

令和元年6月13日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26430207

研究課題名(和文) iPS細胞を含む生殖機能細胞のエネルギーフリー長期室温保存に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the vacuum-drying of mouse preimplantation embryos, ES cells and iPS cells

研究代表者

多田 昇弘 (Tada, Norihiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授

研究者番号：50338315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス受精卵などの新規な真空乾燥・室温保存法を開発することを目的として、本研究を行った。種々の濃度のトレハロースを含む保存液で胚を真空乾燥後、48時間室温保存を行い、復水後、低率ではあるが、生存胚が確認されたが保存72時間では、胚はすべて死滅した。また、CRISPR/Cas9システムでトレハローストランスポーターを発現するノックインマウスを作製した。このマウスの胚を真空乾燥・室温保存し、生存性を確認する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵子、受精卵、初期胚、ES細胞及びiPS細胞のような生殖機能細胞は、いずれも、真空乾燥・室温保存の成功例は、まったく認められないので、極めて独創的であり、各細胞腫の核のみならず、細胞質及び細胞膜等の乾燥に対する耐性機構が明らかになるので、学術的な意義は大きい。また、現在、生殖機能細胞の保存は、すべて凍結保存であるが、本研究で、真空乾燥・室温保存の有効性を明らかにできれば、この技術を各種のバンクへ適用すると共に、野生動物の絶滅危惧種の生殖機能細胞を室温保存することによって、遺伝資源の開発・保全に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined for the purpose of development of novel technique on vacuum drying-room temperature preservation in mouse preimplantation stage embryos. Mouse embryos were vacuum-dried with stock solution containing various concentration of trehalose and preserved at room temperature for 48 h. After rehydration, the efficiency of survived embryos were very low when none of embryos vacuum-dried and preserved at room temperature for 72 h were survived. In addition, knockin (KI) mice inserted trehalose transporter gene into safe harbor region of ROSA26 gene locus were generated by CRISPR/Cas9 system. Preimplantation stage embryos from trehalose transporter-KI mice will be vacuum dried and preserved at room temperature for confirming their survivability after rehydration.

研究分野：発生工学、実験動物学、資源保全学

キーワード：マウス 初期胚 ES細胞 iPS細胞 真空乾燥 室温保存 トレハロース CRISPR/Cas9

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

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代が到来し、遺伝子の機能解明及びヒト疾患モデルとして遺伝子改変マウス(トランスジェニック/ノックアウトマウス)の作製やゲノム編集技術(CRISPR/Cas9等)を用いたノックアウト/ノックインマウスの作製が飛躍的に増加している。それに伴って、これらのマウスの系統(ラインと呼ばれている)を精子及び初期胚で凍結保存することも盛んに行われて来ており、いくつかの研究機関では、既に、精子・胚バンクが置かれている。また、再生医学への適用が注目されているES細胞及びiPS細胞の樹立も増加の一途を辿っている。特に、iPS細胞は、難治性疾患患者の体細胞由来のiPS細胞の樹立が本格的に着手されており、iPS細胞バンクの構想も現実的になってきた。

生殖機能細胞(精子、卵子、初期胚、ES細胞、iPS細胞)の保存は、有用な遺伝子資源としての種(系統)の保存を目的として、1950年台から1970年台にかけて精子及び初期胚について低温保存が試みられてきた。特に、1970年台に哺乳類初期胚の凍結保存が成功して以来、凍結保存が多くの動物種及び系統で試みられ、遺伝子資源として多くの生殖機能細胞が保存されている。しかし、哺乳類の精子及び初期胚の凍結保存は、液体窒素中で保存されるため、特別な保存タンクが必要であり、定期的に液体窒素を補充する必要があるため、管理が煩雑である。また、液体窒素を自動的に補充するシステムはあるが、停電時及び電源事情の悪い低開発地域では、液体窒素の自動供給ができないので、凍結保存は不可能である。また、地震等により、突発的な停電による液体窒素の供給の停止及び保存タンクの破損により、貴重な細胞が失われる可能性がある。更に、液体窒素で保存した状態での精子や初期胚の輸送は、厳しい規制があり、輸送が困難になる場合がある。そのため、液体窒素を用いないで保存できる方法の開発が急務といえる。そこで、常温(室温)で長期間保存できるシステムが確立できれば、保存タンクが不要で、保存スペースを大幅に減らすのみならず、液体窒素及び電気等のエネルギーを必要とせず、しかも、常温下で、宅配便のような形で、容易に輸送することができる。

