

動物クローン技術 の現状

低い成功率と高い異常率

クローン動物について

1. 核移植の方法
2. クローンの異常
3. 成功率の改善

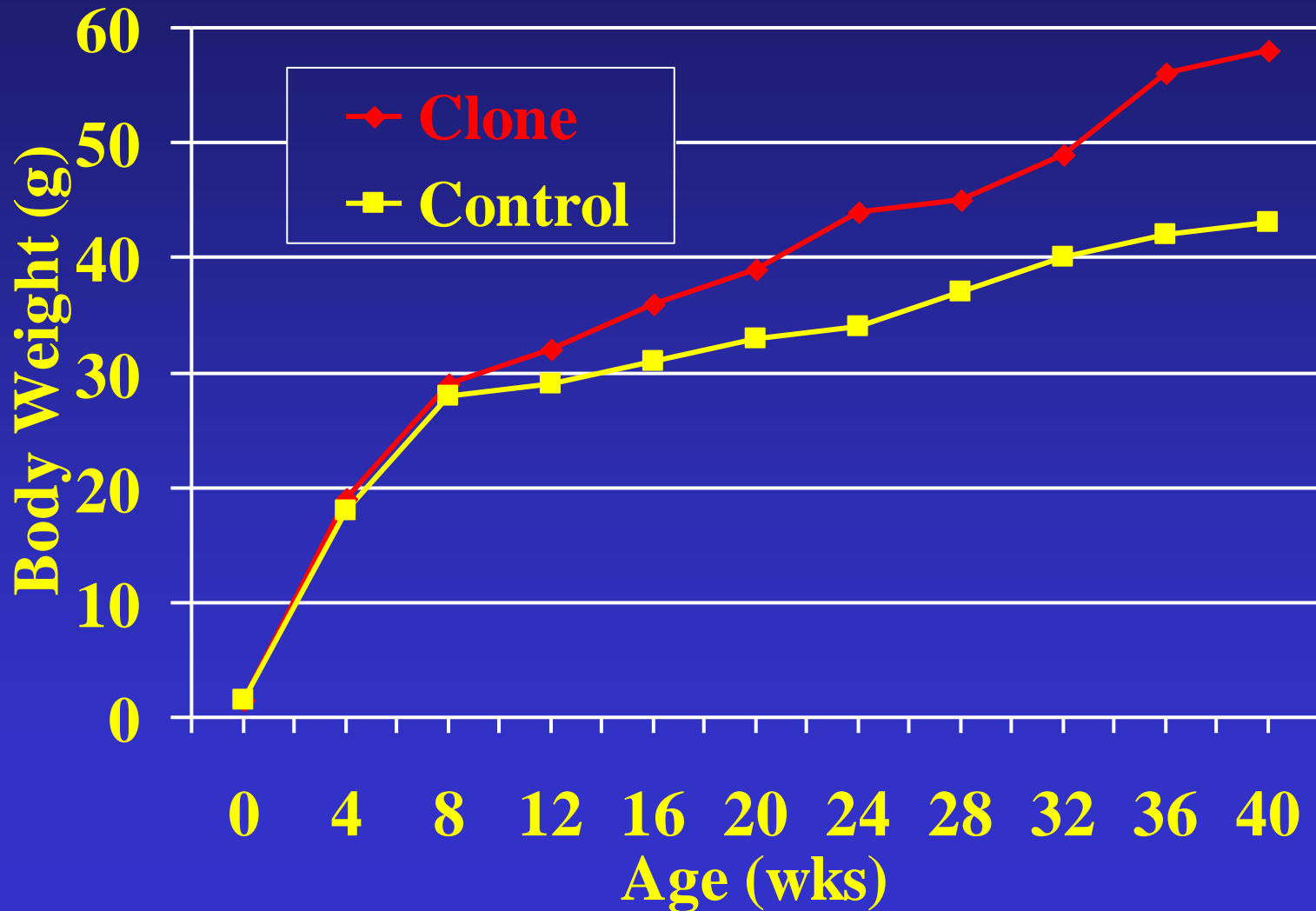
クローンES細胞について

1. ntES細胞の正常性
2. 倫理問題と解決策

クローン技術の将来

絶滅動物の復活へ向けて

Many cloned mice become obese



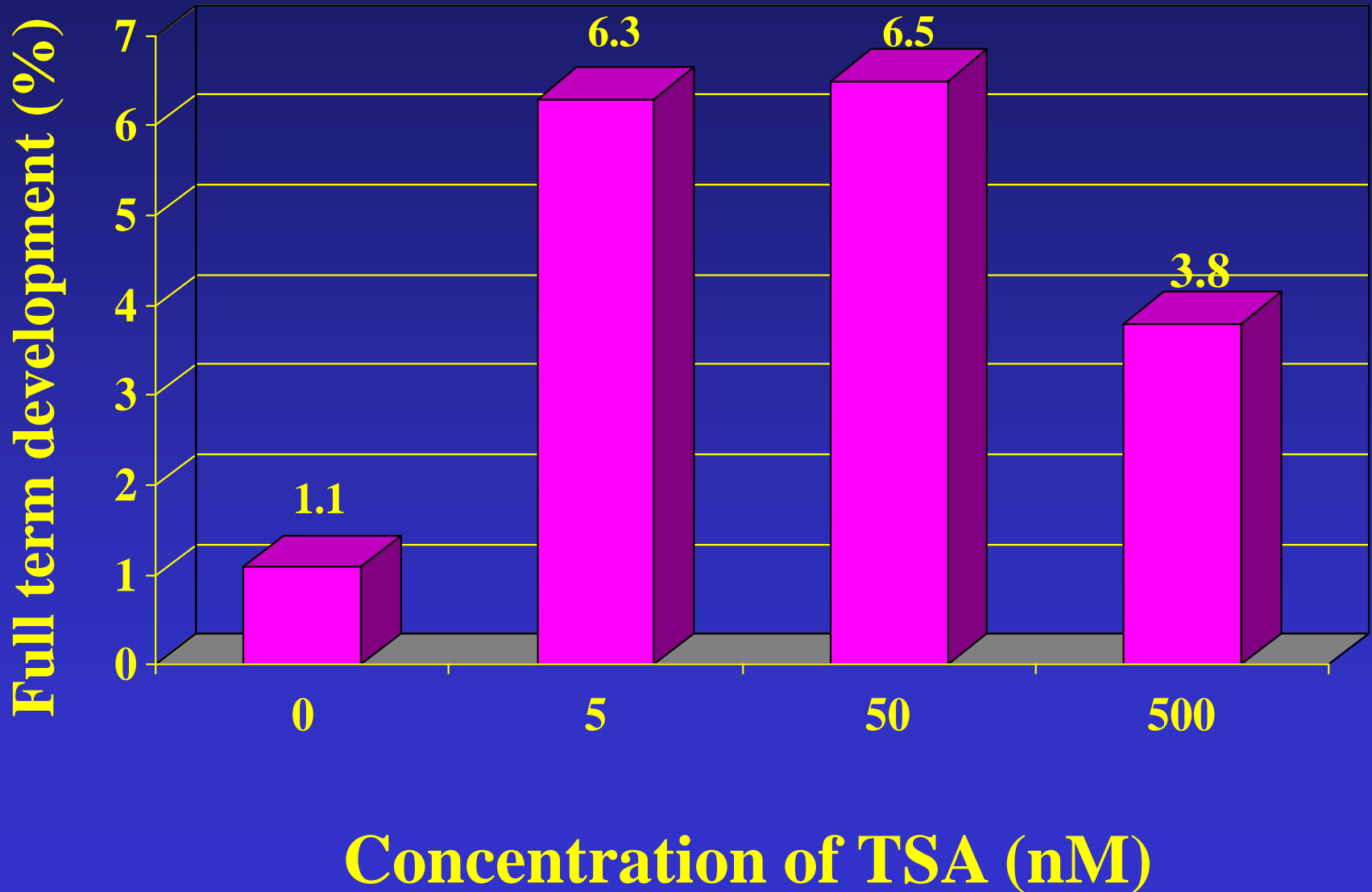
Abnormalities of cloned mice

- **Large placenta (100% of cloned mice)**
- **Genome DNA methylation (100%?)**
- **Abnormal gene expression (100%?)**
- **Early death (~ 80%)**
- **Obese (20 ~ 70%, depend on strain)**
- **Pneumonia and hepatic failure (some)**
- **Hernia of intestine (~ 5%)**

