

ISSN 1343-9669

# Journal of REPRODUCTION ENGINEERING

December 2008

Vol. 11

J Reprod Engineer

11 (Suppl.) 450 – 464

The Society for the Study of  
REPRODUCTION ENGINEERING

S S R E

## **Special Advisory Board**

**Tomonori IMAMICHI, Takayoshi INO,  
Shuetsu SUZUKI, Shyoso OGAWA**

## **Board of the Council**

**of the Society for the Study of Reproduction Engineering  
(SSRE from April 1, 2007)**

<b>Kiyoshi AKIYAMA</b>	<b>Harumi KUBO</b>	<b>Kahei SATO</b>
<b>Masayuki GOTO</b>	<b>Jun-ichiro MATSUDA</b>	<b>Masahiro SATO</b>
<b>Kouichiro HASHIMOTO</b>	<b>Tetsuro MATSUMOTO</b>	<b>Yasuo SEKINE</b>
<b>Katuhiko HAYASHI</b>	<b>Atsuko MIZUNO</b>	<b>Shuetsu SUZUKI</b>
<b>Yohsuke HIGASHI</b>	<b>Takahide MORI</b>	<b>Norihiro TADA</b>
<b>Takayuki ISHIKAWA</b>	<b>Hiroshi NAGASHIMA</b>	<b>Norihiro TADA</b>
<b>Naomi KASHIWAZAKI</b>	<b>Naomi NAKAGATA</b>	<b>Tsutomu TAKESHIMA</b>
<b>Osamu KATO</b>	<b>Masahiko NATORI</b>	<b>Naoki TAKESHITA</b>
<b>Takuhei KIZAKI</b>	<b>Shyoso OGAWA</b>	<b>Hitoshi USHIJIMA</b>
<b>Kazuhiko KOBAYASHI</b>	<b>Satoru OHTANI</b>	<b>Hirohito YAMAKAWA</b>
<b>Tetsuya KOJIMA</b>	<b>Akiko OKADA</b>	<b>Yoshio YAMAMOTO</b>

# **Journal of Reproduction Engineering**

Published by the Society for the Study of  
Reproduction Engineering

## **Chief of Editorial Board**

**Norihiro Tada, Ph.D., Juntendo University School of Medicine, Tokyo**

## **Editorial Board**

**Shuetsu Suzuki, M.D., Ph.D., Reproductive Biology of Tokyo Symposium**

**Shyoso Ogawa, Ph.D., SSRE Officials, Nishisinjuku, Tokyo**

**Naomi Kashiwazaki, Ph.D., School of Veterinary Medicine,  
Azabu University, Kanagawa**

**Makoto Iwaya, Ph.D., National Children's Research Center, Tokyo**

**Takuhei Kizaki, MS., Meiji University, Ikuta Campus, Kanagawa**

**Osamu Kato, M.D., Ph.D., "Kato Ladies Clinic", Tokyo**

**Hitoshi Ushijima, Ph.D., Chiba Prefectural Dairy Experimental Station**

**Harumi Kubo, M.D., Ph.D., Medical School, Toho University, Tokyo**

**Cappy M. Rothman, M.D., Century City Medical Plaza, Los Angeles**

**Buharuddin Tappa, Ph.D., Center for Biotechnology, Indonesia**

**Takahide Mori, M.D., Ph.D., "Daigo Watanabe Clinic", Kyoto**

**Hiroshi Nagashima, PhD., Meiji University, Ikuta Campus, Kanagawa**

*All correspondence concerning this journal should be addressed to*

*Dr. Norihiro Tada; SSRE Office, 901 St Villa Nagatani, 4-32-11 Nishi-Shinjuku,  
Sinjuku, Tokyo*

*Tel 03-3370-5731, Fax 03-3370-5732*

## Instructions to Authors

### Scope of the journal

The Journal of Reproduction Engineering(JRE), the official journal of the Society for the Study of Reproduction Engineering(SSRE), is published as the journal specialized in original articles (Full paper, Notes or Novel technique) that report new findings or concepts in reproduction engineering of animals and humans. Topical coverage includes but not limited to : manipulation of germ cells and embryos (*in vitro* development, cryopreservation, micromanipulation), assisted reproduction in clinical and veterinary medicine, and genetic modification of animals by gene transfer.

All manuscripts are reviewed critically by two or more reviewers. Acceptance is based on scientific content and presentation of materials. The editors select reviewers, overspend with authors, and make final decisions about manuscript.

Critical reviews or mini-reviews will be published from time to time. These will normally be by invitation, but the editor will also consider submitted articles.

