胞と同様に様々な実験で利用できます。実際、それらの細胞からヒト iPS 細胞の樹立やクローン牛の作出も報告されています。

しかし、ヒトや家畜など大量に尿が入手できる場合なら、尿から状態の良い細胞を取り出し、無菌で増殖させることが可能ですが、野生動物やマウスのような小動物の場合、無菌での回収は難しく、得られる尿や細胞もわずかであり、増やして利用することは出来ません。

そこで我々は、尿から回収した細胞を直接利用してクローンマウスの作出が可能かどうか検討しました。もし可能であれば、大量のドナー細胞は必要なく、また無菌で採取する必要もないことから、野生動物への応用も可能になると思われます。

2. 研究方法

(1) 使用したマウスの種類

遺伝的背景の異なる4種類のマウス※3 のオスとメスを用いました。異なる系統を用いたのは、個体差や系統差があっても可能であることを証明するためです。

(2) 尿の採取

マウスの背中を常法に従って優しくつかみ持ち上げると、マウスはすぐに排尿をします。その尿をディッシュに受けとり、尿の量と細胞数を測定し、すぐに核移植に用いました。

(3) 核移植によるクローンマウスの作出

我々が 1998 年に発表したマウスの核移植方法をもとに、最新の改良を加えた方法で行いました。得られたクローン胚は、2 細胞期まで発生したことを確認後、雌マウスの卵管へ移植し、19 日後に

帝王切開にてクローン産仔を得ました。

(4) クローンES細胞の樹立

核移植で得られたクローン胚盤胞を、ES細胞樹立培地で培養することでクローン胚からES細胞（クローンES細胞と呼びます）を樹立しました。得られたクローンES細胞については、ES細胞特異的マーカーなどでES細胞と同等の未分化性を有することを確認しました。

3. 結果

(1) 尿の細胞

マウスは一度に数十から数百 μ lしか排尿しません。その尿内に含まれる細胞数は個体差が大きく、100個もの細胞が見つかる個体もあれば、1つも見つからない個体もありました。しかし尿の採取は個体を傷つけないため、1日に何度でも回収することが可能です。図1Cに示すように、1度の採尿で細胞が見つからなかった個体でも、数回採尿すると細胞を回収することができました。

尿内には大きくてかたい細胞もありましたが、大部分は小さくて丸くやわらかい細胞であり、核移植に適していました。それらの細胞は大部分が生きていました。

(2) クローン胚の発生およびクローンマウスの作出

核移植した胚を4日間培養したところ、いずれの系統および性別でも38%から77%の胚がクローン胚盤胞へ発育しました(表1)。得られた胚盤胞を染色し、胎児側および胎盤側へ分化した細胞数 $\times 4$ を数えた結果、正しく発生していることが確認できました(図2C-D)。

2細胞期のクローン胚を卵管へ移植したところ、1歳齢の129B6F1のメスの尿細胞から1匹、3か月齢のBDF1のメスから2匹、オスから1匹のクローンマウスが生まれました(表2)。このうち、BDF1マウスの尿由来のクローンマウス(雌雄1匹ずつ)は、性成熟後に交配したところ、交尾し子供を普通に出産しました。したがって、これらのクローンマウスは外見が正常で健康だけでなく、正常な繁殖能力も有していることが分かりました。

(3) クローンES細胞の樹立

クローン胚盤胞をES細胞樹立培地で培養したところ、すべての系統と雌雄から合計26株のクローンES細胞が樹立できました。樹立成績は24%(26株/108胚盤胞)でした。ランダムに6株選び未分化マーカー $\times 5$ で未分化の確認を行ったところ、すべて陽性でした。クローンES細胞はES細胞と同様に未分化状態を保ちながら無限に増え、キメラを経由することで子孫を作ることが可能です。遺伝子資源の保全という意味ではクローン個体を作ることと同等の価値があります。

3. 今回の成果

今回我々は、尿内に含まれている細胞が、無菌で培養して増やさなくてもクローン動物の作製に使えることを証明しました。野生動物のように無菌で尿を採取できない場合や、小型動物のように尿がほとんど得られない動物であっても利用できることとなります。

また、クローンES細胞の樹立成績はとても高く、クローン胚盤胞からなら24%、核移植した卵子数(=使用した尿細胞数)からでも6.7%(26株/389卵子)の成績でした(表1)。これは、尿細胞が15個あれば1株樹立できるという計算になります。尿に含まれている細胞数はあまり多くありま

せんが、数十個程度あれば核移植によりクローンES細胞の樹立が期待できるため、実際の応用では出産成績の低いクローン動物作出よりクローンES細胞の樹立を優先的に行うべきだと思われます。

4. 今後の期待

今回は採取直後の尿から細胞を回収して核移植に使用しました。しかし実際に野外で採取した尿は、排出されてから時間がたっているはずで、より現実的な条件として、今後は排尿後何時間まで尿細胞が核移植のドナーとして使えるか検討予定です。