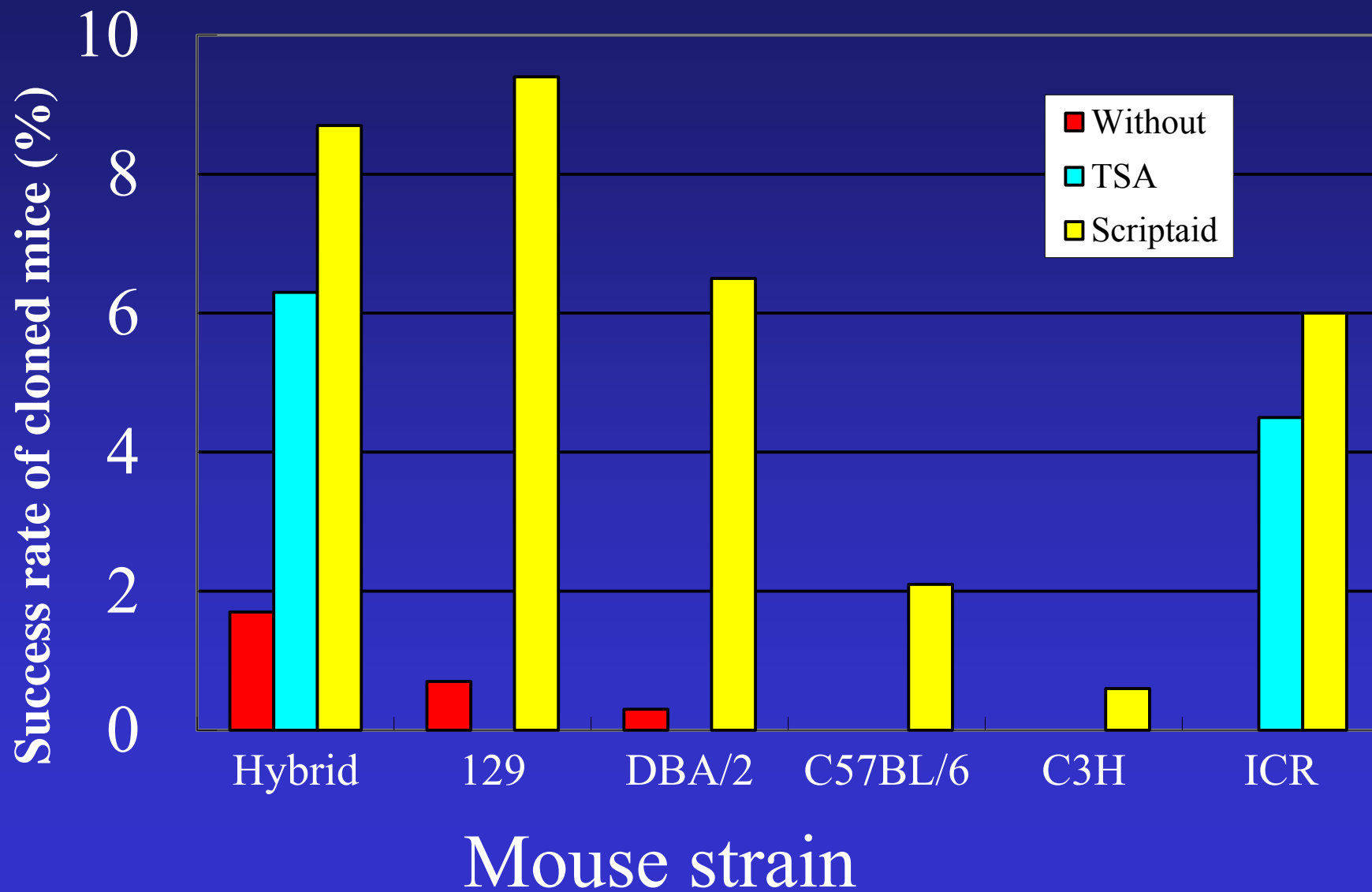
成功率を上げること＝初期化の促進

**成功率が上がれば異常率も減る
と思われる＝異常の原因究明より
成功率の改善を優先した**

Effect of TSA on cloned embryo development



Effect of HDACi treatment on inbred mouse cloning



たとえ初期化を促進できなくとも、いいクローン胚だけを選び出し、移植すれば出産率は改善できる

しかし胚盤胞まで培養しても、外見からでは良好胚を区別できない

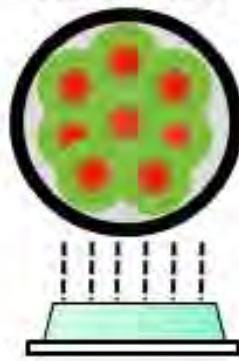