### Submission

Manuscript for the journal should be sent to:

**Editor, Norihiro Tada, Atopy Research Center, Graduate School of Medicine, Juntendo University, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo Zip 113-8421(e-mail: [ntada@med.juntendo.ac.jp](mailto:ntada@med.juntendo.ac.jp))**

**Detailed instructions to contributors is available from the editorial office of SSRE. 901 St Villa Nagatani Bldg., 3-32-11 Nishisinjuku, Shinjuku, Tokyo, Zip 160—0023**

**Tel (03)3370-5731, Fax (03)3370-5732,  
e-mail [ssre.ogawa@nifty.ne.jp](mailto:ssre.ogawa@nifty.ne.jp) .**

### *Style and format*

The first page should contain (1) the full title of the paper; (2) a short of not more than 40 characters for page headings; (3) the initials and last names of all authors; (4) the department(s) and the institution(s) where the work was carried out; (5) the name and address of the author responsible for correspondence about the manuscript and proofs.

All papers should be provided with abstract and keywords. Keywords should be provided up to 6 words or short phrases in order of significance. Where appropriate, the remainder of the paper should be arranged under the INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS and REFERENCES.

#### **INTRODUCTION**

The introduction should summarize briefly the background of the method and state clearly the nature, significance and novelty of the reported technique. Results should not be reported or summarized in the introduction.

#### **MATERIALS AND METHODS**

This section is especially important in a techniques-oriented publication. It should contain detailed experimental protocols for new procedures, but previously published methods should be cited rather than described. The sources of special materials, reagents, cell lines, expression vectors, software and the like should be specified. Vendors or manufactures of materials should be specified with their addresses (city, state or province, and country) in parentheses. Information about the identity, specificity, purity and reliability of materials and methods should be provided in this section.

#### **RESULTS**

This section should include experiments and data that validate new methods and support conclusions drawn in the following DISCUSSION section. Results may be presented in tables and figures. Interpretations, speculation and other discussion should not be included in the RESULTS section, although in some cases a combined RESULTS and DISCUSSION section may facilitate a more concise and focused presentation.

#### **DISCUSSION**

Arguments, discussion and conclusions are appropriate in this section. This is not the place to describe the background for the work, which should be included, with appropriate citations, in the introduction.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

Acknowledgements to individuals and to funding sources are appropriate in this section.

#### **REFERENCES**

Literature citations should be typed double-spaced and should list all authors, with complete article titles, date of publication, standard abbreviated journal titles, volume and inclusive page number. They are to be enumerated in alphabetical order, by first author, and referenced by number in the text. Papers that have been accepted but not yet published can be designated as "in press". Non-archival poster or oral

presentations, and papers that have not yet been accepted, may not be cited.

Reference formats should conform to the following examples:

(Periodical)

1. Ogawa S, Tada N, Hayashi K, Iwaya M, Sato M, Saito H, Ohta A, Takahashi M, Kurihara T. Possibility of testis mediated gene transfer as an alternative method for highly efficient production of transgenic animals. *J. Reprod. Engineer.* 1, 1-11, 1998.

(Book)

1. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryos-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2003.

(Chapter in Book)

1. Strelchenko N. Bovine Pluripotent Stem Cells for Transgenic Vector. pp.173-178. In Houdebine LM (Ed.), *Transgenic Animals-Generation and Use*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 1997.

#### **TABLES**

Tables should be typed double-spaced on separate pages and numbered consecutively. Unusually complex tables, or tables with special symbols and/or chemical formulas, should be prepared camera-ready for digital scanning.

#### **FIGURES**

Figures should be specified in numerical order within the text, and with minimal redundancy between the text and figure legends. The legends must be typed double-spaced on separate pages from the figures. Figure legends should be as complete and concise as possible, using abbreviated style and avoiding redundancy with the details reported under MATERIALS AND METHODS. The first sentence of a figure legend should function as a stand-alone title to the figure. If figures have been published previously, written permission for reproduction must be obtained from the author and publisher, and full credit must be given in the figure legend. Only standard symbols should be used and these should be defined in the figure legend or a key incorporated within the figure. Arabic figure numbers should be included in the legend, rather than on the figure, whereas uppercase letters indicating multiple parts of figures should be incorporated into the figures.

Each figure should be on a separate page. Multiple-part figures are acceptable only if the parts are closely related. Figures and other illustrations will not be returned to the authors.