原論文情報

Generation of cloned mice and nuclear transfer embryonic stem cell lines from urine-derived cells

Eiji Mizutani^{1,2,*}, Kohei Torikai¹, Sayaka Wakayama², Hiroaki Nagatomo³, Yasuhide Ohinata¹, Satoshi Kishigami¹, Teruhiko Wakayama^{1,2,*},

¹ Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi, 4-4-37 Takeda, Kofu-shi, Yamanashi, Japan

² Advanced Biotechnology Center, University of Yamanashi, 4-4-37 Takeda, Kofu-shi, Yamanashi, Japan

³ COC Promotion Center, University of Yamanashi, 4-4-37 Takeda, Kofu-shi, Yamanashi, Japan

Scientific Reports. 6: 23808; doi: 10.1038/srep23808(2016)

<補足説明>

※1 親子鑑定のための DNA 抽出とクローン動物作製のための核の回収方法の違い

親子鑑定や刑事事件などで個人の特定を行う場合、体毛やフケ、体液といった試料から DNA を抽出して調べます。したがって得られた DNA は、試料に含まれる大量の細胞の核が混ざった状態となります。一方クローン動物を作成するためには、1つの細胞から取り出した1つの核だけを、1つの卵子へ移植しなければなりません。そのため、DNA 鑑定で用いられる DNA 抽出方法は、クローン動物作製に使用できないのです。

※2 クローン ES 細胞

核移植後4日間培養すると、クローン胚はクローン胚盤胞へ発生します。この胚をさらに ES 細胞樹立用培地で培養し続けると、ES 細胞と全く同じ性質を持つ細胞株として樹立することが可能です。我々はこれをクローン ES 細胞（論文内では核移植 ES 細胞、ntES 細胞）と呼んでいます。多能性であり、キメラを形成させることで次世代を作ることにも可能なため、クローン ES 細胞は遺伝子資源の保全にも役立ちます。またクローン ES 細胞の樹立成績はクローンマウスの出産率より高いため、比較的簡単に樹立可能です。

※3 使用したマウスの系統について

この実験で使用したマウスは、129B6F1、B6D2F1、129/Sv、および C57Bl/6 系統です。

※4 胎児側および胎盤側へ分化した細胞数

胚盤胞になると、胚は将来胎児へ発育する内部細胞塊（ICM）と栄養膜外胚葉（TE）に分化します。この時期の ICM と TE の細胞数を調べることで、胚盤胞の質を調べる事が可能です。もし胎児になる ICM 数が少なければ、見た目はきれいな胚盤胞であっても、将来産仔まで発育する可能性が低い胚ということになります。

※5 未分化マーカーについて

本研究ではアルカリフォスファターゼ（AP）染色および Oct4 の免疫染色を行いました。AP は未分化細胞全般に共通して発現している酵素です。Oct4 は初期胚や ES 細胞の多能性維持に必須の転写因子です。どちらも ES 細胞では必ず発現しており、逆に分化した細胞では見られません。

（注）別紙にはカラー写真等がありますので、ご入用の方は下記広報担当までお知らせください。

（本件に関する問い合わせ先）

山梨大学大学院総合研究部生命工学専攻

教授 若山 照彦 twakayama@yamanashi.ac.jp

助教 水谷 英二 emizutani@yamanashi.ac.jp

TEL : 055-220-8826 FAX : 055-220-8827

（広報担当）

同 総務部総務課広報グループ

TEL : 055-220-8006 FAX : 055-220-8799

E-mail : koho@yamanashi.ac.jp

表 1. 尿細胞で作られたクローン胚の体外発生およびクローン ES 細胞の樹立成績

マウスの種類	性別	使用した卵子			胚の発生成績 (72 時間)			クローン ES 細胞の樹立数 (%)
		数	生き残った卵子数	偽前核形成	1-2 細胞期	4-8 細胞期	桑実期・胚盤胞 (%)*	
129B6F1	メス	44	33	17	18	2	13 (76)	6 (46) ^a
B6D2F1	メス	69	55	41	26	8	21 (51)	2 (10) ^b
129/Sv	メス	57	47	42	19	12	16 (38)	4 (25) ^c
129/Sv	オス	75	62	46	39	5	18 (39)	9 (50) ^{a,e}
C57BL/6	メス	72	54	42	20	14	20 (48)	4 (20) ^f
C57BL/6	オス	72	52	39	22	9	21 (54)	1 (5) ^{b,d}
Total		389	303	227	144	50	109 (48)	26 (24)

