

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06457

研究課題名(和文) フリーズドライ卵子の作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of freeze-drying technology using mammalian oocyte

研究代表者

日下部 博一 (Kusakabe, Hiromazu)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60344579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウスの二次卵母細胞を用い、細胞質を適量含んだ紡錘体からなる「ミニ卵」を、凍結乾燥に適した大きさと効率よく簡単に作製する技術を開発した。作製されたミニ卵を20 micro M のトコトリエノールを含むTris-EGTA溶液(KOHで溶解させて作製)で3日間まで処理し、凍結乾燥して別の新鮮な除核卵に移植を試みたところ、移植操作そのものが可能であることが確認された。移植後の再構築卵を単為発生させて第一卵割中期で染色体を解析したところ、22-34%の単為発生卵が正常な染色体をもつことが確認された。ただし、凍結乾燥ミニ卵は今のところ染色体異常率が高いため、今後さらなる改良が必要とされる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトを含めた哺乳類の安全な卵子保存方法の確立を目指す研究である。これまでに精子保存方法では、様々な動物を用いて凍結乾燥法による冷蔵・室温保存方法が研究されているが、卵の凍結乾燥法は研究が進んでおらず、依然として液体窒素を用いる凍結保存法しか体外で維持する方法がない。そのため、地震などの災害やヒューマンエラーによる停電、もしくは家屋の倒壊などによる液体窒素供給システムの停止による遺伝子資源喪失のリスクは未だ高いままである。本研究成果では、凍結乾燥後の卵はもはやリバイブしないが、雌性ゲノムの移植ドナーとして染色体異常をもたない「凍結乾燥ミニ卵」を作製できることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Mini oocytes, which are optimal volume of cytoplasm containing the spindle apparatus in mouse MII oocytes, could be injected into other enucleated oocytes after freeze-drying, when the mini oocyte were pretreated with 20 micro M gamma-tocotrienol/Tris-EGTA solution (alkalinized with KOH) for up to 3 days before freeze-drying. The reconstructive oocytes were artificially activated, and a small number of the parthenogenetic embryos (22 to 34%) had no chromosome damage at the first cleavage metaphase. However, further improvement of freeze-drying using mini oocytes will be necessary to lower the damage induced in freeze-dried mini oocytes.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：凍結乾燥法 マウス 染色体 卵

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の配偶子を安全かつ低コストで保存する方法として、凍結乾燥精子の冷蔵・室温保存法が研究されているが、凍結乾燥卵の研究については遅れている。そして、これまでに哺乳動物から作製した凍結乾燥卵がリバイブしたという文献的報告はない。地震や自然災害、もしくはヒューマンエラーなどによる停電や家屋の倒壊などによって液体窒素供給システムが停止し、貴重な遺伝子資源、特にヒトを含めた哺乳動物の凍結卵を失うリスクは未だ低減していないため、冷蔵もしくは室温保存が可能な卵保存法の候補として卵凍結乾燥法の確立が望まれる。

2. 研究の目的

本研究は、凍結乾燥後に再加水した哺乳類卵をリバイブさせることが極めて困難であることから、凍結乾燥卵をそのまま受精のホストとして使用するのではなく、雌性ゲノムのドナーとして使用できるかどうかを検討することを目的とした。始めに、マウスの二次卵母細胞から紡錘体と細胞質を少量含む「ミニ卵」を顕微操作技術により作製し、凍結乾燥・再加水後に除核卵に注入するための簡単な方法を確立する。そして、凍結乾燥操作そのものが、二次卵母細胞の染色体にダメージを誘発するかどうかを調べるため、凍結乾燥ミニ卵を新鮮な除核卵に注入後、卵を活性化させて第一卵割中期で染色体分析を行い、その結果から、ミニ卵の凍結乾燥法が冷蔵または室温条件下で保存可能な新しい卵保存法になりえるかどうかを考察する。