Original figures will be used by the editor and in the production process. These should be of production-quality, suitable for high-resolution digital scanning. A clearly written label, with the first author's name, the figure number and its orientation, should be

**affixed on the reverse side of each figure. Color should be used only when absolutely necessary. Authors are asked to pay minimal charges for publication of color figures at the time that a paper is accepted.**

## Contents

### 第10回 生殖工学研究会 (SSRE) 記念シンポジウム講演要旨

岡部 勝 ;

遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム 450 - 451

伊藤 潤哉・柏崎 直巳 ;

ほ乳類の受精時における  $Ca^{2+}$  オシレーション制御機構 452 - 454

小倉 淳郎 ;

雄性生殖細胞の発生と受精能 455 - 456

河野 友宏 ;

父母ゲノムの次世代に対する役割 457 - 458

兼子 智 ;

ヒト生殖補助医療 (ART) になぜ品質管理、製造管理が必要なのか  
459 - 460

### 第2回ワークショップ要旨

石川 孝之 ;

iPS 細胞の誕生とその可能性 461 - 464



2008 年  
第 10 回 SSRE 記念シンポジウム  
講演要旨集

*Proceedings of the 10<sup>th</sup> (2008) Commemorative  
Annual Symposium of  
the Society for Study of Reproduction Engineering*

ほ乳類における個体発生開始の制御について

2008 年 3 月 8 日(土曜日)  
明治大学駿河台校舎リバティータワー(12 階)1123 教室  
東京都千代田区神田駿河台 1-1

SSRE 生殖工学研究会

## 第 10 回記念シンポジウム講演要旨集目次

- 12:30 開会の挨拶 .....会長
- 座長 鈴木秋悦 (生殖バイオロジー東京シンポジウム代表)  
石川孝之 ((財)日本生物科学研究所)
- 12:35-13:20 遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム  
大阪大学微生物病研究所・附属遺伝情報実験センター 岡部 勝
- 13:20-14:05 ほ乳類における卵母細胞カルシウムオシレーション  
麻布大学獣医学部 動物応用科学科動物繁殖学研究室 伊藤 潤哉・柏崎直巳
- 14:05-14:50 雄性生殖細胞の発生と受精能  
理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室 小倉淳郎
- 座長 柏崎直巳 (麻布大学獣医学部動物応用科学科)  
竹下直樹 (東邦大学医学部産科婦人科学講座)
- 15:10-15:55 父母ゲノムの次世代に対する役割  
東京農業大学応用生物科学部 バイオサイエンス学科  
動物発生工学研究室 河野友宏
- 15:55-16:40 ヒト生殖補助医療になぜ品質管理、製造管理が必要なのか  
東京歯科大学 市川総合病院リプロダクションセンター(婦人科) 兼子 智
- 16:45-17:15 総合討論 総合座長 尾川昭三(SSRE 初代会長)
- 17:20 閉会の挨拶.....後藤正幸(明治大学農学部)

## 遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム

○岡部 勝(大阪大学微生物病研究所・附属遺伝情報実験センター)

受精卵に外から遺伝子を注入すると染色体に取り込まれてしまうことがある。Niwaらが作製していたウイルスのエンハンサー、ニワトリのベータアクチンのプロモーター、牛のイントロン配列を利用しながらクラゲ由来の GFP の配列を結合し、ウサギの polyA 付加シグナルを組み合わせたものを作製し、マウスに導入すると全身の組織から蛍光を発する“グリーンマウス”が作製できる。

われわれはその中から X 染色体にトランスジーンが入ったものを利用して、これまで非常に困難であった着床前の胚の雌雄の分別を簡単に行えるような系を作製した。この系を用いて雌雄キメラを作製すると精巣内に「卵子」ができることを見出すことができた<sup>1)</sup>。このほか、受精のメカニズムを知るために精子の先体内に GFP を発現する“green sperm”をもつトランスジェニックマウスを作製した。この精子は先体反応により GFP が遊離するのでマウス精子の先体反応を可視化することに成功した。このマウスを用いることにより先体の様子を非侵襲的にしかも連続的に観察することが可能になった。

また ES 細胞に遺伝子を導入してそこから望みどおりの遺伝子と組換えをおこしたものを選択すると、特定の遺伝子をデザインどおりに変化させた ES 細胞を得ることが可能である。さらにその ES 細胞をもとに、遺伝子が組換えられた遺伝子操作動物(ノックアウトマウスやノックインマウス)を作りだすことができる。受精に関与する分子群が遺伝子ノックアウトマウスの作製によって証明されている。最初の報告はカルメジンのノックアウトマウスで、このマウスは精子の形態や運動性には問題がないにもかかわらず、射出された精子が子宮に存在するが、輸卵管内に移行できないことと、精子が卵の透明帯に結合できないという2重の表現型が見られる<sup>2)</sup>。その後同様の表現型を示す因子として ADAM 遺伝子やアンジオテンシン変換酵素(ACE)が知られるようになったが、現在、これら因子の相互関係がかなり明確になってきた<sup>3)</sup>。

