

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292140

研究課題名(和文) フリーズドライ体細胞および精子を用いたウシ生産技術の確立

研究課題名(英文) The establishment of cattle production using freeze-dried somatic cells and spermatozoa

研究代表者

松川 和嗣 (MATSUKAWA, KAZUTSUGU)

高知大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：00532160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たなバイオリソース保存技術を提案することを目的として、ウシ細胞(体細胞および精子)における凍結乾燥保存技術を確立し、凍結乾燥細胞由来の産子生産を目指した。その結果、凍結乾燥後-30℃で保存した場合、長期間DNAを保存し、凍結乾燥細胞を用いた核移植および凍結乾燥精子を用いた顕微授精によって安定的に胚盤胞を作出することが可能となった。しかし、作出した胚盤胞の受胎雌牛への胚移植では、産子生産には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In general, mammalian somatic cells are preserved in the ultra low temperature freezer or the liquid nitrogen. However, the maintenance and transportation of frozen cells are costly, and there are problems with a safety aspect on liquid nitrogen. Freeze drying, which removes moisture through sublimation, has been used for a long-term storage of food, drug, yeast. To our knowledge, little work has been devoted to freeze dry for mammalian somatic cells. The objective of this study was to establish of cattle production using freeze-dried somatic cells and spermatozoa. Our results suggest that bovine freeze-dried fibroblast cells would be useful as a donor cell for nuclear transfer, because they preserve their nuclear structure at -30℃. And the DNA damage in bovine spermatozoa are suppressed after freeze-drying, and freeze-dried spermatozoa produce blastocysts after ICSI. However, calves could not produced using blastocysts derived from freeze-dried somatic cells and spermatozoa.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 凍結乾燥保存 体細胞 精子

## 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てきている。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。この問題の解決には、必要な時に家畜を生産(再生)することができるシステムによって多様性を維持することが重要であり、国内では(独)農業生物資源研究所、各都道府県畜産試験場等の公的機関で生殖細胞(主に精子)および受精卵の凍結保存が実施されている。これらの保存は液体窒素内での保存が一般的であるが、十分なスペースおよび維持コストが恒常的に必要となる。また、東日本大震災後には電力や液体窒素の供給が途絶え、貴重な細胞サンプルが失われる事態が発生し、今後発生が予想される南海トラフ地震等の災害に備えることも考慮しなければならない。そこで現在、保存スペースの縮小、保存コストの削減、輸送の簡易化を可能にし、災害に強い新たな家畜生産技術の開発が望まれている。

凍結乾燥(以下、FD)技術は、酵母や真正細菌ではすでに長期保存に利用されているが、哺乳動物の体細胞では血小板や臍帯血由来単核細胞で報告があるものの(Wolkers *et al.*, 2001; Natan *et al.*, 2009)、その他の細胞種では認められていない。一方FD精子では、顕微授精による産子生産がマウス、ウサギ、ラット、ウマで報告されている(Wakayama and Yanagimachi, 1998; Liu *et al.*, 2004; Hirabayashi *et al.*, 2005; Kaneko and Serikawa, 2012; Choi *et al.*, 2012)。しかし、これまでのところ産業動物として重要なウシでは、胚盤胞は作出されているが産子には至っていない(Keskintepe *et al.*,

2002; Martins *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2011)。

FD体細胞の核移植への応用では、研究代表者らは世界で初めて、FD後3年間常温で保存したヒツジ体細胞由来の核移植胚を作出した(Loi *et al.*, Plos ONE, 2008)。我々の発表の後、マウス(Ono *et al.*, 2008)、ブタ(Das *et al.*, 2010)においてもFD体細胞由来胚盤胞作出が報告されており、FD技術により調整した体細胞でも胚盤胞までは発生することが証明されている。さらに、研究代表者は、科研費若手研究(A)(H22-25)、および挑戦的萌芽研究(H25)に採択され、FD後細胞膜および核膜が損傷を受けても核DNAの損傷を抑制することでウシ核移植胚盤胞の作出が可能であることを報告している。

## 2. 研究の目的

本研究では、約1,800頭しか飼養されていない希少和牛品種である褐毛和種高知系をモデル動物として供試し、新たなバイオリソース保存技術を提案することを目的として、ウシ細胞におけるFD保存技術を確立し、FD細胞(体細胞および精子)由来の産子生産を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ウシ細胞のFD保存技術の確立

本研究では、温度、気圧、時間等のパラメータを細かく設定できる凍結乾燥機(CHRIST社製ARPHA2-4)を用い、アルカリコメットアッセイ法によるDNA損傷を指標にしてFDプログラム、細胞種、FD緩衝液の種類、保存条件等を検討した。また、FD細胞の電子顕微鏡による観察と、細胞生物学的(DNA損傷、タンパク質分析)、物性的(含水率、示差走査熱量測定)評価をおこなった。さらに、長期常温保存のためにFD緩衝液への不凍タンパク質(Antifreeze protein, AFP)の添加の効果を検討した。

