

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25640121

研究課題名(和文) フリーズドライ技術による哺乳類体細胞の常温長期保存に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic reserch of long term preservation at room temperature for mammalian somatic cells by freeze drying

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新しい哺乳動物体細胞の保存技術として凍結乾燥に着目し、基礎的研究を実施した。凍結乾燥前と比較して凍結乾燥後のウシ線維芽細胞では、タンパク質および $\gamma$ -チューブリン数が減少した。さらに、凍結乾燥後の細胞にはミトコンドリア膜電位が認められなかった。細胞培養中のトレハロースおよびエピガロカテキンガレート(EGCG)の添加は、細胞膜および細胞小器官の保護に対して効果がないと考えられた。しかし、トレハロースおよびEGCG添加によってFD後、ガラス転移点よりも高い温度で保存しても核の損傷が抑制され、室温での保存の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research carried out basic study as preservation technique of a new mammalian somatic cells by freeze-drying. In bovine fibroblast cells, total amount of protein and the number of gamma-tubulin decreased after freeze-drying. Furthermore, mitochondrial membrane potential was not observed in the cell after freeze-drying. It was thought that addition of trehalose and epigallocatechin gallate (EGCG) in a cell culture medium was ineffective to protection of a cell membrane and organelle. However, when temperature higher than a glass transition point after FD, trehalose and EGCG could prevent damage in nuclear DNA. These result suggested that freeze-dried somatic cells has the possibility of preservation at room temperature by trehalose and EGCG.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：生物資源保全学・生物資源保全学

キーワード：凍結乾燥 哺乳類体細胞 遺伝資源保存

## 1. 研究開始当初の背景

近年、哺乳動物体細胞は生物資源としての重要性を増し、医療、農学分野等では必要不可欠なものである。それらの保存には、-80の超低温フリーザーあるいは液体窒素が使用され、適切な保存液中で細胞を“生かしたまま”凍結保存することが可能である。しかし、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という事態が発生した。また、今後発生が予想される南海トラフの巨大地震等の災害に備えるためにも、損失を未然に防ぐ新たな細胞保存技術の開発が望まれている。

凍結乾燥(フリーズドライ: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。実験動物においてはFD精子の顕微授精による産子生産が報告され(Wakayama and Yanagimachi, 1998、Liu *et al.*, 2004、Hirabayashi *et al.*, 2005)、最近では4で5年間保存したラットFD精子を用いて産子の作出に成功している(Kaneko and Serikawa, 2012)。

一方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クローン胚を作出した(Loi *et al.*, 2008)。さらに、平成22年度から4年間の予定で科研費若手研究(A)に採択され、FDと核移植による個体再生技術の開発を行っている。この研究によって既にウシ核移植胚盤胞を作出することに成功し、現在、FD体細胞由来クローン産子の誕生に向けて胚移植試験を計画しているところである。我々が調整したFD細胞は、細胞膜が損傷し、走査型電子顕微鏡による観察でも細胞表面に大きな変性が認められた。ところが、DNA損傷は回避され、ヒツジ(Loi *et al.*, 2008)、マウス(Ono *et al.*, 2008)、ブタ(Das *et al.*, 2010)と同様にウシでも核移植後に胚盤胞期胚まで発生した。これらの知見から、細胞機能の保護を重視してFD処理を施せば、哺乳動物体細胞においても常温での長期保存が可能になるのではと考えた。

## 2. 研究の目的

災害や事故等による貴重な哺乳動物体細胞サンプルの損失を防ぐため、従来の凍結保存に代わる新たな保存法の開発が望まれている。乾燥(無代謝)状態から水を加えることで生命活動を再開するようなFD保存が哺乳動物体細胞にも適用できれば、常温での長期保存も可能になると考えられるが、その成否は明らかではない。

本研究では、ウシ由来の体細胞を供試し、細胞内・外からの細胞機能の保護に焦点を絞った処理によって、FDによる哺乳動物体細胞の常温保存が可能かどうかを検討した。FD後は、細胞の生化学的分析、およびガラス転移点等の物性解析を行い、新たな哺乳動物体細胞保存技術を開発するための萌芽的研究を行った。

## 3. 研究の方法

ウシ線維芽細胞を200  $\mu$ lあるいは500  $\mu$ lの凍結乾燥液に浮遊させ凍結乾燥した。細胞の凍結乾燥前後のタンパク質量、 $\alpha$ -チューブリン数およびミトコンドリア膜電位は、それぞれSDS電気泳動、蛍光免疫染色、およびJC-1染色によって計測した。核移植には凍結乾燥後-30で1週間および1ヶ月間保存した細胞を供試し、ウシ除核未受精卵に注入した。核移植胚は38.5、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>の気相下で8日間培養し、卵割率および胚盤胞発生率を検討した。