何か指標はないのか？

クローン胚を蛍光観察

クローン
1細胞期胚



クローン
桑実期胚

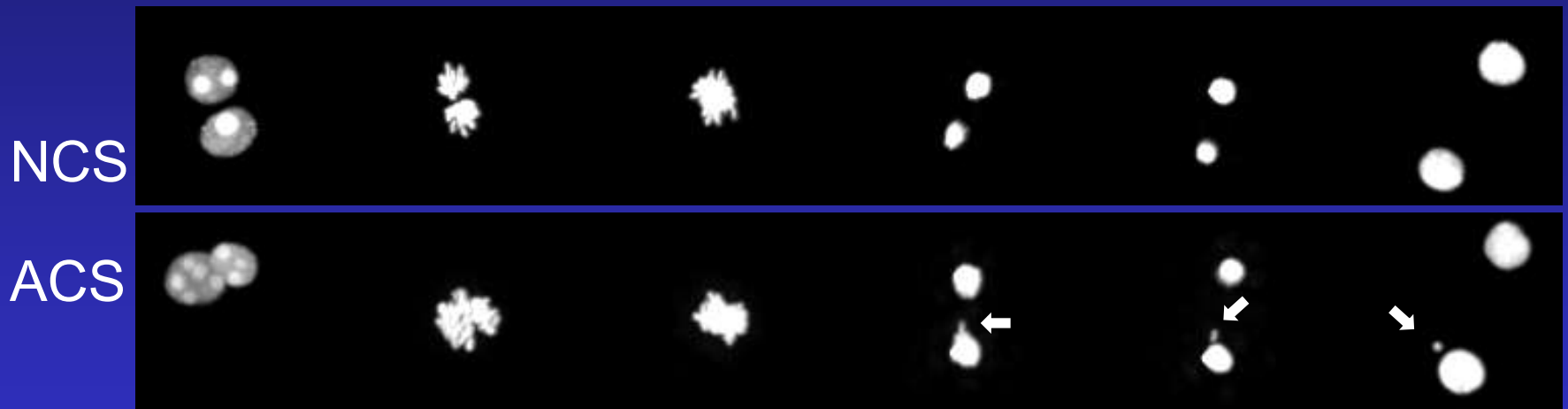


ライブセルイメージング。倒立顕微鏡内で蛍光観察しながら1細胞期から桑実期まで3日間培養

レトロスペクティブ（遡及）解析で、胚移植前に良い胚を選別

H2B-RFP-mRNA and gamma tubulin GFP- mRNA were injected into cloned embryos to observe **cell division, spindle formation, chromosome segregation**