われわれは融合のステップを特異的に阻害する抗精子モノクローナル抗体を約 20 年前に見出していた。最近になってやっと抗原の Izumo を同定することができた。Izumo をノックアウトすると、雌は正常であるが雄マウスは交配しても妊孕性を示さず、Izumo ノックアウト精子を用いて体外受精を行うと、精子は正常に先体反応を引き起こし、透明帯を無事通過するが全く受精卵を得ることはできない。この精子は卵子との融合能力を完全に欠失していることがわかった。またヒトの場合も Izumo が、卵子との結合または融合に機能するタンパク質でないかということが、特異的抗体を用いた受精阻害実験から示唆された<sup>4)</sup>。

さまざまな遺伝子組換え動物を通じてみる受精のメカニズムについて考察する。

#### 参考論文

1. Isotani et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 102, 4039-44 (2005)
2. Ikawa et al., Nature, 387, 607-11 (1997)
3. Yamaguchi et al., Biol Reprod, 75, 760-6 (2006)
4. Inoue et al., Nature, 434, 234-8. (2005)

## ほ乳類の受精時における $\text{Ca}^{2+}$ オシレーション制御機構

○伊藤 潤哉・柏崎 直巳（麻布大学 獣医学部）

多くのほ乳動物卵は、LH サージによって第一減数分裂前期(GV 期)から減数分裂を再開し、第二減数分裂中期(Metaphase-II 期)まで進行して再び減数分裂を停止する。この状態で卵は排卵され、その後受精が起こることにより減数分裂を再開、完了する。この受精に関するメカニズムとして、現在以下のような機構が考えられている(図および参考文献 1, 2 参照)。①透明帯を通過した精子および卵細胞膜が融合する(岡部先生の項参照)、②精子内にある卵活性化因子(Sperm Factor, SF)が卵細胞質内に放出される。③SFによりホスファチジルイノシトール(4,5)2リン酸( $\text{PIP}_2$ )の加水分解が起こり、ジアシルグリセロール(DG)およびイノシトール 3リン酸( $\text{IP}_3$ )が生産される。④ $\text{IP}_3$ は小胞体上に存在する $\text{IP}_3$ 受容体( $\text{IP}_3\text{R}$ )に結合し、小胞体から $\text{Ca}^{2+}$ が放出されることにより、卵細胞質内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇する。⑤卵細胞質内に増加した $\text{Ca}^{2+}$ により、他の $\text{IP}_3\text{R}$ が刺激され、 $\text{Ca}^{2+}$ の反復上昇( $\text{Ca}^{2+}$ オシレーション)が誘起される。⑥誘起された $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションにより、卵はMII期から減数分裂を再開し(卵の活性化)、胚発生へと移行する。

近年の研究から、 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションは卵の活性化だけでなく、胚性遺伝子の発現や産子の成長にも重要な役割を起すことが明らかになりつつある(文献 3)が、 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションを制御する機構自体は明らかにされていなかった。

$\text{Ca}^{2+}$ オシレーションの誘起に関わる因子の一つとして、精子内に存在するSFに関しては、2002年にSaundersらによって精巣特異的に発現するphospholipase C $\zeta$ (PLC $\zeta$ )がマウスにおいて初めてクローニングされ、PLC $\zeta$ の

cRNA をマイクロインジェクションすると，受精時と同様な  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが誘起されることが報告された(文献 4)．現在までにラット，ウシ，ブタ，ヒト，ニワトリ等でも  $\text{PLC}\zeta$  が存在し高い相同性をもつこと，また  $\text{PLC}\zeta$  により  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが誘起されることも報告されている(文献 5)．

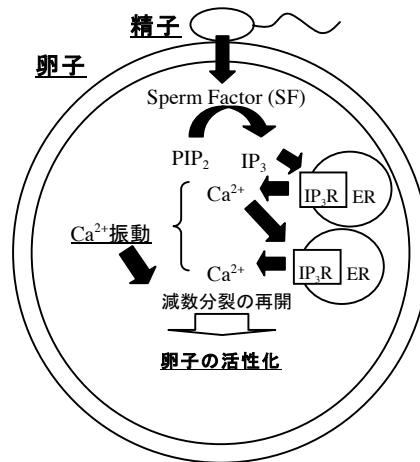


図 卵活性化機構

一方，卵内において  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションに関与する因子の一つである  $\text{IP}_3\text{R}$  に関しては，GV 期の卵において既に発現していること(文献 6)，しかし顕微受精技術を用い GV 期に精子を注入しても  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは誘起されないことから(文献 7)，卵は減数分裂中に何らかの機構(因子)により  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション誘起能を獲得すると考えられる．

