

令和元年6月19日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02593

研究課題名(和文) 絶滅動物の復活を目指した革新的技術開発

研究課題名(英文) Feasibility Study for the generation of live cell from extinct or endangered animal

研究代表者

若山 照彦 (WAKAYAMA, Teruhiko)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：40360672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅動物や絶滅危惧種の遺伝子資源の回収と保全を目的に、体細胞クローン技術の改良と応用を試みた。また同時に精子の遺伝子資源の保全を目的に凍結乾燥した精子の核の耐性限界を明らかにすることを試みた。その結果、尿に含まれている体細胞からクローンマウスを作り出すことに成功し、絶滅危惧種を傷つけずにクローン技術で増える可能性を示した。凍結乾燥精子は高真空状態であれば室温でも1年以上保存可能なことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってクローン技術の基礎研究が進み、動物を傷つけずにドナー核を入手できクローン個体を作り出せることが明らかとなった。これらの技術を応用すれば絶滅危惧種を安全に増やすことが可能になるだろう。一方遺伝子資源の保存方法として、精子の凍結乾燥の可能性を示すことができた。この方法なら宇宙ステーションで長期間マウスの精子を保存することも可能であり、地球規模の震災が起こっても、動物の遺伝子資源を確実に保存できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：This study aims to recover and preserve genetic resources of extinct and endangered species. For this purpose, we tried to improve somatic cell nuclear cloning technology, and stability and tolerance of freeze-dried sperm nuclei were examined in order to conserve animal genetic resources. As a result, we succeeded in creating cloned mice from urine derived somatic cell nuclei. This result indicates that cloning techniques can increase the endangered species by non-invasively. We also discovered that freeze-dried spermatozoa can be stored at room temperature for over a year when it was preserved under high vacuum conditions.

研究分野：生殖発生工学

キーワード：クローン 核移植 遺伝子資源 凍結乾燥 精子 絶滅危惧種 絶滅動物 顕微授精

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

絶滅動物を復活させることが出来れば、実際に体内で機能するすべての遺伝子を明らかに出来、その動物種についての研究を大きく発展させることができるだろう。また野生動物の家畜化に伴って失われてしまった、耐病性や耐寒性、繁殖能など、農業だけでなく種の維持にとって重要な多様性という遺伝子資源を手に入れることができるだろう。一方絶滅危惧種の場合、クローン個体を作ることが出来れば繁殖が継続され、絶滅を回避できるはずだが、生存個体は貴重で保護の対象となっている。また野生動物は保定するだけでも不測の死を招く危険があり、個体を傷つけてドナー細胞を採取することは困難である。さらに、クローン技術絶滅動物の復活に応用するためには、解決しなければならない問題が多い。たとえば現状のクローン動物の成功率(5%程度)は低すぎることである。また、一般的なマウス(近交系)では依然として成績は非常に低く(1%以下)、より難しい絶滅動物のクローン個体作出を目指すには、クローン動物の成功率(出産率)を大きく改善しなければならない。さらに、絶滅動物を用いた場合には、生きた細胞を用いる従来の核移植技術とは異なり、凍結死体や毛皮、あるいは糞に含まれる、死んだ個体のドナー細胞を用いなければならず、その核移植技術は格段に難しくなる。また、そのような保存環境に長期間曝された核が果たして正常なDNAを維持し発生する能力を保持しているのか、あるいはどの程度の劣悪環境まで核は耐えられるのかは全く分かっていない。これらの前人未至の実験は、メカニズムの解明ではなく、未知の状態の核をどうやって取り出し卵子へ移植するのか、という技術開発が中心となる。そしてこのような手技的な新技術の開発は、膨大な量の試行錯誤を行うことでしか成し遂げられない。

## 2. 研究の目的

絶滅動物の復活は、核を当該動物から回収できるかどうかという問題だけでなく、現在のクローン技術では2つの理由から達成できないことがわかってきた。1つ目は、基本的な核移植技術における成功率が依然として低いこと。2つ目は、凍結死体や毛皮、糞から核を取り出し卵子へ移植する技術が非常に難しく、様々な試行錯誤による条件検討がはかどらないことである。そこで本研究では、核移植技術の根本的な改良と、毛皮や糞に含まれる固化した核を用いたクローン技術の開発を目指すのと同時に、今後の遺伝子資源の保存のために核の耐性能力の限界を明らかにする。