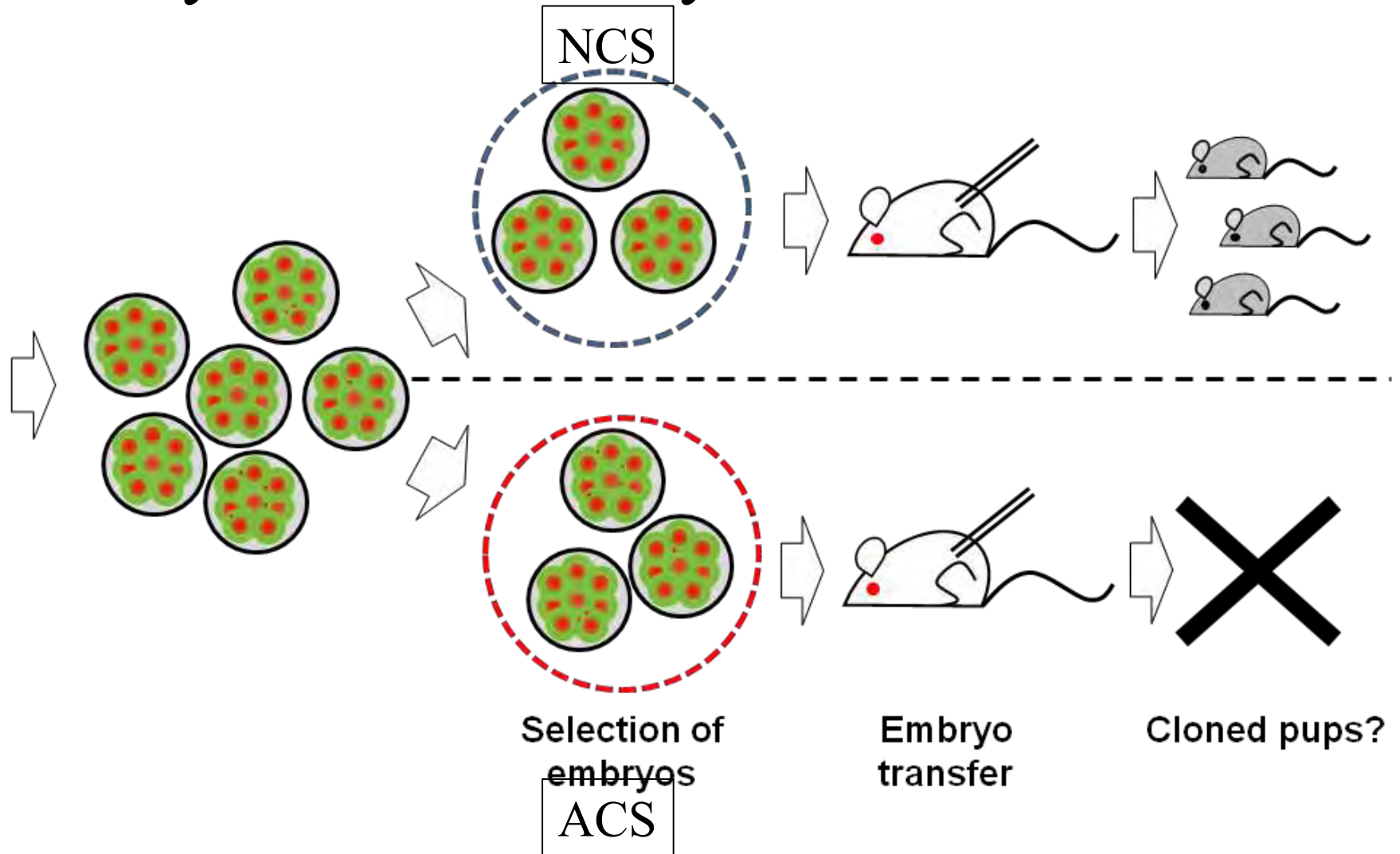
指標 2: 染色体異常



NCS: Normal Chromosome Segregation

ACS: Abnormal Chromosome Segregation

Selection of different type (cell number) of embryos before embryo transfer



ACSが起こった時期で分けた場合のクローン胚の出産成績

Type of chromosome abnormality	No. of transferred embryos	No. of live cloned offspring (%)*
1- to 2-cell ACS	86	0
2- to 4-cell ACS	64	0
4- to 8-cell ACS	112	0
8- to 16-cell ACS	40	1 (2.5)
NCS	28	2 (7.1)

初期にACSが起こった場合、クローン個体は得られない。

Conclusion

ライブセルイメージングによって良好クローン胚を選別することは可能だろう

しかし、もっと選別の指標を見つけなければならない

これは水谷さん、山縣さんの成果

蛍光観察の問題点

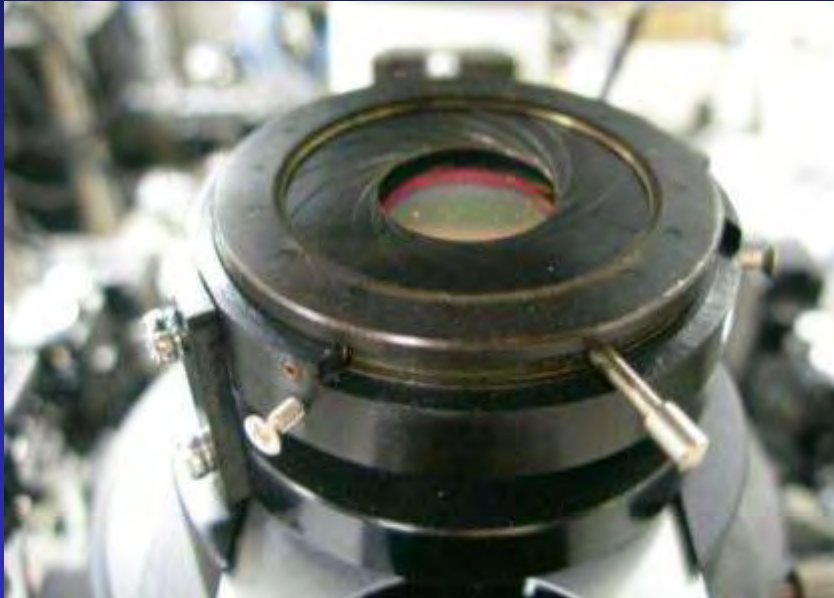
- 光毒性によって細胞や核が致命的なダメージを受ける。
- 強い光源により色素が退色してしまう。
- 染色液の毒性(たとえばヘキスト)
- 蛍光顕微鏡は高価