2001年、Wakayamaらは、マウス精子の凍結乾燥(フリーズドライ)の成功により、液体窒素を使用しないで、低温(-4℃)下で保存できることを明らかにした。しかし、常温保存下での長期保存では、精子細胞核のDNA変性が生じ、産仔は得られていない。我々も、2011年より、液体窒素での保存を必要としない、所謂、室温保存を真空乾燥させたマウス精子で試みることによって、室温下での長期保存、あるいは室温下での輸送が可能になるような方法の開発を行っている。その結果、トレハロースに抗酸化作用のあるエピカテキン(緑茶由来ポリフェノール)及びアスパラギン酸を加えたTris-EGTA緩衝液内でマウス精子を真空乾燥させた後、室温下で2.5年間保存した精子を用いて顕微授精することにより、受精卵が得られ、正常な個体へと発生させることに成功した。また、2009年、イスラエルのAmir Aravらは、ヒト造血幹細胞を凍結乾燥後、低温(2~8℃)下で1週間保存した後、復水させ、培養により、コロニー形成を認めたことを報告した。更に、Aravらにより、2013年に、ウシ卵子の凍結乾燥を行い、室温保存した後、復水させたところ、受精可能な卵子が認められたとの報告があったが、今のところ、このような凍結乾燥卵子を用いて受精及び産仔作出の報告はない。また、凍結乾燥法及び真空乾燥法等で処理した初期胚などの生殖機能細胞を常温保存して、生存性や個体への発生を検討した報告は認められない。

## 2. 研究の目的

前述したように、精子、卵子、初期胚、ES細胞及びiPS細胞のような生殖機能細胞は、貴重な遺伝子資源であり、これら細胞の保存は、現在、液体窒素を用いた凍結保存法により成されている。しかし、本法は、液体窒素などのエネルギーが必要であり、非常時には、補給困難になり、貴重な細胞が失われる可能性がある。そこで、これらの生殖機能細胞をエネルギーフリーで保存できる新規な真空乾燥・室温保存法を開発することを目的として、本研究を実施する。保存法の開発は、以前より実施しているマウス精子の真空乾燥・室温保存法に基づいて進めて行くが、最終的には、1年間以上の室温保存でも、正常性(全能性、多能性)を維持し、これらの生殖機能細胞由来の産仔を得ることを目指す。本研究で、本法が確立できれば、遺伝子資源の開発・保全に極めて有用な手段となり得る。

精子の場合、核内DNAのみを損傷させずに真空乾燥させ、変性(酸化)を防いで、室温保存できるかが重要なポイントである。即ち、精子の頭部はほとんど核であり、細胞質がまったくないため、核内のDNAが無傷であれば、精子が生存していなくても、受精能及び発生能を有すると推測される。しかし、卵子、初期胚(受精卵)、ES細胞及びiPS細胞では、核の周囲に細胞質が存在しており、精子細胞の構造とは大きく異なる。従って、本研究の目的を達成するためには、核内のDNAのみならず、細胞質内の細胞小器官(ライソゾーム、ミトコンドリア、小胞体等)、アクチンフィラメント及びマイクロチューブのような細胞骨格構造及び細胞膜の変性・破壊を抑制し得る方法を開発しなければならない。これらの細胞小器官は、適正な凍結保存であれば、変性・破壊を起こすことなく、正常性が維持可能である。特に、最近、注目されているガラス化保存は、高濃度の凍害保護物質(DMSO、アセトアミド、ポリプレングリコール、スクロース等)に胚を浸漬した後、瞬時に-196℃まで冷却させる方法で、氷の結晶が形成できず、物理的にガラス化(固化)状態になる。このガラス化保存で保存された初期胚は、かなり高い生存性を示す。二糖類のトレハロースは、完全な脱水状態において細胞膜や蛋白質の表面に水素結合して、結合水の代わりになること、及び脱水に伴い、流動性を失いガラス化