近年我々のグループは，卵内に存在する  $\text{IP}_3\text{R}$  タイプ 1( $\text{IP}_3\text{R}1$ )が，減数分裂の進行に伴いリン酸化されること，また減数分裂の再開，MII 期での停止に必要な因子の一つである Mitogen-Activated Protein kinase (MAPK)が  $\text{IP}_3\text{R}1$  を直接リン酸化することを初めて明らかにした(文献 8)．本講演では，MAPK が  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの制御に果たす役割について解説するとともに， $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの制御に関与する他の因子について最新の知見を報告する予定である．

## 参考文献

1. Miyazaki, S. and Ito, M. (2006). Calcium signals for egg activation in mammals. *J. Pharmacol Sci.* **100**, 545-552.
2. Miyazaki, S. (2006). Thirty years of calcium signals at fertilization. *Semin Cell Dev Biol.* **17**, 233-243.
3. Ozil, J. P., Banrezes, B., Toth, S., Pan, H. and Schultz, R. M. (2006). Ca<sup>2+</sup> oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev. Biol.* **300**, 534-544.
4. Saunders, C. M., Laman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K. and Lai, F. A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific triggers of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development.* **129**, 3533-3544.
5. Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T. and Lai, F. A. (2006). PLC $\zeta$ (zeta): a sperm protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 264-273.
6. Mehlmann, M. L., Mikoshiba, K. and Kline, D. (1996). Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-triphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* **180**, 489-498.
7. Jones, K. T., Carroll, J. and Whittingham, D. G. (1995). Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca<sup>2+</sup> release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 6671-6677.
8. Lee, B., Vermassen, E., Yoon S. Y., Vanderheyden, V., Ito, J., Alfandari, D., De Smedt, H., Parys, J. B. and Fissore, R. A. (2006) Phosphorylation of IP<sub>3</sub>R1 and the regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development.* **133**, 4355-4365.

## 雄性生殖細胞の発生と受精能

○小倉淳郎（理研バイオリソースセンター）

哺乳動物の生殖細胞は、胎仔期に始原生殖細胞（PGC）として出現し、生殖巣に到達した後に雌雄それぞれの生殖細胞としての分化を開始する。通常、体細胞系列は最終分化後は細胞死に至るのみであるが、生殖細胞系列はその最終分化後に配偶子として新たな生命を誕生させるという非常に重要な役割を持つ。この役割のために生殖細胞のゲノムはその発生過程から特殊な変化を遂げていく。主な **genetic** な変化としては減数分裂があり、**epigenetic** な変化としてはゲノム刷込みや初期化（あるいはその準備）がある。近年はこれらのゲノム変化の生化学的・分子生物学的特性を明らかにするために、生殖細胞そのものを極めて高感度かつ再現性良く解析する技術が開発されている。しかし、実際にこれらのゲノム機能を明らかにするためには、生殖細胞を用いて胚を構築し、それを解析しなければならない。それらを可能にする技術が、顕微授精および核移植クローン技術である。

我々は長年にわたって雄性生殖細胞ゲノムの解析のためにこれらの技術を用いてきた。マウスにおいては、顕微授精技術により一次精母細胞、精子細胞、精子を用いて正常産子を得ることができる。すなわち、一次精母細胞ゲノムは、すでに精子とほぼ同等の能力（受精能）を持つと考えられる。また、核移植クローン技術により胎齢 10.5 日 PGC から正常産子が生まれるが、11.5 日以降は生まれない。これはゲノム刷込みの状態が 10.5 日 PGC は体細胞と同等であり、その後刷込み記憶が消去されることを示す。また、出生前後の **gonocyte** を用いた核移植クローンにより、父方ゲノム刷込みが確立している過程も観察できる。



そして生殖細胞は、ゲノム刷込み以外にも、受精と同時に全能性獲得という大きな epigenetic な変化を遂行する。全能性獲得のための初期化因子は、卵子細胞質内にあることは明らかであり、カエルの卵子などを用いて精力的に研究がすすめられている。しかしながら、初期化される側のゲノムについての研究は少ない。すなわち、生殖細胞ゲノムは正常に初期化されるのに、体細胞ゲノムはなぜ異常な初期化をされてしまうのか、という疑問が放置されている。このための研究にも核移植クローン技術は大きく役立つと考えられる。

本講演では、雄性生殖細胞を精子から順に遡り、その胚構築能（受精能）を解説し、そこから得られる生物学的な意義について述べてみたい。

#### 参考総説

Ogura A, Ogonuki N, Miki H, and Inoue K: Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. **Int Rev Cytol**, 246: 189-229, 2005.

