

\*\*\*\*\*

# アポトーシス阻害因子の人為発現による潜在的卵子救命法の創出

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授 眞鍋 昇

\*\*\*\*\*

## ■ 目的

家畜でも初代培養細胞を用いて標的遺伝子のノックアウトが可能となり、この細胞の核を体細胞核移植法で脱核した卵子に導入して産仔を得ることができる。しかし、体細胞核移植クローン作出法が開発されて15年以上たつにもかかわらず、成功率は未だに極端に低い。そこでアポトーシス阻害因子の人為発現による潜在的卵子の救命を実現することで、高品質の卵子を多量に供試可能とし、家畜バイオテクノロジーの格段の進展をはかることを目的に本研究を企画した。すなわち、卵胞の選択的死滅を制御している分子機構の解明研究の成果を生かし、食肉処理場にて得られる未熟卵胞を含む卵巣の皮質細片を凍結保存・融解後、重症複合免疫不全マウスに異種移植し、そこでアポトーシス阻害因子の遺伝子導入によって卵胞死滅を阻止することで卵母細胞を救命するという、最先端技術を複合的に駆使して、卵巣内の潜在的卵子を救命して有効利用するシステムの創出をはかった。

## ■ 方法

はじめに、人為的に阻害因子の発現を調節することで卵胞の救命が可能か否かを確認した。アポトーシス・シグナル伝達系の上流で作用している阻害因子 cFLIP と下流の XIAP とに焦点を絞り、これらの発現レベルが卵子品質の指標として適しているか否かを評価するとともに、これらを人為的に過剰発現させることで、食肉処理場で廃棄されている卵巣内の潜在的卵子の救命をはかった。すなわち、末梢血中ホルモン濃度と超音波画像診断にて性周期を確定したブタ卵巣の二次卵胞が豊富な皮質部細片を作製し、これを polyethylene glycol と dimethyl sulfoxide を含む凍結保護剤(中川ら、J Reprod Dev,57: 335,2011)に浸漬後、液体窒素中でガラス化凍結した。これを融解後、重症複合免疫不全マウス腎漿膜下に異種移植した。この時 cFLIP-1 あるいは XIAP 遺伝子発現ベクターをマウスに投与し、卵胞の発育・成熟を経時的に調べた。卵胞発育ステージを判定後、卵子を取り出し、体外成熟培養、体外受精、初期胚の体外培養を行って救命の可否を調べた。加えて、導入遺伝子がブタ卵母細胞内に発現していないことを確認した。

## ■ 結果および考察

これまで凍結保存が難しかったブタ卵巣組織細片を凍結保存後に融解し、重症複合免疫不全マウスに移植し、アポトーシス阻害因子を卵胞顆粒層細胞に過剰発現させることで、卵胞発育を可能にできた。さらに顆粒層細胞に阻害因子が高発現している卵胞から卵子を調製すると、体外受精と胚の体外培養が可能であった。いまだ諸点でブラッシュアップが必要であるが、概ね当初立案したプロトコルに従えば、これまで困難であった卵巣内の潜在的卵子を救命し、それを有効利用することが可能となった。

## ■ 結語

今日も食肉処理場では、優れた形質の雌家畜の卵子は無為に廃棄され続けている。本研究によってこの有効利用が可能となり、雌家畜側からの高効率の育種改良が実現する。加えて、女性の担癌患者の卵子を救命できることとなった。本研究は、農学や医学等の広領域を介して社会に貢献する意義が高いものである。