し、細胞膜及び蛋白質は、高次構造のまま保護していることが知られている。従って、トレハロースの乾燥時のガラス化が保存時の細胞にどのような効果があるのか、その有効性が期待できる。

### 3. 研究の方法

アフリカの半乾燥地帯に生息するネムリユスリカの幼虫は、完全に乾燥して代謝が停止する現象である乾燥無代謝休眠状態（クリプトビオシス；Cryptobiosis）になり、水を吸収すると代謝が復活することが知られている。休眠状態の幼虫の体内には、トレハロースが蓄積されており、乾燥時の生命維持に何らかの役割を果たしていることが推測されている。本研究では、(1) 種々の濃度のトレハロースを含む Tris-EGTA(TE)あるいは PB1, M2, TE 及び mCZB-hepes 単独あるいは 0.1M トレハロースを含む保存液に BDF1 マウスより得た 2-細胞期胚あるいは桑実期胚を浸漬し、4~24 時間室温下にてデシケーター内で真空乾燥した後、室温保存した。保存後、滅菌ミリ Q 水、M2, 0.3M スクロース液あるいは、0.1M トレハロース/TE のいずれかを保存液中に添加した。その後、胚を回収した後、培養することで胚の生存性及び発生能を確認した。次いで、(2) トレハロースの桑実期胚の室温保存における乾燥に対する保護効果を確認するために、0.1M, 0.5M, 1.0M 及び 1.5M トレハロースを含む PB1, M2, TE 及び mCZB-hepes を用いて桑実期胚の常圧下での室温液状保存及び真空乾燥・室温保存を行った。また、同様の保存液を用いてマウス ES 細胞 (E14TG2a) の室温保存も試みた。その後、72 時間、室温保存した胚は、室温下にて PB1, M2, TE 及び mCZB-hepes を加えることにより保存液を希釈した後、洗浄し、24 時間の培養を行うことにより、胚盤胞への発生率を確認した。また、ES 細胞は、48 時間の室温保存後、ES 培養液にて 1 週間培養することにより、増殖能及びコロニー形成能を確認した。

(3) 桑実期胚を真空乾燥する際の抗酸化剤の効果を確認するために、0.1~1.0M トレハロースを含む Tris-EGTA 液に 100~200  $\mu$ M のエピカテキン、アスコルビン酸、30%デキストラン 40 あるいは 12.5%ウシ血清アルブミンを加えた保存液を用いた桑実期胚の真空乾燥を試みた。