3. 研究の方法

雌マウス (B6D2F1, ICR) に、妊馬血清性およびヒト絨毛性ゴナドトロピンをそれぞれ 48 h と 15-17 h 投与後、卵管から二次卵母細胞を採取して実験に使用した。ミニ卵 (紡錘体+細胞質) は顕微授精法で使用される「ホールディングピペット」を用い、吸引・カットして作製した (図 1、1-4)。Na⁺フリーで、K⁺を含む EGTA 溶液 (K ETBS)¹⁾ に γ トコトリエノール (GT3) とミニ卵を加え、3 日間まで冷蔵した後、凍結乾燥した (図 1、5)。水で戻したミニ卵を除核卵に注入し (図 1、6 と 7)、1 h 後に 10 mM SrCl₂ で単為発生を開始させて第二極体と前核形成の観察 (図 1、8) および第一卵割中期における染色体分析を行った。染色体数が 20 本で、構造異常をもたない単為発生卵の数を調べた。コントロール実験群では、新鮮なミニ卵を除核卵へ融合もしくは注入した再構築卵を用いた。

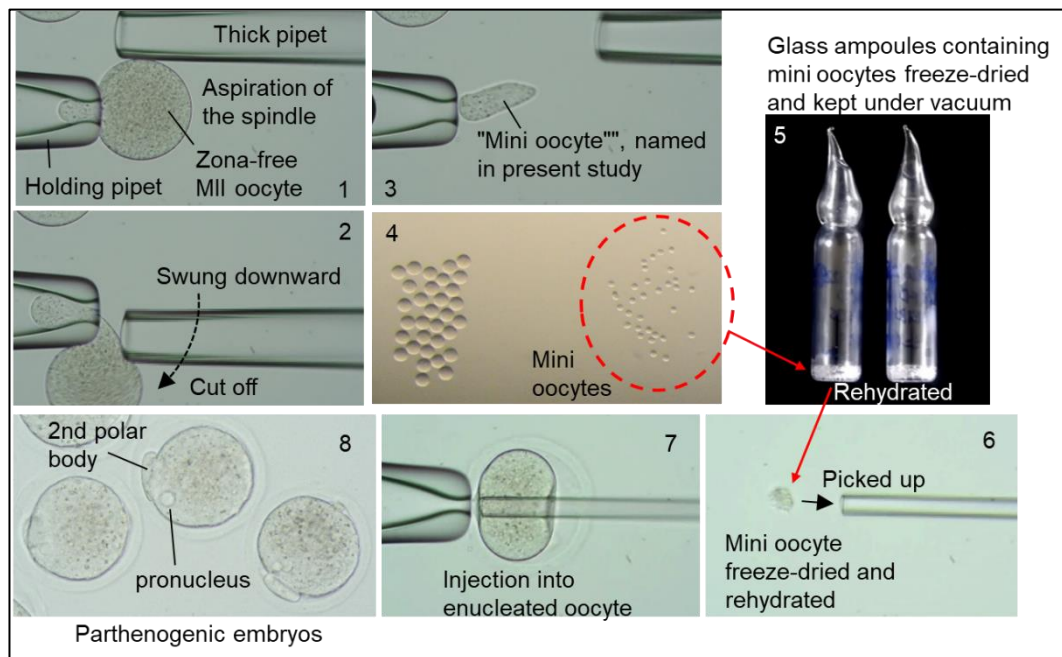


図 1 ミニ卵作製方法の確立と凍結乾燥ミニ卵の除核卵への注入

4. 研究成果

凍結乾燥ミニ卵由来の再構築卵では、どの実験群も第一卵割中期までの発生成績はほぼ同程度であった(表)。ミニ卵のK ETBS へのインキュベーション時間が短いと(0-4 h)、染色体ダメージのレベルが最も大きくなった(正常率0%、図2と3)。正常な染色体構成をもつ再構築卵を得るためにはミニ卵のGT3処理が有効であり、処理時間が8時間から3日間までの場合は22~34%の再構築卵が正常な染色体構成を示していた(図3)。以上のことから本研究において、マウスの凍結乾燥卵は間接的にはあるがリバイブしうるということが明らかとなった。抗酸化作用をもつGT3が、どのような仕組みで凍結乾燥ミニ卵の染色体異常を抑えるのかは不明であるが、GT3の前処理によって水で戻した後の凍結乾燥ミニ卵は柔らかくなり、顕微操作が容易となる。また、データには示していないが、耐乾燥剤としてよく知られているトレハロースを用いると逆に固くなり、顕微操作に適さないことを確認している。さらに今回、凍結乾燥ミニ卵に誘発される染色体異常が、凍結乾燥操作それ自体によるものなのか、それともピペットによる機械的ダメージによるものなのかを調べるため、新鮮なミニ卵を除核卵に細胞融合、もしくは注入して再構築卵を作製した。それらの再構築卵を活性化させて第一卵割中期で染色体分析を行った結果、ピペットを用いた注入による機械的ダメージが、染色体ダメージの原因であることが示唆された(図3)。今後は、凍結乾燥ミニ卵の低い回収率(29~53%、表)をよりアップさせるための工夫を検討しつつ、注入法による機械的ダメージを抑制する方法を開発し、凍結乾燥ミニ卵由来の個体作出を試みる。

文献:¹⁾Kusakabe H and Tateno H, Prevention of high-temperature-induced chromosome damage in mouse spermatozoa freeze-dried using Ca²⁺ chelator-containing buffer alkalized with NaOH or KOH, *Cryobiology*, 79:71-77, 2017.