## 父母ゲノムの次世代に対する役割

○河野友宏(東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科)

生殖系列で行われるゲノムのエピジェネティクス修飾は、生殖細胞ゲノムの本質的な機能を調節する必要不可欠な機構です。哺乳類ではエピジェネティクス修飾により調節されるゲノムインプリンティング(遺伝子刷り込み)は、対立遺伝子が母親と父親のどちらから由来したかにより著しい発現差を示します。その破綻は、胚発生停止、さらに新生児の発育障害さらにはガンを始めとする重篤な疾患などを惹起します。また、ゲノムインプリンティング(GI)に起因する父母ゲノム機能の差異は、両ゲノムが個体発生に寄与することを責務とし、一方単為発生を完全に放棄させています。

GIの分子生物学的制御機構の主要因は、配偶子の形成課程で遺伝子の発現制御領域に対して行われる DNA メチル化修飾によると考えられます。父母生殖系列では、独立的にその性に従った DNA メチル化修飾が行われ、メチル化インプリントが成立します。このことは、未発育の生殖系列細胞ゲノムではGIの情報が刷り込まれていないことを意味し、事実、誕生直後の新生仔マウス卵母細胞では母性メチル化情報の刷り込みが行われていません。さらに、雌生殖系列のメチル化インプリントにより発現制御されるインプリント遺伝子の数は、雄生殖系列のメチル化インプリントにより発現制御されるインプリント遺伝子の数に比べ、圧倒的に多いことも知られています。

我々は核移植技術を駆使して新生仔卵母細胞に由来する半数体ゲノムと正常卵子の半数体ゲノムを持つ2倍体胚の作出方法を開発し、メチル化インプリントが個体発生に及ぼす影響を実際に評価するシステムを構築しました。この胚では、新生仔卵母細胞アレルで母性メチル化インプリントにより制御される遺伝子の発現パターンが父性が誘導されるために、臓器形成が認められる妊娠中期にまで発生延長します。さらに、

父性メチル化インプリントにより発現調節を受ける2領域、すなわち7番および12番染色体の父性メチル化インプリント領域のインプリント遺伝子群の発現を、遺伝子欠損マウスを利用して改変して新生仔卵母細胞から発現させ、ほぼ完全な個体発生を誘導することに成功しました。ここでは、雌雄両ゲノムの個体発生における協調的作用に焦点をあて、二母性マウス誕生の背景を紹介します。

## ヒト生殖補助医療 (ART) になぜ品質管理、製造管理が必要なのか

○兼子 智(東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター・婦人科)

### 1. 再生医療としての ART、医薬資源としての配偶子、胚

胚性および体性幹細胞による再生医療を健全な形で発展させていくために厚生科学審議会科学技術部会“ヒト幹細胞を用いた臨床研究の在り方に関する専門委員会”が発足し、“ヒト幹細胞を利用した臨床研究に対する指針”作成が進められている。特に注目すべきは細胞、組織を *intelligent drug* として位置付け、従来の医薬品の開発、製造、販売と同等の安全性を求めている点である。細胞治療の普及に伴い米国の FDA (連邦食品医薬品局) から *Good Tissue Practice (GTP)* ガイドラインが施行された。GTP とはヒト細胞、組織に由来する医薬品の製造工程において感染性物質の混入、細胞の取り違い防止、細胞の変異防止など、製造工程管理と品質管理の基準を示すことで、安全性および細胞機能を保証しようとするものである。そのため、細胞、組織の操作、培養等を行う施設を *cell processing center (CPC)* と定義し、細胞処理に用いる器具や物質等の *Good Manufacturing Practice (GMP)* 準拠、標準業務手順書 (*standard operating procedures, SOP*) の作成と記録の保存、厳格な品質管理体制の確立などの諸整備を求めている。

ヒト ART は配偶子、胚移植により挙児を図る再生医療の一分野であるが、他と最も異なる点は、1. 他の再生医療は緊急避難的要素が強いのにに対し、治療動機が“挙児”希望である、2. 治療対象が2名以上で構成される、3. 患者(夫婦)が治療法を選択する時点で治療の結果生まれてくる児は存在せず、両親の治療に対する許諾は代理許諾となる、4. 人権保護の観点から治療経過の安全性(患者保護)とともに治療結果の安全性(児への配慮)が求められる、ことである。