もし一般の顕微鏡で蛍光色素を発色させることができれば

- 弱い光源なので光毒性が少ない
- 退色が少ない
- 発色させながら顕微操作が可能(たとえば除核など)
- 余計な投資が必要ない

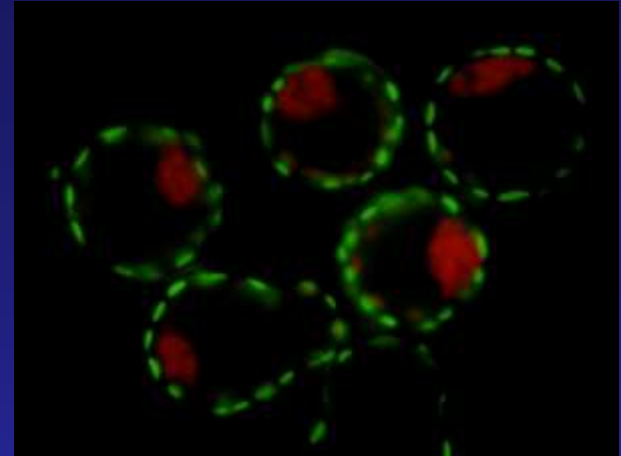
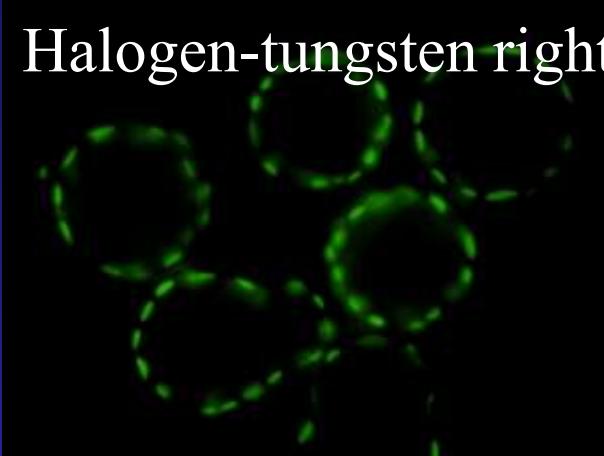
しかし、そんなことが可能なのか？

ハロゲンランプで蛍光色素を励起させる絞りつきアダプターの開発

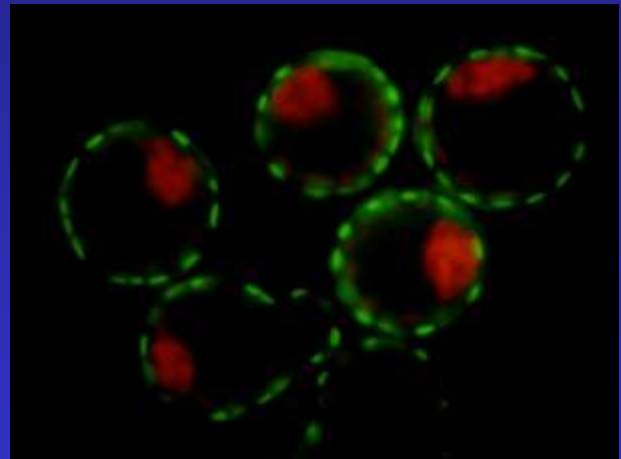
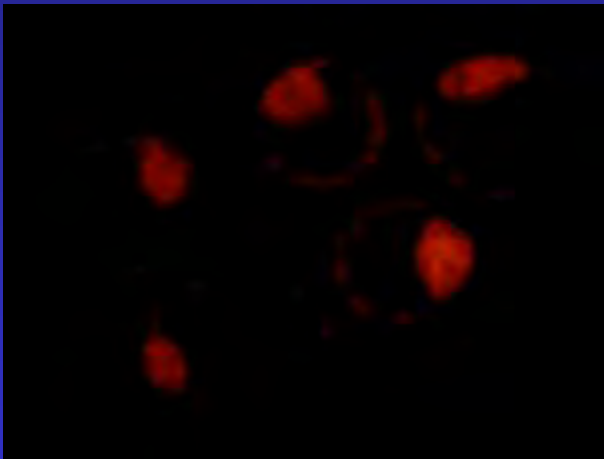
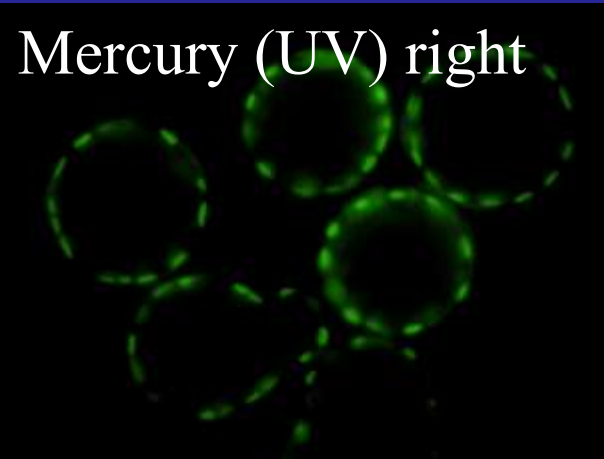