表
ミニ卵の作製、凍結乾燥、回収と、凍結乾燥ミニ卵が注入された再構築卵の活性化と第一卵割中期までの発生

ミニ卵 Mini oocytes	Pre-freeze-drying ¹⁾ incubation of mini oocytes (凍結乾燥前の ミニ卵のGT3処理)		No. of freeze-dried samples stored at 4°C and used (使用した凍 結乾燥サン ブルの本数)	No. of mini oocytes freeze-dried (凍結乾燥した ミニ卵の数)	No. (%) of mini oocytes freeze-dried and collected after rehydration (水で戻し、回収 できた凍結乾燥 ミニ卵の数)	No. (%) of reconstructed oocytes survived after SrCl ₂ exposure (SrCl ₂ 処理後に 生き残った 再構築卵の数)	No. (%) of ²⁾ reconstructed oocytes activated normally (正常に活性化 した再構築卵 の数)	No. (%) of ³⁾ parthenogenetic embryos at the 1st cleavage metaphase (第一卵割中期に 到達した単為発 生胚の数)
	GT3 (μM)	Incubation time						
Fresh ⁴⁾	-	-	-	-	-	44	43 (98)	43(100)
Fresh ⁵⁾	-	-	-	-	-	42	25 (60)	25(100)
Freeze-dried	0	3 to 7 d	8	270	123 (46)	54	44 (81)	30(68)
Freeze-dried	20	0 to 4 h	4	153	81 (53)	43	29 (67)	24(83)
Freeze-dried	20	8 h to 1 d	12	409	153 (37)	88	54 (61)	43(80)
Freeze-dried	20	2 to 3 d	6	230	67 (29)	37	30 (81)	23(77)

¹⁾ Before freeze-drying, mini oocytes were incubated in K ETBS (50 mM EGTA+100 mM Tris-HCl, pH 7.7-7.9, alkalized using KOH) with, or without γ-tocotrienol (GT3).

²⁾ Reconstructed oocytes with 1 second polar body and 1 pronucleus were considered normally activated.

³⁾ Pronucleus-dissappeared embryos were regarded as those reached to the first cleavage metaphase.

⁴⁾ Mini oocytes were fused with enucleated oocytes by HVJ-E (GenomONE-CF®, Ishihara-sangyo, Co.).