## 3. 研究の方法

絶滅動物復活のための革新的技術の開発(従来技術では不可能な糞や毛皮の細胞からクローン個体作出、および利用可能な核の選別方法の確立)や、極限環境から回収した核の耐性限界を明らかにする。技術の熟練と、最適条件を発見するために膨大な量の試行錯誤が必要であるため、各テーマはそれぞれ複数のサブテーマから成り立っており、技術力と経験のある申請者と分担者が予備実験を担当し、実現可能と判断されたらポストクに引き継がせ、次のサブテーマの予備実験を開始する。したがって高度な技術を有する研究者の育成を目指し、世界でも例を見ない発生工学研究センターを大学内に設置し、基礎研究を開始している。

## 4. 研究成果

(1)尿に含まれる細胞からクローンマウスを作り出すことに成功した(図1)(Mizutani et al., Scientific Reports,



図1. 尿細胞から生まれたクローンマウス

2016)。この成果は主要な全国紙およびNHKなどのテレビで広く報道された。尿を利用すれば動物の体を傷つけることなくドナー細胞を回収できることを示しており、野生動物や絶滅危惧種への応用が期待できる。現在は排尿から時間のたった古い尿由来細胞からクローンの作成を試みている。

(2) 初期化促進のための新しい技術開発として、ドナー核を未受精卵に2回移植する連続核移植に初めて成功した(Wakayama S. et al., Cellular Reprogramming, 2016)。ドナー核を未受精卵の初期化因子に長時間触れさせて初期化を促進することを目的としたが、通常のドナー細胞に対しては成功率を改善する効果は見られなかった。しかし卵子細胞質内でDNA修復が行われることから、我々はダメージを受け通常の方法ではクローンを作りだすことが出来ないドナー細胞に対して効果があると考えいる。

(3) 膾炙細胞から回収した体細胞を使ってクローンマウスを作出することに成功した(Kuwayama et al., Theriogenology, 2017)。この方法も尿由来細胞と同様に個体を傷つけずに細胞を回収できるため、絶滅危惧動物のクローン作出に有効である。

(4) クローンマウスの研究において念願だったF1以外の卵子からのクローン作出に成功した(Tanabe et al., Reproduction 2017)。最も安く購入できるICR系統の卵子が利用可能となっただけでなく、系統間で卵子の初期化能力を比較することが可能となった。

(5) 核の耐性限界を明らかにするため、国際宇宙ステーション内で宇宙放射線に長期間曝したフリーズドライ精子から産仔を得ることを試みた。その結果、9か月間の宇宙保存では精子核に対するDNA損傷はわずかであることを初めて証明した(Wakayama S. et al., PNAS 2017)。この成果は主要な全国紙およびNHKなどのテレビで報道されただけでなく、海外でも広く紹介された。

(6) 核移植や胚移植のためには、卵子や胚を保護するだけでなく顕微操作において卵子や胚を固定するために透明帯が不可欠である。そこで、人工卵子が作出できた場合のために、人工透明帯の開発を行ったところ、アガロースで作られたカプセルであれば透明帯の代替品となることを明らかにした(Nagatomo et al., Scientific Reports 2017)。

(7) 糞から採取した体細胞核からクローン作出を試みた結果、多くのクローン1細胞期胚のDNAには深刻なダメージが生じ、核膜形成も不完全であることが明らかとなった。だが、糞からの核の採取方法の改善により正常な核を有するクローン胚の割合は約10%まで改善できた。さらに、正常なクローン胚の核を連続核移植の技術を用いて2回初期化させた結果、約20%まで正常なクローン胚の割合を高めることができ、初めて初期発生まで進めることに成功した(Kamimura et al., Scientific Reports, 2018)。まだ初期発生までしか成功していないが(図2)、今後の研究次第ではクローン産仔作出の可能性を示すことができた。毛皮からのクローン作出実験では、毛皮由来の核を効率よく回収する方法を検討したが、まだ成功していない。



図2. 糞から採取した核由来クローン胚

(8) 精子の室温保存技術の開発については、従来技術では短期間しか室温保存出来なかった理由が、真空であるはずのアンフルビンに空気が混入していたためであることを突き止めた。そこで空気の除去を目的にアンフルビン内へ除湿剤や脱酸素剤を加え、さらに非破壊検査技術を導入し高真空のアンフルビンを選び出すことで、ついに1年以上室温の机の引き出しの中にしまっておいたアンフルビンが