(4) トレハロースを初期胚、ES 細胞及び iPS 細胞の細胞内に取り込ませる方法を検討し、取り込み後の細胞について真空乾燥・室温保存を試み、復水後の生存性及び発生能を確認した。具体的には、トレハロースを特異的に輸送するトランスポーターであるネムリユスリカ由来のトレハローストランスポーター1 (Tret1) 遺伝子をゲノム編集の技術 (CRISPR/Cas9 システム) を用いてマウス受精卵のセーフハーバー遺伝子領域 (ROSA26 遺伝子座) に挿入 (ノックイン) した。即ち、マウス受精卵の細胞質に ROSA26 遺伝子座のセーフハーバー領域の PAM (protospacer adjacent motif) 配列を特異的に認識するガイド RNA (sgRNA)、その PAM 配列を認識して特異的に結合した sgRNA の近傍の遺伝子配列を切断する核酸分解酵素 (Cas9 エンドヌクレアーゼ) 及びドナー DNA (LHA-CAG-Tret1-IRES-EGFP-RHA) を顕微注入した後、これらの受精卵を移植して当該遺伝子を発現するマウス (Tret1 ノックインマウス) を得た。CRISPR/Cas9 システムによるドナー DNA の挿入 (ノックイン) の機序は、Cas9 で切断された塩基配列の両側と相同の配列 (左側相同領域; LHA、右側相同領域; RHA) との間で相同組換え (HDR) が起こり、切断された部位にドナー DNA (CAG-Tret1-IRES-EGFP) が挿入 (ノックイン) されることになる。なお、ROSA26 遺伝子座のセーフハーバー領域は、挿入された外来の遺伝子が、挿入部位の影響を受けることなく、安定した遺伝子の発現が期待できる。Tret1 ノックインマウス由来の初期胚は、細胞膜で Tret1 蛋白質をつくり、培養液に含まれるトレハロースを細胞内へ効率良く取り込むことが期待される。また、ES 細胞及び iPS 細胞については、電気的に細胞膜に孔を開ける方法 (電気穿孔法; エレクトロポレーション) により Tret1 遺伝子を導入し、導入された細胞について真空乾燥・室温保存を行い、復水後の生存性を確認した。一方、電気穿孔法により初期胚の細胞膜に孔を開け、緩衝液中のトレハロースを細胞内に取り込ませた後、真空乾燥・室温保存を行い、保存後の生存性及び発生能を確認した。

### 4. 研究成果

(1) 2-細胞期胚を用いた保存では、0.1M, 0.5M, 1.0M 及び 0.5M トレハロース/TE にて各々 4~24 時間室温下で真空乾燥・保存後、回収されたすべての胚で発生は認められなかった。これらの胚は、いずれも細胞膜及び透明帯の破壊、細胞の萎縮等の形態的な異常が認められた。また、PB1, M2, TE 及び mCZB-hepes 単独あるいは 0.1M トレハロースを含む保存液で真空乾燥・室温保存した 2-細胞期胚も保存期間にかかわらず、すべての胚が同様に死滅していた。更に、保存後、滅菌ミリ Q 水、M2, 0.3M スクロース液あるいは、0.1M トレハロース/TE のいずれかを保存液中に添加して復水を試みたが、いずれの復水液も、まったく効果がなく、胚はすべて死滅した。一方、桑実期胚を用いた保存では、0.1M トレハロース/TE 中にて胚を 4, 6 及び 24 時間保存後、0.3M スクロース等を添加し、回収したところ、各々 23~43%, 31~50% 及び 0% が胚盤胞に発生した。次いで、PB1, M2, TE 及び mCZB-hepes で桑実期胚を室温下にて 4, 6, 24 及び 48 時間保存し、胚を回収した後、培養したところ、各々 90~100%, 78~89%, 62~77% 及び 17~33% が胚盤胞に発生した。更に、これらの保存液に 0.1M トレハロースを含む保存液にて桑実期胚を室温下で 6, 24 及び 48 時間保存し、胚を回収した後、培養したところ、各々 80~100%, 43~86%, 20~38% が胚盤胞に発生した。以上の結果から、室温保存する場合、2-細胞期胚より桑実期胚の方が、保存性が良好なことから、桑実期胚は 48 時間の室温保存でも生存し、胚盤胞に発生すること、並びに胚の室温保存におけるトレハロースの保護効果は、認められないことがわかった。また、

真空乾燥し、48 時間室温保存した桑実期胚は、完全な乾燥状態ではなく、ある程度の水分が保存液中に含まれており、低率ながら生存しているものと思われる。一方、72 時間室温保存した真空乾燥胚では、保存液中の水分含量がかなり低下しており、ほぼ完全な乾燥状態であると推測される。