ART は、狭義には IUI、IVF、ICSI 等の人工的な授精を指す場合が多い。これらはいずれも体外に取り出した配偶子に操作を加える。IUI では射精精液を分画して精子調製を行い、子宮腔内に移植する。IVF は分画した精子と卵を体外で受精させる。受精は卵への遺伝子(染色体)導入であり、染色体構成が変化した胚はすでに recipient にとって異物である。ICSI では、把持した精子の安全性をどのように品質保証するかが問題となる。GTP はヒトへの移植を目的とする細胞、組織を医薬資源とし、これらの体外操作は製造(製薬)行為であり、その過程が GMP に準拠することを求めている。

## 2. 精子から始めるヒト ART の品質管理、製造管理

ヒト精子、卵は機能的に不均一な集団であり、それらの品質が受精、発生ひいては児の長期予後に至るまで大きく影響することは言を待たない。ヒト ART 臨床において採卵数は 10 個程度であり、これらを侵襲的に検査、評価することは困難である。他の再生医療では移植予定の組織について詳細な機能評価が求められるが、培養胚は生命であり、顕微鏡観察程度の評価しかできない現状である。

過排卵誘発等により妻から卵が得られると、夫精液所見がどのような状況でも受精卵(胚)を得ることが要求される。夫精液所見は個々の症例間で最も変動する因子の一つである。これまで単純に運動精子＝良好精子と考えてきたが、精子運動能は他の精子機能の正常性を保証するものではないことが明らかになった。ART 臨床において、卵および胚の侵襲的観察、機能評価が困難な現状では、1. 多面的な精子機能評価法を確立する、2. それらに基づく精子調製(望ましい精子の選別: positive selection と望ましくない精子、異物の除去: negative selection)を徹底する、3. 調製した精子の一部を用いて機能検査を施行(抜き取り検査)する、ことが ART における品質管理、品質保証の基礎となる。将来的には培養の GTP 準拠(製造管理)も課題となる。

## iPS 細胞の誕生とその可能性

石川孝之(財)日本生物科学研究所

### 研究の背景

生命の起源である受精卵は、ヒトの体を構成する全ての細胞（胎盤組織を含む）を自発的に作り得る能力（分化全能性；totipotency）を有している。また、胚盤胞期胚の内部細胞塊からは、胎盤組織以外のほぼ全ての細胞へ分化できる分化万能性(pluripotency)を持った胚性幹細胞（ES）細胞が樹立され創薬、再生医療分野から大きな期待が寄せられている。ES 細胞は、培養条件によって未分化状態で増殖させたり、様々な体細胞への分化を制御することが可能である。両者のゲノムの遺伝子配列情報（ただしテロメア領域を除く）は、全く同一であるが、発現している遺伝子群（OCT-3/4、SOX2 などは、ES 細胞特異的転写因子）とその発現を制御するクロマチン修飾や DNA メチル化などエピジェネシスは、大きく異なっている。一方で、核移植による体細胞クローン動物の成功は、体細胞核内のエピジェネシスをリプログラムする因子が受精卵やES細胞の細胞質に存在することを示唆している。Yamanaka らの研究グループは、ES 細胞と分化した体細胞の遺伝子発現パターンの違いを解析してリプログラミング因子を同定し、さらに遺伝子操作による遺伝子発現パターンの変換によって体細胞を脱分化するという方法でマウスおよびヒトの induced pluripotent stem cells（人工万能性細胞）を樹立することに成功した。

## マウス iPS 細胞の樹立

Takahashi<sup>1)</sup>らは、マウス胎児線維芽細胞 (MFF) の遺伝子発現パターンを変換するためにマウス ES 細胞の未分化状態維持に重要な 24 遺伝子を標的としてレトロウイルスベクターを利用した遺伝子導入法を確立した。次に、ES 細胞特異的遺伝子 Fbx15 の発現を指標に ES 様細胞の単離を試みた。すなわち、Fbx15 遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子を導入したノックインマウスから採取した MFF に対して、24 遺伝子の導入を行い、G418 添加培地による選択培養で Fbx15 遺伝子プロモーターが機能している ES 様細胞のみを選抜したのである。彼らは、この方法で遺伝子発現パターンや細胞特性が ES 細胞に近似した ES 様細胞株 (iPS 細胞 ; 人工万能性細胞) の樹立に成功した。さらに、導入する遺伝子を絞り込む検討を進めた結果、最終的に iPS 細胞を樹立するために必要な 4 つの遺伝子 Oct-4、Sox2、Klf4 および c-Myc ( Yamanaka factors)を同定した。また、iPS 細胞の pluripotency は、胚様体、ヌードマウス皮下におけるテラトーマ形成およびキメラマウスの作出実験により証明された。