^a vs ^b; ^c vs ^d; ^e vs ^f: $P < 0.01$. *偽前核形成に対する%

表 2. 尿細胞由来クローンマウスの出産成績

マウスの種類	性別	使用した卵子			胚の発生成績 (24 時間)		生まれたクローンマウス (%)*
		数	生き残った卵子数	偽前核形成	1-細胞期	2-細胞期 (%)	
129B6F1	メス	105	86	72	26	60 (83)	1 (2)
B6D2F1	メス	261	221	202	66	155 (77)	2 (1)
B6D2F1	オス	96	87	37	55	32 (86)	1 (3)

*偽前核形成に対する%

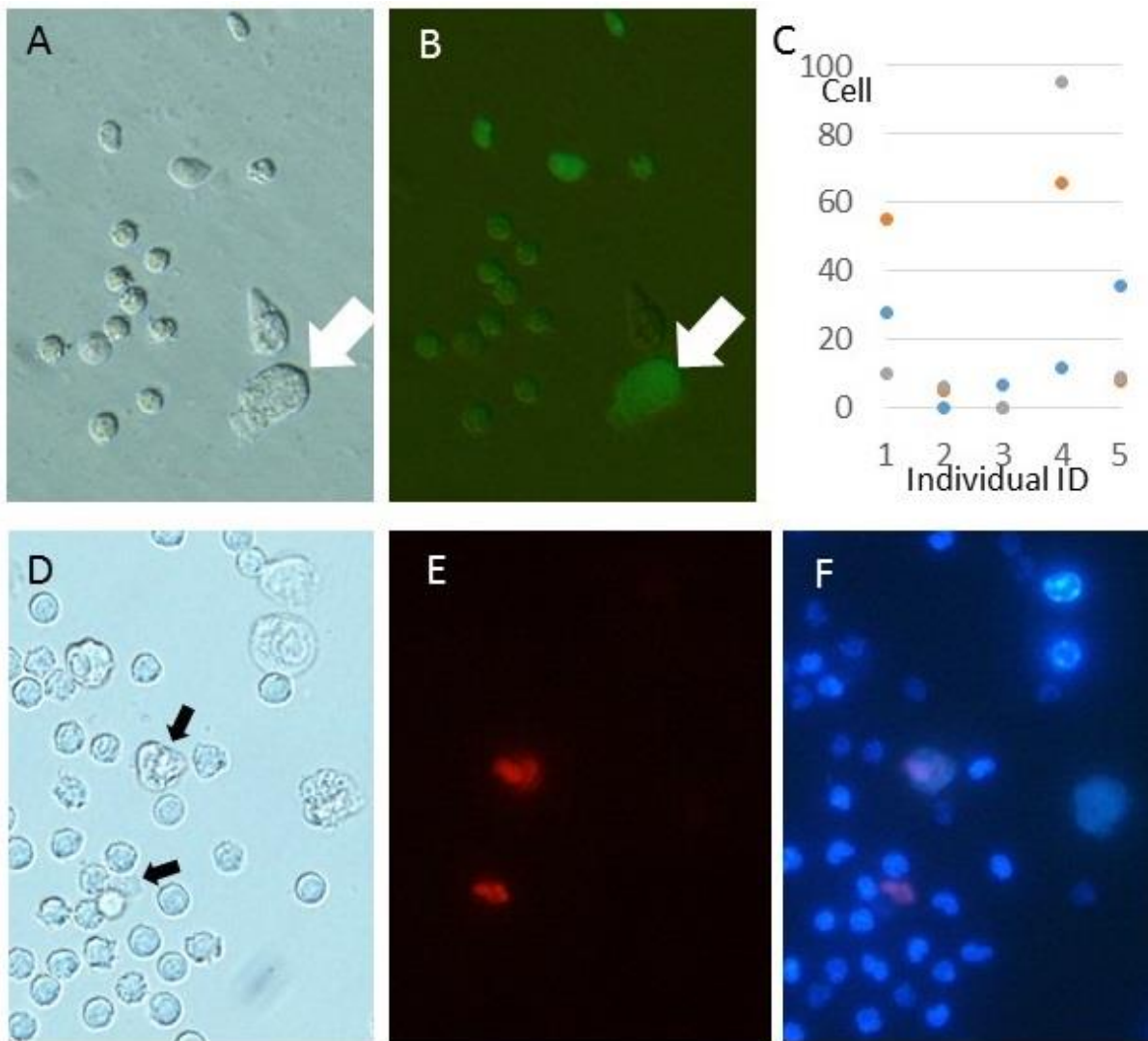


図1. 尿に含まれている細胞について

A, B: GFP マウスの尿から回収した緑に光る尿由来細胞。巨大な細胞も見つかるが、小さく丸い細胞が核移植に適していた。C: 5匹のメスマウスの尿を3回（3日間）回収し細胞数を測定したもの。D-F: 回収した尿細胞を、死細胞を識別する赤い色素と、すべての細胞の核を染色する青い色素で染色したもの。Dは明視野、Eは死細胞のみ観察、Fは全細胞と死細胞。