## (2) FD 細胞由来胚の効率的な作出法の検討

### 核移植胚の効率的な作出

(1)で検討した手法によってFDした線維芽細胞を除核未受精卵への核移植に供試した。本研究では、効率的な核移植胚の作出のために、異なる形態をもつ卵丘卵母細胞複合体の体外発生能の比較、および核移植後のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の添加の効果を検討した。

### 顕微授精胚の効率的な作出

これまで実験動物およびウマのFD精子では成功している産子生産は、ウシにおいては未だ成功していない。我々は、ウシ精子に適したFD保存の検討が不十分なために、顕微授精後の前核形成が不完全なことが原因ではないかと考え、これまで研究代表者らが実施してきたウシにおける顕微授精およびFD体細胞の研究をフィードバックすることでウシ精子に効果的なFD処理法を検討した。

### 自動細胞注入装置の開発

FD細胞の卵子への注入には倒立顕微鏡に設置したマイクロマニピュレーターによる手動操作が必要であるが、その操作には高度な熟練技術を要する。今後、FD細胞による哺乳動物の生産技術の普及・実用化のためには、FD細胞の自動注入装置の開発が必要だと考えた。そこで本研究では、細胞や精子を取り扱えるデバイスを3Dプリンターで検討し、マイクロロボット技術による自動注入装置の開発を行った。

## (3) FD 細胞由来のウシ胚の評価

FD細胞の注入後の胚は、共焦点顕微鏡および倒立顕微鏡でタイムラプス撮影し、その変化の特性（核の経時的形態、卵割のタイミング）を新鮮細胞由来の核移植胚および体外受精胚と比較した。FD細胞由来の胚盤胞は細胞数を計測した。さらに、FD体細胞由来の核移植胚は、初期発生に関わる遺伝子の発現を体外受精胚と比較し、正常発生の評価の指標となる遺伝子を調査した。

## (4) FD 細胞由来のウシ胚の移植

FD体細胞および精子を用いて作出した胚盤胞は、発情を同期化した受胎雌牛への胚移植試験に供試した。

## 4. 研究成果

### (1) ウシ細胞のFD保存技術の確立

ウシから採取した各種体細胞のFD後のDNA損傷率を検討したところ、新生子の耳から樹立した線維芽細胞が最も損傷が少なかった。さらに、同個体の耳から樹立した線維芽細胞では、月齢を重ねるごとにDNA損傷が増加し、細胞増殖能とFD後のDNA損傷との相関が示唆された。FD緩衝液として、m-EGTA (50 mM EGTA, 100 mM Tris HCl, pH 8.2) およびNa-EGTA (50 mM NaCl, 50 mM EGTA, 10 mM Tris HCl, pH 8.2) で調整したFD線維芽細胞のDNA損傷細胞率は、それぞれ12および24%となり有意な差が認められた ( $P < 0.05$ )。以上の結果から、FDに用いる体細胞は新生子から採取した線維芽細胞とし、m-EGTAを基本FD緩衝液として使用した。

FD体細胞の保存性を検討したところ、DNA損傷細胞の割合はFD直後では2%、FD後-30で1年間保存した場合は10%となり、FD細胞を-30で保存するとDNA損傷はほとんど増加しないことが判明した。次に、FD後に細胞を0、10、20、および30で5日間保存をしたところ、DNA損傷率はそれぞれ4、8、34、および100%となり、保存温度の上昇にしたがってDNA損傷細胞の割合も増加し、10と20の間に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。また、20で3、4、5、6および7日間保存した結果、9、22、30、36、および47%となり、3日目まではDNA損傷の増加は認められないが4日目以降に増加した。

FD後の長期常温保存を実現させるために、FD緩衝液への不凍たんぱく質 (AFP および ) の添加が細胞の保存性に与える効果を検討した。FD後20で5日間保存したFD細胞

の DNA 損傷率は、0、0.5、1、10、および 50% AFP I 添加では 34、14、7、6、および 25% となり、AFP 無添加区と比較して 0.5 および 1%AFP 添加区で DNA 損傷が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。また、0、0.5、1、10、および 50% AFP III 添加では、33、18、25、21、および 51% となり 0.5%AFP 添加区で DNA 損傷が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

以上本研究より、凍結乾燥後のウシ体細胞は保存温度が上昇し保存期間が延長することで DNA 損傷が増加することが明らかとなった。さらに、AFP および AFP の凍結乾燥緩衝液への添加によって室温保存の可能性が示唆された。

