

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H03953

研究課題名（和文）哺乳動物のフリーズドライ細胞による遺伝資源保存および発生機構の探究

研究課題名（英文）Preservation of mammalian genetic resources and study for the developmental mechanism using freeze-dried 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生命環境医学部門・准教授

研究者番号：00532160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,900,000円

研究成果の概要（和文）：実験には、ウシ精子および体細胞を供試した。ウシ精子では、凍結乾燥（以下、FD）前の還元剤、特にGSH処理が胚生産に効果を発揮した。さらに、FD精子に水を加え顕微授精を実施し、胚盤胞期胚を受精卵移植したところ、雌子牛が誕生した。また、ウシ体細胞では、核移植によって作出したクローン胚を胚移植したところ、胚移植をした2頭のレシピエント雌牛のうち1頭が双子を受胎していることが確認された。しかしながら、妊娠172日目に胎子を流産し、1頭の胎子を回収した。遺伝的同一性検査により、供試体細胞とクローン胎子は遺伝的に同一であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物細胞（生殖細胞および体細胞）は、現在では液体窒素中に”生きたまま“保存する凍結保存が実用的技術となっている。しかし、凍結細胞の維持にはコストやスペースが恒常的に必要である、輸送が容易ではない、取り扱いには人体への安全面で問題がある、など様々な欠点がある。さらに、平成23年3月11日に発生した東日本大震災では、地震による直接の被害だけでなく、電力や液体窒素の供給が途絶えることによって貴重な生物遺伝資源が多数失われた。海外ではハリケーン等の自然災害でも損失が認められている。近年のサンプルの増加を背景にして、凍結保存に変わる革新的な哺乳動物細胞の保存技術が求められている。

研究成果の概要（英文）：Bovine sperm and somatic cells were used in the experiments. In the bovine sperm, the treatment of GSH before freeze-dry (FD) was effective in embryo production in vitro. In addition, FD sperm were subjected to ICSI with the addition of water, and blastocyst-stage embryos were transferred to embryos, resulting in the birth of a female calf. In bovine somatic cells, cloned embryos produced by nuclear transfer were embryo transferred, and it was confirmed that one of the two recipient ewes that underwent embryo transfer had conceived twins. However, the fetus was aborted on day 172 of gestation, and one embryo was retrieved. Genetic identity testing confirmed that the recipient somatic and cloned fetus were genetically identical.

研究分野：発生工学

キーワード：凍結乾燥 哺乳動物遺伝資源 精子 体細胞 生殖工学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現実または潜在的な価値を有する生物遺伝資源は、生命科学、農業、医薬品開発、材料等様々な分野で研究・産業発展のために必要不可欠のものであるが、一度失われると再現不可能なためにその保管は非常に重要である。生物遺伝資源の中でも哺乳動物細胞（生殖細胞および体細胞）は、現在では液体窒素中に”生きたまま“保存する凍結保存が実用的技術となっている。しかし、凍結細胞の維持には液体窒素を常に供給しなければならずコストやスペースが恒常的に必要である、輸送が容易ではない、取り扱いには人体への安全面で問題がある、液体窒素生産にかかる環境負荷など様々な欠点がある。さらに、平成 23 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災では、地震による直接の被害だけでなく、電力や液体窒素の供給が途絶えることによって貴重な生物遺伝資源が多数失われた。海外ではハリケーン等の自然災害でも損失が認められている。このような課題に対しては、国内では農研機構遺伝資源センター、理化学研究所、大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBBP) 等で、大量保管や分散保存の体制が整備されているが、近年のサンプルの増加を背景にして、凍結保存に変わる革新的な哺乳動物細胞の保存技術が求められている。

凍結乾燥 (フリーズドライ; 以下、FD) 技術は、被乾燥物を凍結させ、次いで高真空下でその凍結水を昇華させて除く乾燥法であり、食品や医薬品製造の分野で応用される技術である。生物試料では、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 FD 後の生存の報告があるものの (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。これまでのところ FD 体細胞の核移植技術による胚盤胞期胚の作出はヒツジで成功したのちに、マウス、ブタおよびウシで確認されているが、FD 体細胞由来のクローンはどの動物種でも作出されていない。

