

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22681035

研究課題名(和文) フリーズドライ体細胞を用いた家畜の遺伝資源保存・再生技術の開発

研究課題名(英文) Development of genetic resources preservation for domestic animals using freeze-dried somatic cells

研究代表者

松川 和嗣 (MATSUKAWA, Kazutsugu)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号：00532160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円、(間接経費) 3,510,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、絶滅が危惧されている家畜のクローン技術と凍結乾燥技術を組み合わせた保存・再生を試みている。本研究では、ウシ線維芽細胞の凍結乾燥後におけるDNA損傷細胞数を計測し、凍結乾燥後の保存温度が核移植胚の発生に与える影響を検討した。凍結乾燥後1週間のDNA損傷細胞の割合は、-30℃保存では22%、+20℃では100%となり有意な差が認められた($P < 0.05$)。培養細胞、-30℃保存および+20℃保存凍結乾燥細胞を核移植したときの卵割率は67%、50%および0%、胚盤胞発生率は37%、28%および25%となり、培養細胞と-30℃で保存した凍結乾燥細胞の間に有意な差は認められなかった($P > 0.05$)。

研究成果の概要(英文)：Freeze-dried somatic cells have been proposed as a new tool for production of clone animals, since it can overcome disadvantages of the current cryopreservation method. Here, we investigated the DNA damage on bovine fibroblast cells after lyophilization, and the influence of storage temperature of FD cells on in vitro development of oocytes after NT. The rate of DNA-damaged cells was 22% in FD cells preserved at -30°C, and 100% at +20°C. The cleavage rates of NT embryos with fresh cells, FD cells stored at -30°C, and those stored at +20°C were 67%, 50%, and 0%, respectively. The blastocyst formation rates were 37%, 28%, and 0%, respectively. No significant differences were found between FD cells stored at -30°C and fresh cells with regard to cleavage and development to the blastocyst stage. These results suggest that bovine blastocysts are successfully produced from FD cell-NT oocytes.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：遺伝子資源保全 凍結乾燥 牛 核移植

1. 研究開始当初の背景

近年、あまりにも食用に特化した生産体系により、世界中で飼養される家畜品種が限定され、多様性が急速に失われつつある。生物資源として家畜を考えると、このままでは、1) 同じ病気に対して弱い家畜が広まることになり一気に世界から家畜を失うことが危惧され、また、2) 今後予想される地球温暖化に伴う暑熱や疾病に対する耐性を有する家畜品種を失うことになる。これらの問題の解決には、家畜の多様性を維持すること、特に絶滅の危機に瀕している希少家畜品種を保存する必要がある。希少家畜の保存手段としては一般的に、生殖細胞(卵子・精子)あるいは受精卵(胚)の凍結保存が考えられる。しかしながら、絶滅が危惧される家畜品種の多くは開発途上国で飼養されており、生殖細胞や胚の採取自体が難しい。さらに開発途上国では、凍結保存に不可欠な液体窒素が手に入らない場合が多いため、凍結保存は実用的な遺伝資源の保存法ではない。これらの問題を解決する手段として、開発途上国で希少家畜品種の体細胞を真空凍結乾燥法(フリーズドライ)などによって常温で長期保存できるように加工し、先進国に設置されたバンクに輸送して保存し、必要に応じて体細胞クローン技術によって再生することが考えられる。さらに液体窒素を用いない細胞の長期保存は、遺伝資源の保存コストの削減、保存スペースの縮小、輸送の簡易化を可能にする。しかしながら、これまでに凍結乾燥した体細胞を用いた体細胞クローン家畜の作製の成功例はない。

2. 研究の目的

本研究は、我々の開発した凍結乾燥体細胞を用いたヒツジクローン胚の作製技術を基にして、絶滅危惧家畜品種の保存および再生技術を開発することを目的とする。そのために家畜として有用性が高く、クローン作出が比較的容易なウシをモデル家畜として研究に供試し、凍結乾燥体細胞由来のクローン牛の作出を目指す。

3. 研究の方法

本研究では希少和牛品種の一つである土佐褐毛和種牛をモデルとして用いた。

(1) 体細胞の凍結乾燥処理条件の検討

ウシ卵胞吸引液由来の顆粒膜細胞をバイアル瓶に入れ-30℃で予備凍結した後、2段階で乾燥した。その後、窒素充填あるいは真空状態で密封し、+4℃で保存した。凍結乾燥直後、1週間および1ヶ月後のDNA損傷度をアルカリコメットアッセイ法により評価した。

また、ウシ耳片由来の繊維芽細胞を凍結し、融解後10% FCS添加DMEM培地で培養した。増殖期、コンフルエント直後、1日目、2日目および5日目における細胞のDNA含量から細胞周期を解析した。さらに、凍結乾燥後のDNA損傷細胞の割合をコメットアッセイ法によって評価した。