⁵⁾ Mini oocytes were injected into enucleated oocytes.

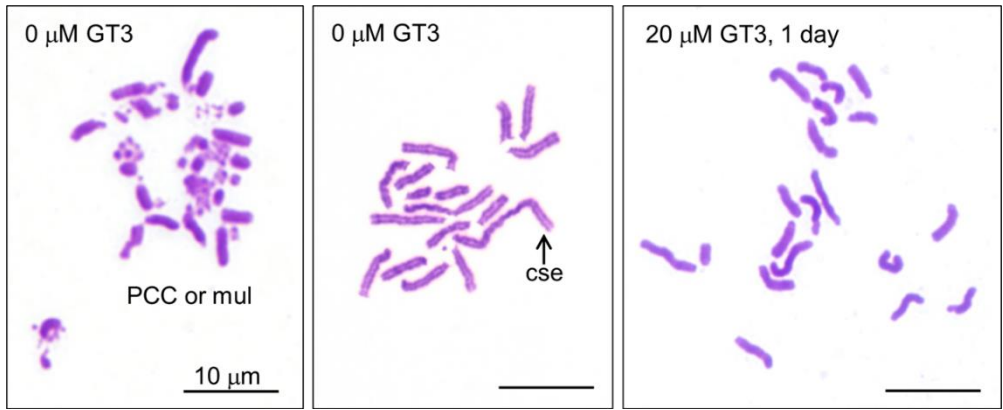


図2 凍結乾燥ミニ卵が注入された再構築卵の活性化後の第一卵割中期における染色体像
 GT3: gamma tocotrienol、PCC: premature chromosome condensation、mul: multiple aberrations、cse: chromosome exchange

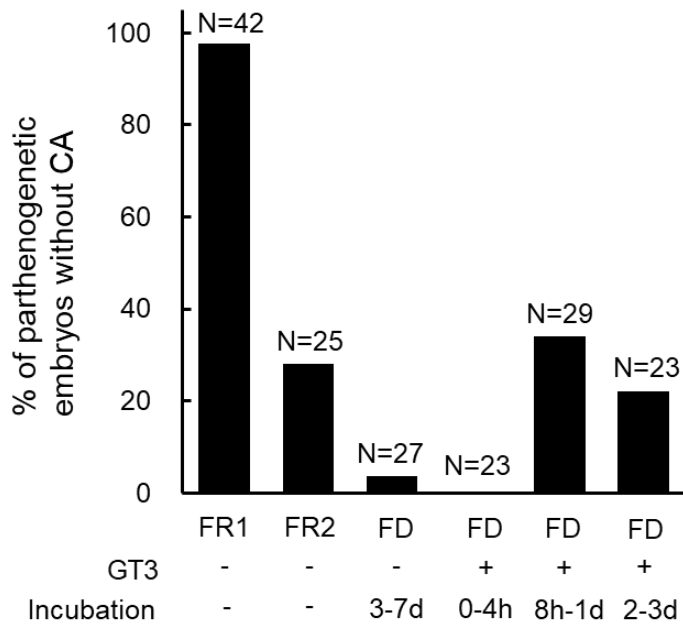


図3 凍結乾燥ミニ卵が注入された再構築卵の第一卵割中期における染色体分析結果
 FR: 新鮮なミニ卵、FD: 凍結乾燥ミニ卵、GT3: γ トコトリエノール処理 (20 μ M)、
 Incubation: 凍結乾燥前の K ETBS 処理時間 (4 $^{\circ}$ C)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshiaki Hino, Hirokazu Kusakabe	4. 巻 12
2. 論文標題 A reliable technique for karyotyping mouse oocytes prepared by a gradual fixation/air-drying method followed by multicolor FISH	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 1, 5 (bio060188)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.060188	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日下部博一
2. 発表標題 マウス凍結乾燥ミニ卵の トコトリエノール処理による染色体ダメージの軽減
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------