一方、FD 精子の顕微授精による実験動物の産子が生産され (Wakayama and Yanagimachi, 1998)、ラットでは 4 で 5 年間保存した FD 精子を用いての産子に成功している (Kaneko and Serikawa, 2012)。しかし家畜では、これまでのところウマが成功しているのみで、その他の家畜では FD 精子由来の産子は誕生しておらず、胚盤胞が作出されているのみである。さらに、FD 後の常温保存が困難なため、FD による哺乳動物細胞の保存は実用的技術とはなっていない。

### 2. 研究の目的

家畜の品種および遺伝的多様性を維持するためには、一般的に生殖細胞および体細胞を凍結保存する。しかし、液体窒素保存や超低温冷凍庫保存には、「持続可能性」という面で様々な問題点が存在する。加えて、南海トラフ地震の発生が予想されるなか、褐毛和種高知系の遺伝資源を確実に保存する技術が喫緊に求められている。我々は、新たな哺乳動物の遺伝資源保存技術を開発するために、生殖工学技術と凍結乾燥技術を組み合わせた哺乳動物体細胞および精子の保存および個体の生産技術の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### FD 精子

精子はウシ新鮮射出精液を供試した。パーコール密度勾配遠心法により生存精子を選別し、凍結乾燥 (11 時間) および乾燥 (42、20 時間) 処理した。DNA 損傷精子の割合は、Halo Sperm Test 法により評価した。FD 精子をウシ卵母細胞に顕微授精し、発生培養後に胚移植を行った。

#### FD 細胞

細胞は褐毛和種高知系の耳片から樹立した線維芽細胞を供試した。FD 緩衝液に mEGTA を使用し、FD 後にヨウ化プロピジウム (PI) 染色による生死判別を行った。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。さらに、走査電子顕微鏡 (SEM) と透過電子顕微鏡 (TEM) により FD 前後の細胞の内部および表面を観察した。レシピエント牛に発情同期化処理を行い、6~8 日間発生培養を行った FDNT 胚盤胞期胚を胚移植した。胚移植から 30、60、90 日目に超音波による妊娠鑑定を行い、その後 2 週間おきにレシピエントの体重

および腹部を計測し、妊娠状況の経過を観察した。

#### 4. 研究成果

実験には、ウシ精子及び体細胞もモデルとして供試した。その結果、ウシ精子では、FD に用いるバッファーや精子注入後の卵子の活性化処理、フリーズドライ前の精子の還元剤処理条件について検討したところ、フリーズドライ前の還元剤、特に GSH 処理は胚生産に効果を発揮した。GSH 処理により精子頭部の細胞膜は保存されることで精子頭部の DNA はフリーズドライされても正常の状態を維持することで顕微授精後の胚発生率が向上したと思われる。さらに、FD 精子に水を加え顕微授精を実施し、胚盤胞期胚を受精卵移植したところ受胎が確認された。受胎後は通常の経過を辿り、2020 年 4 月 14 日に雌子牛が誕生し、生時体重は 30kg で妊娠期間は 285 日だった。