(2) 凍結乾燥体細胞の核移植

凍結乾燥後-30℃に保存した繊維芽細胞を1週間および1ヶ月後に復水させ、除核未受精卵に注入し、活性化処理後、それぞれ38.5℃、5% CO₂、5% O₂の気相下で8日間培養した。

(3) 凍結乾燥体細胞由来核移植胚の移植

フリーズドライ後-30℃で1週間保存した繊維芽細胞を用いて核移植を行い、作出した胚盤胞は受胎雌牛へ移植し、受胎率と妊娠状況の経過を調査した。

4. 研究成果

(1) 凍結乾燥顆粒膜細胞のDNA損傷度は、窒素充填よりも真空状態で保存したもののほうが低く、1週間から1ヶ月間の真空保存ではDNA損傷は増加しない傾向にあった。また、増殖期、コンフルエント直後、1日目、2日目および5日目のウシ繊維芽細胞において、G0/G1期の細胞の割合はそれぞれ、74、93、96、96および96%となり、増殖期とその他の時期の間に有意な差が認められた($p < 0.05$)。凍結乾燥後のDNA損傷細胞の割合はそれぞれ、8、5、7、17および21%となり、増殖期、コンフルエント直後および1日目と5日目の間に有意な差が認められた($p < 0.05$)。

(2) 凍結乾燥後-30℃で1週間および1ヶ月間保存した細胞を核移植したときの卵割率はそれぞれ50% (18/36) および50% (16/32)、胚盤胞発生率は27.8% (10/36) および15.6% (5/32) となり、卵割率および胚盤胞発生率に有意な差は認められなかった($P > 0.05$)。

(3) 4個の凍結乾燥体細胞由来胚盤胞を受胎牛4頭に胚移植したが、受胎は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Czernik M, Fidanza A, Sardi M, Galli C, Brunetti D, Malatesta D, Della Salda L, Matsukawa K, Ptak GE, Loi P. Differentiation potential and GFP labeling of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Cell Biochem., 114, 134-143, 2013 (査読有).
2. Takeda K, Srirattana K, Matsukawa K, Akagi S, Kaneda M, Tasai M, Nirasawa K, Pinkert CA, Parnpai R, Nagai T. Influence of intergeneric/interspecies mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. J Reprod Dev., 58, 323-329, 2012 (査読有).
3. Srirattana K, Matsukawa K, Akagi S, Tasai M, Tagami T, Nirasawa K, Nagai T, Kanai Y, Parnpai R, Takeda K. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. Anim Sci J, 82, 236-243, 2011 (査読有).
4. Satoshi Akagi, Kazutsugu Matsukawa, Eiji Mizutani, Kazuhiro Fukunari, Masahiro Kaneda, Shinya Watanabe, Seiya Takahashi. Treatment with a Histone Deacetylase Inhibitor After Nuclear Transfer Improves the Preimplantation Development of Cloned Bovine Embryos. Journal of Reproduction and Development, 57, 120-126, 2011 (査読有).
5. Akagi S, Yamaguchi D, Matsukawa K, Mizutani E, Hosoe M, Adachi N, Kubo M, Takahashi S: Developmental ability of somatic cell nuclear transferred embryos aggregated at the 8-cell stage or 16- to 32-cell stage in cattle. Journal of Reproduction and Development, 57, 500-506, 2011 (査読有).
6. Dang-Nguyen TQ, Kaneda M, Somfai T, Haraguchi S, Matsukawa K, Akagi S, Kikuchi K, Nakai M, Nguyen BX, Tajima A, Kanai Y, Nagai T: Development of single blastomeres derived from two-cell embryos produced *in vitro* in pigs. Theriogenology, 76, 88-96, 2011 (査読有).
7. Satoshi Akagi, Misa Hosoe, Kazutsugu Matsukawa, Akihiko Ichikawa, Tamio Tanikawa, Seiya Takahashi, Culture of bovine embryos on a polydimethylsiloxane (PDMS) microwell plate. Journal of Reproduction and Development, 56, 475-479, 2010 (査読有).
8. Kumiko Takeda, Mariko Tasai, Satoshi Akagi, Kazutsugu Matsukawa, Seiya Takahashi, Masaki Iwamoto, Kanokwan Srirattana, Akira Onishi, Takahiro Tagami, Keiji Nirasawa, Hirofumi Hanada, Carl A. Pinkert, Microinjection of serum-starved mitochondria derived from somatic cells affects parthenogenetic development of bovine and murine oocytes. Mitochondrion, 10, 137-142, 2010 (査読有).
9. Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma, Tomohiro Iyanagi, Fumihito Arai, Tatsuo Arai, Akiyuki Hasegawa, Tamio Tanikawa, Akihiko Ichikawa, Osamu Sato, Akihiro Nakayama, Hiroshi Aso, Mitsuhiro Goto, Seiya Takahashi, Kazutsugu Matsukawa, Design and fabrication of all-in-one unified microfluidic chip for automation of embryonic cell manipulation, Journal of Robotics and Mechatronics, 21,371-379, 2010 (査読有).