FD 後の細胞は、走査型電子顕微鏡 (SEM) では細胞膜が著しく破壊された多孔質であることが観察された。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) では、細胞膜および細胞小器官の損傷は認められるものの、核膜および核内部の形態は保存されていることが観察された。FD 前後に細胞のタンパク質を抽出し、一次元電気泳動後に FD 後に増加したタンパク質をペプチドマスフィンガープリンティングによって同定したところ、ビメンチン等の細胞骨格タンパク質であった。カールフィッシャー法によって FD 細胞の含水率を測定したところ 27% であり、示差走査熱量計の測定によるガラス転移温度は -20 であった。

これまで FD 精子の知見は数多く報告されているが、FD 体細胞について詳細に検討した報告はない。本研究によって、FD 後 -30 で保存することで長期に保存することが可能となった。しかし常温での長期保存は困難であり、その原因に FD 後の含水率が高く、ガラス化して安定する温度が低温であることが挙げられた。今後、FD 体細胞の長期常温保存を実現するためには、細胞への乾燥耐性の積極的な付加が必要であると考えられる。

FD 細胞由来胚の効率的な作出法の検討

#### 核移植胚の効率的な作出

培養細胞 (FD 無処理) および FD 直後、FD 後 1 週間、1 ヶ月間および 1 年間保存した細胞を用いた核移植での卵割率は、それぞれ 50、52、50、50、49%、胚盤胞発生率は 25、15、17、16、15% となり有意な差は認められなかった。卵巣から回収した卵丘卵母細胞複合体を卵丘細胞が緊密に付着した CP および膨潤した EX にわけ、それぞれを核移植に供試した。CP および EX の核移植後の卵割率は 51 および 90%、胚盤胞発生率は 15 および 40% となり、EX が有意に高い割合となった ( $p < 0.05$ )。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A およびスクリプタイトの添加による体外発生能向上の効果は認められなかった。

我々は、本研究に先駆けて世界初のウシ FD 体細胞による胚盤胞作出に成功しているが、本研究によって安定的に胚盤胞を作出することが可能となった。さらに作出した胚盤胞を構成する細胞数は体外受精胚と比較して差は認められず、形態的には良好な胚盤胞であった。

#### 顕微授精胚の効率的な作出

本研究では、FD によるウシ精子の保存技術の確立のため、FD 後の精子 DNA の損傷を抑制する条件についての検討をおこなった。まず、凍結融解精子の洗浄法を検討したところ、パーコール密度勾配遠心法によって回収した精子では DNA 損傷は観察されず、通常の遠心法では 17% の損傷が確認された。次に、FD 緩衝液として Na-EGTA を用いた場合、DNA 損傷は観察されず、m-EGTA では 2% の損傷が確認された。精子の乾燥に先駆けての凍結方法を比較したところ、緩慢凍結では DNA 損傷は観察されず、液体窒素による急速凍結では 2% の損傷が確認された。さらに、精子の前処理を検討するため、融解精子を 8 mM L-グルタチオン (GSH)、5 mM ジチオトレイトール (DTT) で 10 分間処理した後、FD を実施しコ

メットアッセイおよびTEM観察によって評価した。その結果、GSH処理では先体部およびDNAの損傷は観察されず、DTT処理では25%のDNA損傷および先体部の損傷が観察された。以上より、ウシ融解精子をパーコール密度勾配遠心法によって洗浄し、GSHによる前処理後Na-EGTAに浮遊させ、緩慢に凍結し乾燥することでDNA損傷を抑制した凍結乾燥精子を調整することが可能となった。

さらに、上述の条件によって調整したFD精子を卵子に顕微授精したところ、11%の胚盤胞発生率が得られた。これまでの報告では、ウシFD精子による胚盤胞発生率は低く(1%, Hara *et al.*, 2011)、本研究で検討したFD精子の調整法が胚盤胞作出に効果的であることが示唆された。

#### 自動細胞注入装置の開発

FD体細胞および精子の自動注入化のために、まず3Dプリンターによってデバイス設計の検討を行い、電磁式マイクロ駆動装置の制作を開発した。しかし注入のための操作性は良好でなく、FD処理したことにより表面が一度乾燥するため、表面のタンパク質が剥離し、さらに表面積が多くなることで、クーロン力によりピペット内部に表面に付着することが原因であると考えられた。今後、表面修飾等で付着を低減する手法を検討する必要がある。さらに、透明帯への挿入が可能で卵細胞膜を損傷しない構造のマイクロロボットの形状および卵細胞質を破壊しない注入圧力についても検討する必要があると考えられる。

#### (3) FD細胞由来のウシ胚の評価

FD体細胞の核移植後、核の動態の変化を観察したところ、核移植後2時間までに脱凝縮、5時間までに偽前核の形成が認められた。核移植後48時間以内に2細胞期に発生した胚は全て胚盤胞期まで発生するのに対し、48時間以降に2細胞期に発生したものは発生が途中で停止した。初期発生にかかわる遺伝子の