絞りが開いているとハロゲンの光が隙間から洩れこむため、蛍光と明視野の同時観察が可能となる

Halogen-tungsten right



Mercury (UV) right

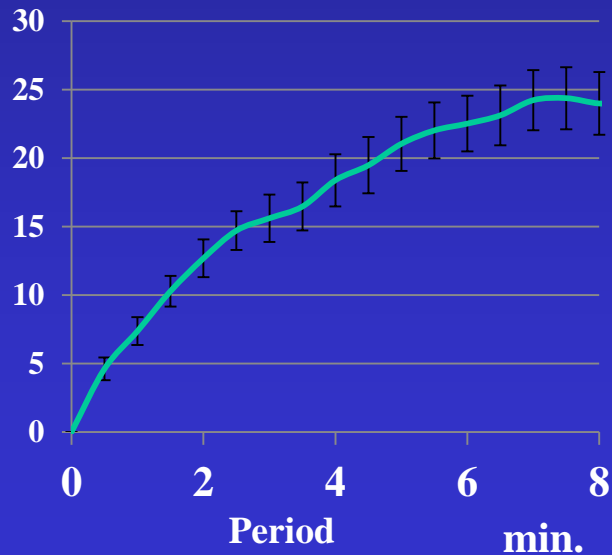
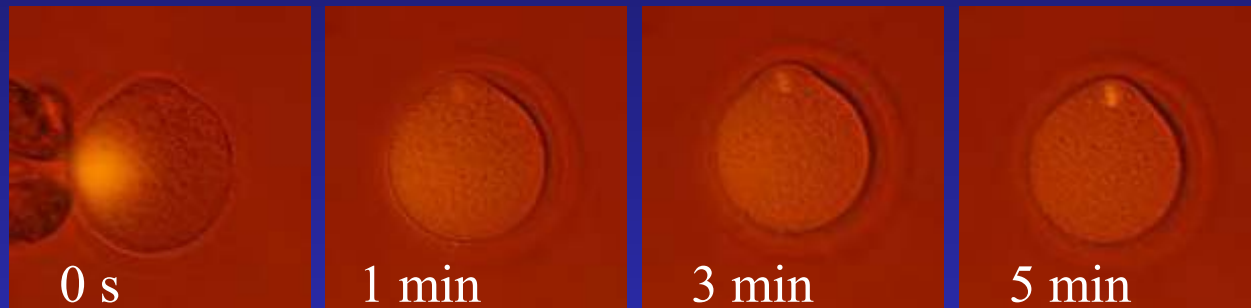


Mouse blastocyst. Cdx2 was stained with Alexa 488 and Oct3/4 was stained with Alexa 546, and observed by inverted microscope

次に卵子のMIIを観察した

H3Ser10pにフィコエリスリンという
蛍光色素を結合させ、卵子へ注
入した

When the phycoerythrin-labeled anti-H3S10ph was microinjected into MII oocytes, it dispersed immediately into the cytoplasm. However, the MII chromosomes were clearly visualized within a few minutes