## マウス iPS 細胞 (第 2 世代) の作製

Fbx15 遺伝子の発現を指標に樹立された iPS 細胞 (第 1 世代) は、細胞形態や増殖能、分化能力などにおいて ES 細胞に近似していたが、遺伝子発現のパターンやゲノムのメチル化状態などに関しては、ES 細胞と同一でなかった。そこで、Okita ら<sup>2)</sup> は、マウス ES 細胞の pluripotency 維持に重要な Nanog 遺伝子の発現を指標として新たな iPS 細胞の樹立を試みた。その結果、ES 細胞とほぼ同等の pluripotency を示す Nanog iPS 細胞の樹立に成功した。この Nanog iPS 細胞は、キメラマウスを介して生殖系列へ導入されることが確認された。

## ヒト iPS 細胞の樹立

ヒトとマウスは、ゲノムレベルで比較的高い相同性を示すが、両者のES細胞は、細胞形態や万能性維持に必要な成長因子や発現遺伝子のパターンなどで異なる点がある。マウス iPS 細胞の成功を受けて、世界中の研究者の関心は、この手法がヒト体細胞に応用し得るかという点に集った。Takahashi<sup>1)</sup>らのマウス iPS 細胞樹立で使用された遺伝子のヒト相同遺伝子（OCT-4、SOX2、KLF4 および C-MYC）を導入して、ヒト成人の皮膚から単離された線維芽細胞（36才、女性）、新生児線維芽細胞および線維芽様滑膜細胞（69才、男性）から、それぞれヒト iPS 細胞を樹立することに成功した。

## iPS 細胞の可能性

ヒト iPS 細胞の誕生で、再生医療研究が常に抱えて来た生命倫理問題解決の糸口が示された。ローマ法王庁生命科学アカデミーElio Sgreccia 司教の「人工多能性幹細胞の作製が成功したことについて、胚の使用に関連した倫理問題とすべきでない」との見解は、iPS 細胞が厳格な宗教界からもコンセンサス得たことを示している。iPS 細胞の臨床応用は、導入遺伝子やレトロウイルスに起因する腫瘍発生など克服すべき技術的課題が残されているが、免疫拒絶の無い再生医療やテーラーメイド創薬を実現することによって、世界の産業構造を変えるほどの大きな可能性を持っている。

## 参考文献

1. Takahashi K, Yamanaka S. (2006) “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.” . Cell 126: 663-676. PMID 16904174.



2. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. (2007) “Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.” . Nature 448: 313-317. PMID 17554338.
3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.” . Cell 131: 861-872. PMID 18035408.

訃報

SSRE 役員でありました明治大学名誉教授 高橋直躬先生におかれましては、平成 20 年 1 月 31 日にご逝去なされました。

ここに謹んで御冥福をお祈りいたします。

---

**Journal of REPRODUCTION ENGINEERING**

生殖工学（研）会誌

第 11 卷

**Vol. 11**

平成 20 年 12 月 発行

発行者 生殖工学（研）会

代表 竹島 勉

発行所 生殖工学（研）会

〒229-8501 相模原市淵野辺 1-17-71

麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

**TEL: 042-769-2339 FAX: 042-769-1762**

---

## SSRE 協賛

総合発酵食品の製造・販売

バイオ研究開発の支援

OEMによる商品企画・提案・製造



# ホワイト食品工業株式会社

<http://www.white-kk.co.jp/>

	本社	東京営業所	大阪営業所
住所	〒939-1816 富山県南砺市城端552番地	〒160-0023 東京都新宿区西新宿4-32-11 セントピラ永谷611	〒530-0011 大阪市淀川区西中島6-2-3 チサン第7新大阪ビル920
TEL、FAX	TEL: 0763-62-1777 FAX: 0763-62-3520	TEL: 03-3377-4010 FAX: 03-3299-4010	TEL: 06-6307-4010 FAX: 06-6307-0780
E-mail	<a href="mailto:white@white-kk.co.jp">white@white-kk.co.jp</a>	<a href="mailto:m-ui@white-kk.co.jp">m-ui@white-kk.co.jp</a>	

## SSRE 協賛

\*\*\*\*\*研究開発分野のトータルサプライヤー\*\*\*\*\*

# 株式会社 町田医理科

〒194-0041 東京都町田市玉川学園 1-17-15

TEL: 042-725-9103 (代) FAX: 042-725-9094

E-mail: [irika@medical.email.ne.jp](mailto:irika@medical.email.ne.jp)

### (事業内容)

理化学機械器具・研究設備・計量器・分析機器販売

一般試薬・特殊用途試薬（生化学、液クロ、残農、有機合成等）販売

医科機械、医薬品の販売

福祉機材の販売

J R E