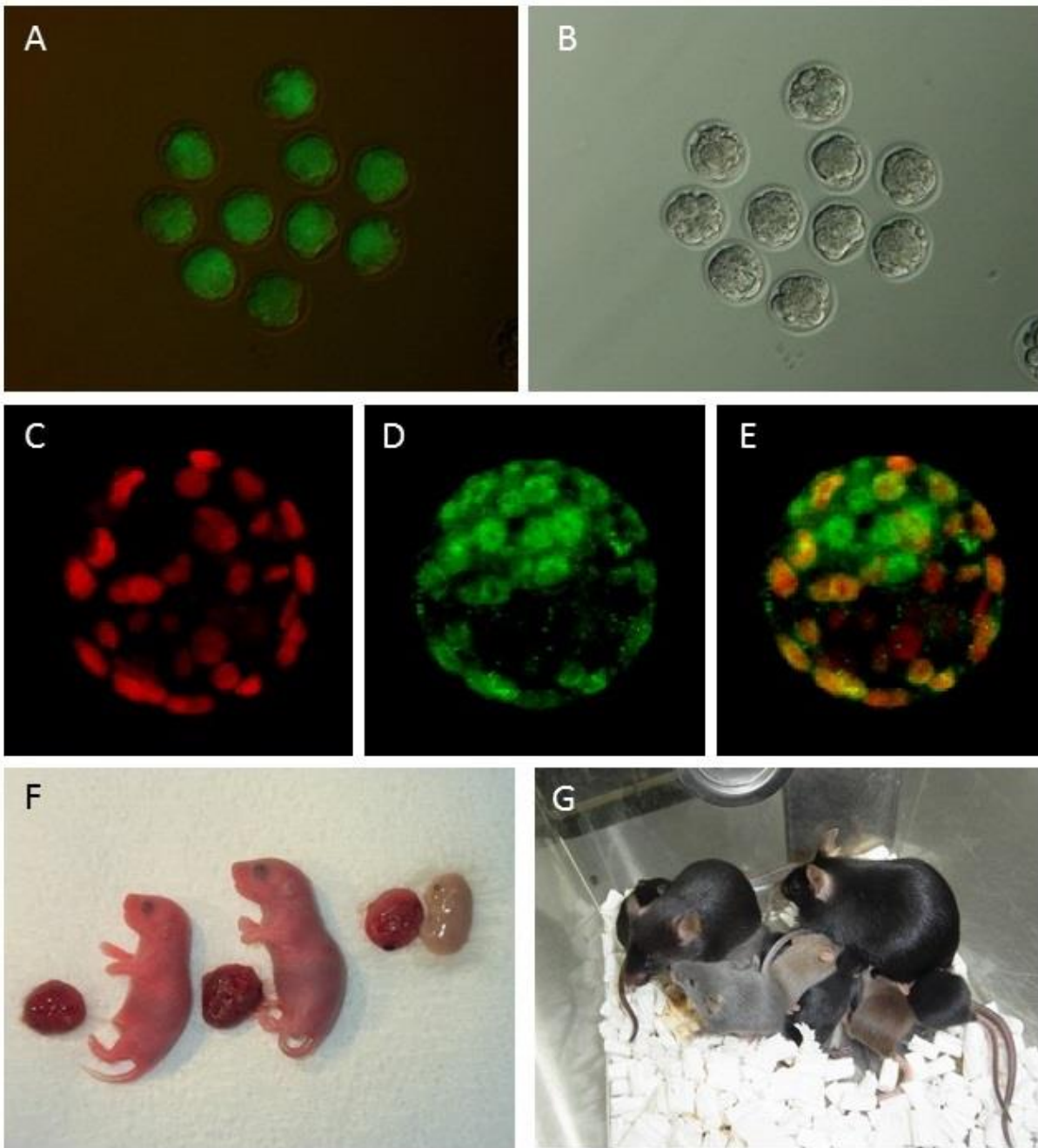


図2. 尿細胞由来のクローン胚の初期発生とクローンマウス

A, B : GFP マウスの尿細胞由来のクローン胚。半数程度が桑実期胚へ発育し、GFP 遺伝子を発現していた。C-E : 胚盤胞の免疫染色。胚を ICM と TE に染め分けることで胚の品質を測定。C は TE (胎盤側) の細胞だけを染色。D は全細胞を染色。E は C と D を合わせたもの。色が混ざっていない緑色の部分が ICM (胎児側) となる。F : B6D2F1 メスの尿由来のクローンマウス。1つの胎児は妊娠中期に死亡したと思われる。G : B6D2F1 メスのクローンマウスと B6D2F1 オスのクローンマウスを交配した結果、多数の次世代を作ることができた。これはクローンマウスの生殖能力が正常であることを証明している。