図3. 引き出しの中で1年保存した精子

ら多数の産仔を得ることに成功した (Kamada et al., Scientific Reports、 2018 )( 図 3 )、この成果は多数の新聞や Web で取り上げられた。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 18 件 )

Kamimura S, Wakayama S, Kuwayama H, Tanabe Y, Kishigami S, Wakayama T. Generation of two-cell cloned embryos from mouse faecal cell. Sci Rep. 2018 Oct 8;8(1):14922. doi: 10.1038/s41598-018-33304-2. 査読あり

Kamada Y, Wakayama S, Shibasaki I, Ito D, Kamimura S, Ooga M, Wakayama T. Assessing the tolerance to room temperature and viability of freeze-dried mice spermatozoa over long-term storage at room temperature under vacuum. Sci Rep. 2018 Jul 13;8(1):10602. doi: 10.1038/s41598-018-28896-8. 査読あり

Nagatomo H, Yao T, Araki Y, Mizutani E, Wakayama T. Agarose capsules as new tools for protecting denuded mouse oocytes/embryos during handling and freezing-thawing and supporting embryonic development in vivo. Sci Rep. 2017 Dec 20;7(1):17960. doi: 10.1038/s41598-017-18365-z. 査読あり

Tanabe Y, Kuwayama H, Wakayama S, Nagatomo H, Ooga M, Kamimura S, Kishigami S, Wakayama T. Production of cloned mice using oocytes derived from ICR outbred strain Reproduction. 2017 Oct 2. pii: REP-17-0372. doi: 10.1530/REP-17-0372. 査読あり

Yagi M, Kishigami S, Tanaka A, Semi K, Mizutani E, Wakayama S, Wakayama T, Yamamoto T, Yamada Y. Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. Nature. 2017 Aug 10;548(7666):224-227. doi: 10.1038/nature23286. 査読あり

Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 May 22. pii: 201701425. doi: 10.1073/pnas.1701425114. 査読あり

Kuwayama H, Tanabe Y, Wakayama T, Kishigami S. Birth of cloned mice from vaginal smear cells after somatic cell nuclear transfer. Theriogenology. 2017 May;94:79-85. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.02.012. Epub 2017 Feb 20. 査読あり

Wakayama S, Tanabe Y, Nagatomo H, Mizutani E, Kishigami S, Wakayama T. Effect of Long-Term Exposure of Donor Nuclei to the Oocyte Cytoplasm on Production of Cloned Mice Using Serial Nuclear Transfer. Cell Reprogram. 2016 Nov;18(6):382-389. 査読あり

Mizutani E, Torikai K, Wakayama S, Nagatomo H, Ohinata Y, Kishigami S, Wakayama T. Generation of cloned mice and nuclear transfer embryonic stem cell lines from urine-derived cells. Sci Rep. 2016 Apr 1;6:23808. doi: 10.1038/srep23808. 査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 海外招待講演 3 件、国際学会 8 件、国内 13 件 )

Wakayama T (2016) Production of offspring from cells derived from carcass or cast off material. Epigenetic Penetrance of Reproductive Technologies. June 9-10, 2016 University of Teramo, Teramo, Italy

Wakayama T (2018) Animal cloning from extinct or endangered species by nuclear injection. International conference 2018 BME Session: CELL REPROGRAMMING AND REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY June 27-29, 2018 at International University – VNU. HCMC, Vietnam

Wakayama T. Freeze-dried sperm preserved on space station. *In* Environmental impact on reproduction/fertility August 22-23, 2018 Linkoping University, Sweden

〔図書〕(計1件)

Wakayama S, Kishigami S., Wakayama T. Improvement of Mouse Cloning from Any Type of Cell by Nuclear Injection. *Methods Mol Biol.* Humana Press 2019;1874:211-228. doi: 10.1007/978-1-4939-8831-0\_12. P540 (pp211-228)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：岸上 哲士

ローマ字氏名： (KISHIGAMI, Satoshi)

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10291064

研究分担者氏名：長友 啓明

ローマ字氏名： (NAGATOMO, Hiroaki)

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：特任助教

研究者番号(8桁): 30746813

研究分担者氏名：大我 政敏

ローマ字氏名： (OOGA, Masatoshi)

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：助教

研究者番号(8桁): 40644886

研究分担者氏名：水谷 英二

ローマ字氏名： (MIZUTANI, Eiji)

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：助教

研究者番号(8桁): 80443034

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：若山 清香

ローマ字氏名：(WAKAYAMA, Sayaka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。