ハロゲン蛍光観察法

1. UVランプに比べ細胞への光毒性が低く退色も少ない。
2. 発展途上国など蛍光顕微鏡をもっていないラボでもこの方法なら蛍光観察が可能になる。
3. 中学や高校でも蛍光観察が可能となり、科学への関心を高める。

この方法を用いれば、染色体を数本だけ、ダメージを与えないで取り出すことが可能になるのではないだろうか

クローン動物について

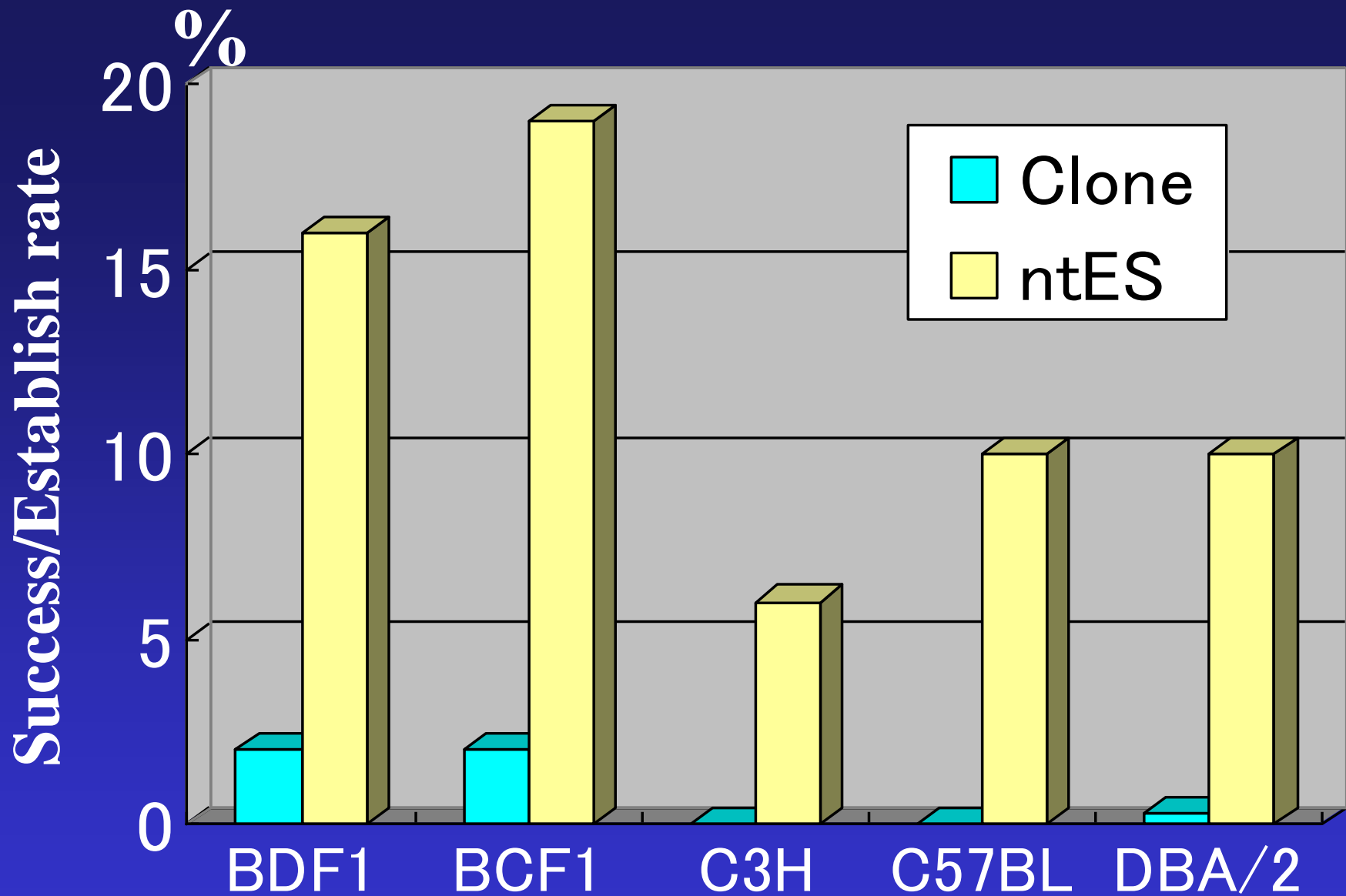
1. 核移植の方法
2. クローンの異常
3. 成功率の改善

クローンES細胞について

1. ntES細胞の正常性
2. 倫理問題と解決策

クローン技術の将来

絶滅動物の復活へ向けて



Comparison between success rate of cloned mouse and establish rate of ntES cell using cumulus cell as donor

果たしてntES細胞は、
受精卵から作られたES
細胞と同じなのか？

iPS細胞にはエピジェネティック異常が多発し、受精卵由来のES細胞とは異なる点が多い。

したがって、ntES細胞の方がiPS細胞より受精卵ES細胞に近い可能性大！

難しさと倫理問題

- 核移植は難しい(習得に半年以上)
- 卵子の提供が必要
- 生命の萌芽を破壊(これは受精卵ES細胞でも同じ)

不妊治療の現場では、体外受精に失敗した卵子が毎日たくさん廃棄されている

もしそれらの廃棄卵子が核移植に使えるのなら、卵子の提供という倫理問題は回避できる

体外受精失敗卵子からntES細胞株 の樹立

	保存時間 (温度)	卵子 数	核移植 成功数 (%)	胚盤胞 数(%)	ntES 細 胞株 (%)
Fresh control	---	109	88 (81)	49 (56)	8 (16)
AFF oocyte	6 h (37°C)	173	106 (61)	49 (46)	10 (20)
	24 h (25°C)	353	97 (27)	35 (15)	10 (29)

体外受精に失敗し、廃棄される卵子から
でもntES細胞は樹立可能だった

AFF卵子のまとめ

**体外受精に失敗した卵子(AFF
卵子)を利用すれば、倫理問題
は回避可能**

ntES細胞の応用（医療）

- 最初のntES細胞が報告されてから9年が経過。これまでにいくつかの応用例が報告されている