また、ウシ体細胞では、FD 後の細胞は PI で全て染色され、死細胞であることを確認した。DNA 損傷度は新鮮細胞が 5.4%、FD 細胞が 9.5%であった。SEM による観察から FD 前に比べて細胞膜が破壊されているものの、TEM による観察から FD 後も細胞小器官および核膜が保存できていることが観察された。核移植によって作出したクローン胚を胚移植したところ、胚移植をした 2 頭のレシピエント雌牛のうち 1 頭が双子を受胎していることが確認された。しかしながら、妊娠 172 日目に胎子を流産し、1 頭の胎子を回収した。遺伝的同一性検査により、供試体細胞とクローン胎子は遺伝的に同一であることが確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Akagi Satoshi, Matsukawa Kazutsugu	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of Trichostatin A on the Timing of the First Cleavage and <i>In Vitro</i> Developmental Potential of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Reprogramming	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/cell.2022.0003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qiu J, Hasegawa A, Mochida K, Ogura A, Koshimoto C, Matsukawa K, Edashige K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Equilibrium vitrification of mouse embryos at various development stages using low concentrations of cryoprotectants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 109-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Qiu J, Hasegawa A, Mochida K, Ogura A, Koshimoto C, Matsukawa K, Edashige K.	4. 巻 98
2. 論文標題 Equilibrium vitrification of mouse embryos using low concentrations of cryoprotectants.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cryobiol.2020.11.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Palazzese L, Anzalone DA, Turri F, Faieta M, Donnadio A, Pizzi F, Pittia P, Matsukawa K, Loi P	4. 巻 10
2. 論文標題 Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18873
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76061-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Akagi S, Tamura S, Matsukawa K.	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 Timing of the First Cleavage and In Vitro Developmental Potential of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Activated by Different Protocols.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reprogramming	6. 最初と最後の頁 36-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/cell.2019.0074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Loi, P., Galli, C., Lazzari, G., Matsukawa, K., Fulka, J. Jr., Goeritz, F., Hildebrandt, T.B.	4. 巻 64
2. 論文標題 Development to term of sheep embryos reconstructed after inner cell mass/trophoblast exchange	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 187-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Higuchi, T., Morisawa, K., Todaka, H., Lai, S., Chi, E., Matsukawa, K., Sugiyama, Y., Sakamoto, S.	4. 巻 503
2. 論文標題 A negative feedback loop between nuclear factor 90 (NF90) and an anti-oncogenic microRNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1819-1824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 岡村早穂、本郷新、田村慎之介、赤木悟史、竹中由布、樋口琢磨、坂本修士、枝重圭祐、井上梓、松川和嗣
2. 発表標題 ウシ凍結乾燥体細胞を用いて作出した核移植胚におけるヒストンH3のメチル化および遺伝子発現
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutsugu Matsukawa, Akihiko Ichikawa
2. 発表標題 Production of bovine embryos using freez-dried somatic cells
3. 学会等名 MHS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutsugu Matsukawa, Saho Okamura, Keisuke Edashige, Azusa Inoue, Pasqualino Loi
2. 発表標題 Factors affecting in vivo development of nuclear transfer embryos using freez-dried somatic cells in cattle
3. 学会等名 CRY02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松川和嗣、横山輝智香、及川俊徳、緒方和子、武田久美子、枝重圭祐
2. 発表標題 液体窒素を使用しない凍結乾燥精子を用いたウシ体外受精胚作出の試み
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本郷新、樋口琢磨、坂本修士、赤木悟史、武田久美子、及川俊徳、枝重圭祐、松川和嗣
2. 発表標題 ウシ除核卵母細胞を用いた雄性発生胚の効率的作出
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin Hongo, Shinnosuke Tamura, Keisuke Edashige, Pasqualino Loi, Kazutsugu Matsukawa
2. 発表標題 Challenges to preserve bovine freeze-dried fibroblast cells at room temperature for nuclear transfer
3. 学会等名 CRYO2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松川 和嗣, 本郷 新, 井上 陽香, 横山 輝智香, 森澤 啓子, 樋口 琢磨, 坂本 修士, 及川 俊徳, 斎藤 公治, 赤木 悟史, 武田 久美子, 黄川田 隆洋, 市川 明彦, 枝重 圭祐
2. 発表標題 哺乳動物細胞におけるフリーズドライ保存の可能性と課題
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

褐毛和種生産振興ネットワーク <a href="http://akaushi-net.jp/">http://akaushi-net.jp/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	樋口 琢磨  (Higuchi Takuma)  (10754567)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教    (16401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	市川 明彦 (Ichikawa Akihiko)  (20377823)	名城大学・理工学部・准教授  (33919)	
研究分担者	枝重 圭祐 (Edashige Keisuke)  (30175228)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授  (16401)	
研究分担者	武田 久美子 (Takeda Kumiko)  (60414695)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員  (82111)	
研究分担者	黄川田 隆洋 (Kikawada Takahiro)  (60414900)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員  (82111)	
研究分担者	赤木 悟史 (Akagi Satoshi)  (70414696)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員  (82111)	
研究分担者	及川 俊徳 (Oikawa tosinori)  (70588962)	宮城県畜産試験場・畜産試験場・上席主任研究員  (81305)	
研究分担者	坂本 修士 (Sakamoto shuji)  (80397546)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授  (16401)	
研究分担者	郡 七海 (Kori Nanami)  (30966289)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・助教  (16401)	



7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------