(2) 各濃度のトレハロースを含む保存液で、桑実期胚を室温下で、48 時間、液状保存したところ、いずれの濃度でも生存胚が認められた(10~30%)が、トレハロースの濃度による差は認められなかった。一方、各濃度のトレハロースを含む保存液を用いて桑実期胚を真空乾燥後、72 時間、室温保存したところ、復水後、前述したような形態的な異常を呈し、生存胚を得ることができなかった。また、ES 細胞を 48 時間、室温で液状保存した後、ES 培養液にて培養したところ、増殖し、コロニー形成が認められたが、真空乾燥後では、生存している細胞は認められなかった。このことから、真空乾燥した桑実期胚は、室温保存期間の限界が 48 時間であること、ES 細胞は、室温下での保存で、液状保存では、保存後、生存しているが、真空乾燥させると生存しないことが明らかになった。この 48 時間の限界は、真空乾燥における水分含有量に依存しており、保存 72 時間では、水分含有量が低いことが考えられる。また、これらの保存条件下でも、トレハロースの保護効果が認められないことがわかった。

(3) エピカテキン等の抗酸化剤の真空乾燥・室温保存(72 時間)における効果を桑実期胚について確認したが、保存後の胚は、すべて形態的に変性しており、生存は確認できなかった。これらのことから、抗酸化剤の真空乾燥・室温保存における胚への効果は、認められなかった。真空乾燥の場合、胚を含む保存液を入れたマイクロチューブをデシケーターに静置した後、真空状態にさせ、24 時間、室温下で乾燥させるが、その乾燥(水分含有量)の程度によって、その後の胚の生存性に影響を与える可能性がある。また、トレハロースは、真空乾燥によりガラス化を生じたが、胚及び ES 細胞の顕著な萎縮及び細胞膜破壊が認められたことから、細胞内にトレハロースが浸透せず、脱水が不十分であり、細胞質及び細胞膜に何らかの障害(変性・破壊等)が生じたものと思われる。また、細胞内の核、細胞質及び細胞膜を真空乾燥から保護するためには、トレハロースを細胞内に取り込ませることが必要であると思われる、真空乾燥時に細胞内の水分子とトレハロースを置換させ、生体成分を保護し、乾燥による障害を防ぐことが可能かどうかを検討する必要がある。

(4) マウス受精卵(1-細胞期卵)の細胞質に sgRNA(ROSA26 セーフハーバー領域を認識)、Cas9 蛋白質及びドナー DNA (LHA-CAG-Tret1-IRES-EGFP-RHA) を顕微注入した後、これらの注入された受精卵 150 個を偽妊娠 0.5 日目の受容雌マウスの卵管内に移植した。その後、生まれた 44 匹(29%)について離乳後、採取した尻尾より DNA を抽出し、PCR を行い、ドナー DNA が ROSA26 遺伝子座のセーフハーバー領域にノックインされている個体を同定した。その結果、3 匹(7%)のノックインマウスを得ることができた。現在、これらのマウスについて、シークエンス解析等、更に詳細な解析を行っているところである。また、ES 細胞及び iPS 細胞について、エレクトロポレーションにより sgRNA、Cas9 蛋白質及びドナー DNA の導入を試みているが、今のところ、EGFP の発現は認められていない(ドナー DNA には、EGFP 遺伝子がマーカーとして組み込まれており、ES 細胞などに導入されれば、EGFP が発現して緑色蛍光を発する)。エレクトロポレーションによる遺伝子導入に適したパルス及びバッファー等の条件を、再度、検討する必要がある。

エレクトロポレーションにより初期胚の細胞膜に孔を開け、トレハロースを細胞内に取り込ませるための条件を決めるため、rhodamine-dextran (3kDa) を用いてマウス 2-細胞期胚への導入実験を行っているが、エレクトロポレーション後の生存性が低下し、移植しても産仔を得ることができなかった。これらのことから、トレハローストランスポーターをノックインされたマウスを得ることができた。今後は、これらのマウスについて更に解析を進めると共に、子孫を得ることにより、導入した遺伝子が伝達されているかを確認する。その後、これらのノックインマウス由来の初期胚について、トレハロースを含む保存液で、真空乾燥・室温保存した場合の生存性及び発生能を確認する予定である。