さらに、ウシ線維芽細胞を供試し、10% FCS添加DMEM培地に0.2Mトレハロースおよび10 $\mu$ M EGCGを添加した区(以下、ET)、トレハロースを添加した区(以下、T)、および無添加区(コントロール区;以下、C)でそれぞれ培養した。FD直後、-30、4および室温で1週間保存した後に、DNA損傷細胞数をアルカリコメットアッセイ法によって計測した。また、FD前後のETおよびCの細胞内部構造を走査型および透過型電子顕微鏡によって観察した。さらに、非晶質物質の安定性を評価するために、FD後の細胞を含む乾燥物のガラス転移点を示差走査熱量分析によって測定した。

## 4. 研究成果

凍結乾燥前と比較して凍結乾燥後のウシ

線維芽細胞では、タンパク質および  $\alpha$ -チューブリン数が減少した。さらに、凍結乾燥後の細胞にはミトコンドリア膜電位が認められなかった。1週間および1ヶ月間保存した凍結乾燥細胞を核移植したときの卵割率はそれぞれ50%および50%、胚盤胞発生率はそれぞれ28%および16%であった。

ET、TおよびCにおけるDNA損傷細胞の割合は、FD直後ではそれぞれ、8.7%、6.7%および2.5%であった。 $-30^{\circ}\text{C}$ 保存では、それぞれ5.5%、6.5%および13.0%であった。 $4^{\circ}\text{C}$ 保存では、それぞれ13.3%、16.7%および16.5%であった。一方、室温で保存した場合、それぞれ44.0%、97.5%および100%となり、ETと他の区との間に有意な差が認められた ( $P < 0.05$ ) (図1)。

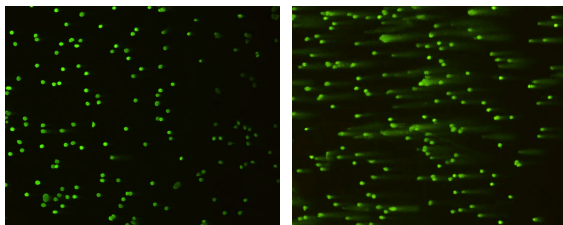


図1：コメットアッセイ像（左：ET区、右：E区）

FD後、細胞膜の損傷、ミトコンドリアの収縮等が認められたが、核膜および核の形態は正常であった(図2、3)。ETおよびCにおけるガラス転移点は、FD直後では $-29.1^{\circ}\text{C}$  および $-37.8^{\circ}\text{C}$ 、室温保存では $-9.4^{\circ}\text{C}$  および $-9.9^{\circ}\text{C}$  となった。以上の結果より、細胞培養中のトレハロースおよびEGCG添加は、細胞膜および細胞小器官の保護に対して効果がないと考えられた。しかし、トレハロースおよびEGCG添加によってFD後、ガラス転移点よりも高い温度で保存しても核の損傷が抑制され、室温での保存の可能性が示唆された。

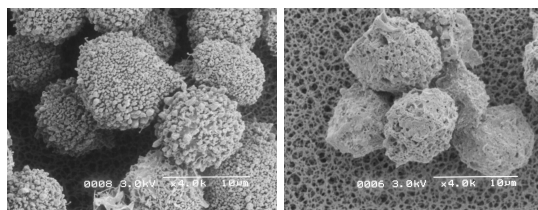


図2：走査型電子顕微鏡像（左：培養細胞、右：凍結乾燥細胞）

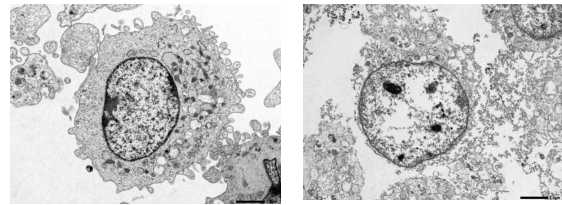


図3：透過型電子顕微鏡像（左：培養細胞、右：ETを添加し、凍結乾燥後室温で1週間保存した細胞）

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 細川真美、段家春香、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 リン酸の体外成熟培地への添加はウシ体外受精胚の発生能を向上させる．第 118 回日本畜産学会大会、2014 年 3 月 26～29 日、つくば市．
2. 郡七海、松川和嗣．凍結乾燥後のウシ線維芽細胞はゲノム DNA を維持している．第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 19～21 日、名古屋市．

〔図書〕(計 0 件)

〔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：