[学会発表](計13件)

1. 郡七海, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 赤木悟史, 保地眞一, 松川和嗣. ウシ線維芽細胞の培養時期が細胞周期および凍結乾燥後のDNA損傷に与える影響. 第117回日

- 本畜産学会大会，新潟大学五十嵐キャンパス，新潟市，2013/9/9-10.
2. Kazutsugu Matsukawa, Nanami Kori, Shinichi Hochi, Satoshi Akagi, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai, Pasqualino Loi. Production of bovine blastocysts by nuclear transfer using freeze-dried fibroblast cells. Society for the Study of Reproduction 46th Annual Meeting, 2013/7/22-26, Montreal (Canada).
 3. 竹中由布，枝重圭祐，葛西孫三郎，松川和嗣．アスコルビン酸 2 リン酸の発生培地への添加がウシ体外受精胚の発生に及ぼす影響．第 116 回日本畜産学会大会，広島市，2013/3/27-30.
 4. 久々彩香，田村奈々，竹中由布，枝重圭祐，葛西孫三郎，松川和嗣．L-アスコルビン酸 2 リン酸の培地への添加がウシ凍結融解胚および切断 2 分離胚の生存性に及ぼす影響．第 105 回日本繁殖生物学会大会，つくば市，2012/9/5-8.
 5. 西本あずさ，枝重圭祐，葛西孫三郎，保地眞一，松川和嗣．予備凍結および保存温度が凍結乾燥ウシ体細胞の DNA 損傷および核移植後の発生に及ぼす影響．第 105 回日本繁殖生物学会大会，つくば市，2012/9/5-8.
 6. 長谷川由貴，濱本圭祐，保地眞一，長尾さや子，枝重圭祐，葛西孫三郎，松川和嗣：凍結乾燥したウシ顆粒膜細胞の核移植に由来する胚盤胞の作出．第 104 回日本繁殖生物学会，盛岡市，2011/9/15-17.
 7. 赤木悟史，山口大輔，松川和嗣，水谷英二，Somfai Tamas，金田正弘，原口清輝，渡辺伸也，足立憲隆，高橋清也：ウシ核移植胚の集合処理によるクローン牛作出．第 104 回日本繁殖生物学会，盛岡市，2011/9/15-17.
 8. 長尾さや子，濱本圭祐，枝重圭祐，葛西孫三郎，保地眞一，松川和嗣：ウシ体細胞の凍結乾燥後の保存法が DNA 損傷度および核移植後の発生に及ぼす影響．第 114 回日本畜産学会，北里大学（青森），2011/8/26-27.
 9. K. Matsukawa, S. Akagi, K. Fukunari, Y. Hosokawa, C. Yonezawa, S. Watanebe, and S. Takahashi. The effects of donor cell cycle and the timing of oocyte activation on development of bovine nuclear transferred embryos in vivo. 37th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2011/1/8-12, Orlando (USA).
 10. S. Akagi, E. Mizutani, Y. Inaba, M. Kaneda, T. Somfai, S. Haraguchi, S. Watanabe, Y. Hashiyada, K. Matsukawa. Effect of treatment of bovine donor cells with mouse embryonic stem cell extract on the development of embryos after nuclear transfer. 37th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society 2011/1/8-12, Orlando (USA).
 11. 長尾さや子，長瀬祐樹，枝重圭祐，葛西孫三郎，保地眞一，松川和嗣．凍結乾燥したウシ体細胞による核移植胚作出の試み．第 103 回日本繁殖生物学会，十和田市，2010/9/2-4.
 12. Thanh Quang Dang-Nguyen, Masahiro Kaneda, Tamas Somfai, Kazutsugu Matsukawa, Satoshi Akagi, Kazuhiro Kikuchi, Michiko Nakai, Bui Xuan Nguyen, Atsushi Tajima, Yukio Kanai, Takashi Nagai. Significant improvement of blastocyst yield by production of twin blastocysts derived from two sister blastomeres of 2-cell embryos in pigs. 第 103 回日本繁殖生物学会，十和田市，2010/9/2-4.
 13. 赤木悟史、山中賢一、高橋昌志、金田正弘、水谷英二、ソムファイ・タマス、渡辺伸也、久保正法、橋谷田豊、松川和嗣．スクレプタイド処理がウシ核移植胚の発生に及ぼす影響．第 103 回日本繁殖生物学会，十和田市，2010/9/2-4.
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 新編畜産ハンドブック，講談社，扇元 敬二他，2014.
 2. Transgenic Animal Technology 3rd Edition, Pinkert CA 他，2014.
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

松川 和嗣 (MATSUKAWA, Kazutsugu)

高知大学・総合科学系生命環境医学部門・

准教授

研究者番号：00532160

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：