発現量をFD細胞の核移植胚および体外受精胚と比較したところ、核移植および体外受精胚のOct4およびXISTの発現量には有意な差は認められなかったが、IFN-tauにおいて核移植胚が体外受精胚に比べ有意に低い値を示した( $p < 0.05$ )。

以上本研究より、核移植後早期にFD細胞核の変化が起こり、48時間以内に2細胞期に発生した場合胚盤胞期まで発生が認められ、発生の速度が重要な指標となることが認められた。さらに、体外受精胚と遺伝子発現を比較するとFD核移植胚は着床にかかわるIFN-tauの発現が低下し、胚移植後の着床率の低下の原因となることが示唆された。

#### (4) FD細胞由来のウシ胚の移植

FD線維芽細胞によって作出した核移植胚は計10回、FD精子によって作出した顕微授精胚は計5回、胚移植を実施したが、いずれも移植後30日目の超音波検査によって受胎が確認されなかった。

これまで、松川(代表者)、赤木(共同研究者)は体細胞の核移植胚によってウシクローンを作出し(Akagi *et al.*, 2014)、及川(共同研究者)は顕微授精胚によるウシ産子生産の実績がある(Horiuchi *et al.*, 2002)。しかし本研究期間中、FD細胞を用いた核移植およびFD精子を用いた顕微授精によって安定的に良好な形態の胚盤胞を作出することが可能となったものの、その胚移植によって産子生産には至らなかった。その原因には、我々の開発したFD技術によって細胞内のゲノムDNAを保存し体外発生は可能であるが、体内発生に必要な因子が欠如している可能性が考えられる。今後、FD体細胞および精子からウシ産子を得るためには、さらなるFD条件の最適化および作出した胚の正常性の向上が必要である。

現在、哺乳動物細胞の保存は凍結保存が一般的であるが、液体窒素を用いた場合、その供給が常に必要となり、維持コスト、安全性、

輸送等に問題が生じる。さらに、災害等で液体窒素および電力の供給が断たれた時には貴重な遺伝資源の損失の恐れがあり、FD 保存技術は新たな遺伝資源保存技術として有望である。最近では、9 ヶ月間宇宙環境にさらされたマウス FD 精子から健康な産子が誕生しており (Wakayama *et al.*, 2017)、細胞の FD が宇宙開発に貢献することが期待される。さらに FD 研究の追及は、哺乳動物における生命活動の開始に必要な最小単位を考察することができ、生命活動に必要な要素が明らかになることでシステムとしての生命に対する理解がさらに加速することが考えられ、今後の発展が望まれる。

#### 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1件)

・ Satoshi Akagi, Kazutsugu Matsukawa, Seiya Takahashi, Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle, *Journal of Reproduction and Development*, 査読有り, 60, 2014, 329-335.

[学会発表](計7件)

- 1.尾崎耕、凍結乾燥したウシ線維芽細胞の特性および核移植後の発生能、日本繁殖生物学会、2014年8月21日~24日、北海道帯広市
- 2.田村慎之介、長期保存フリーズドライ体細胞を用いたウシ核移植胚の作出、日本畜産学会、2015年9月11日~12日、北海道江別市
- 3.Shin Hongo, Characteristics of bovine fibroblast cells after freeze drying, 17<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日~25日、福岡県福岡市
- 4.Kazutsugu Matsukawa, Factors affecting DNA damage in bovine spermatozoa after freeze drying, 17<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日~25日、福岡県

福岡市

5.Shin Hongo, Characteristics of bovine fibroblast cells after freeze drying, 17<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日~25日、福岡県福岡市 (Young Scientists Award 受賞)

6.Shinnosuke Tamura, Trial of nuclear transfer from bovine freeze-dried fibroblast cells, 17<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日~25日、福岡県福岡市

7.松川 和嗣、凍結乾燥によるウシ体細胞の保存とその応用、Cryopreservation Conference 2016、2016年11月10日~11日、愛知県岡崎市 (招待講演)

[図書](計2件)

1.扇元 敬二、講談社、畜産ハンドブック、2014年、768ページ

2.Pinkert CA, Elsevier, Transgenic Animal Technology 3<sup>rd</sup> Edition, 2014, 714ページ

[その他]

研究ネットワーク「褐毛和種生産振興ネットワーク」の設立とホームページの開設 (<http://akaushi-net.jp/>)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松川 和嗣 (Kazutsugu Matsukawa)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号：005321260

##### (2)研究分担者

・市川 明彦 (Akihiko Ichikawa)

名城大学・理工学部・准教授

研究者番号：20377823

・赤木 悟史 (Satoshi Akagi)

農研機構・畜産研究部門・主任研究員

研究者番号：70414696

・及川 俊徳 (Toshinori Oikawa)

宮城県畜産試験場・酪農肉牛部・席主任研究員、研究者番号：70588962