本研究では、マウス初期胚、ES 細胞及び iPS 細胞の真空乾燥・室温保存方法の開発を目的として行ってきた。以前、我々が行って来たマウス精子の真空乾燥・室温保存に関する研究で得られた知見を初期胚等の保存に適用することを考えていたが、精子と比べ予想以上に難しいことがわかった。その理由として、前述したように、精子は頭部と尾部に分かれており、頭部は核だけで細胞質はほとんどないことが知られている。精子の真空乾燥・室温保存は、可能であり、2.5 年間、室温保存した精子から正常な産仔が得られており、これらの産仔の妊孕性も正常であることが確認されている。このことは、精子頭部の核が正常であれば、受精能を有し、正常な個体へと発生できることを示している。受精卵、初期胚、ES 細胞及び iPS 細胞は、精子とは異なり、細胞内に核と細胞質があるため、真空乾燥などの処理により、細胞質の障害、浸透圧による障害、細胞膜の変性・破壊が生じ、核が無傷であっても、細胞は死滅することになる(精子は死滅していても核が無傷であれば、受精能及び発生能は有している)。トレハロースの真空乾燥時における有効性が認められない原因として、初期胚や ES 細胞では、細胞質へのトレハロースの取り込みが困難で、水分子への置換及びガラス化の形成不全のため、復水後の細胞は死滅すると考えられる。従って、細胞内へトレハロースを取り込む手段として、トレハローストランスポーターを細胞膜で発現するノックインマウスを作製し、このマウス由来の初期胚を用いて、トレハロースの細胞内への取り込みの有無を確認すると共に、トレハロースを

細胞内へ取り込ませた初期胚及び ES 細胞等を用いて真空乾燥処理を行い、復水後の生存性及び発生能を確認する予定である。また、エレクトロポレーションにより初期胚の細胞へトレハロースを取り込むことが可能かどうかを確認した後、同様に真空乾燥処理を行い、生存性を確認する。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Ito Y, Kawano H, Kanai F, Nakamura E, Tada N, Takai S, Horie S, Arai H, Kobayashi T, Hino O: Establishment of *Tsc2*-deficient rat embryonic stem cells. International Journal of Oncology 46, 1944-1952, 2015.
- (2) Norihiro Tada, Fumio Kanai, Eri Nakamura, Hongmei Lu, Masahiro Sato: Syngenic grafting of a whole juvenile male gonadal tissue into the adult testes confers successful spermatogenesis in mice. Asian Pacific J of Reprod. 5(4), 279-286, 2016
- (3) Koji Nishihara, Takahiro Shiga, Eri Nakamura, Tomohiko Akiyama, Takashi Sasaki, Sadafumi Suzuki, Minoru S.H. Ko, Norihiro Tada, Hideyuki Okano, and Wado Akamatsu. Induced Pluripotent Stem Cells Reprogrammed with Three Inhibitors Show Accelerated Differentiation Potentials with High Levels of 2-Cell Stage Marker Expression. Stem Cell Reports, 12(2):305-318, 2019

### 〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 中村衣里、多田昇弘 : マウス精子における 3-O-methyl-D-glucose の真空乾燥・室温保存効果。日本実験動物科学技術さっぽろ 2014 (5 月、札幌、2014)
- (2) Tada N, Nakamura E: Mouse offspring resulting from intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa vacuum-dried and stored at room temperature. The Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations (AFLAS) Congress 2014 (Nov.10~12, Kuala Lumpur, Malaysia, 2014).
- (3) 中村衣里、多田昇弘 : CRISPR/Cas9 システムによるマウスゲノム編集。第 108 回日本繁殖生物学会大会 (9 月、宮崎、2015)

### 〔図書〕(計 1 件)

- (1) 多田昇弘 : 遺伝子改変型のモデルマウスの作製法、ゲノム編集によるノックアウト/ノックインマウスの作製、p.3~8、動物/疾患モデルの作製技術・病態解析・評価手法、技術情報協会、2017

### 〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

### (2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

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。