

【助成 41-09】

”生き返る”細胞の凍結乾燥保存技術の開発

山梨大学 発生工学研究センター 准教授 若山 清香

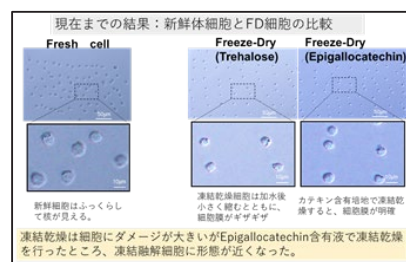
〔研究の概要〕

多くの国で遺伝子バンクが設立されているが、動物細胞の遺伝資源は現在液体窒素または、超低温冷凍庫での保存が必須である。しかし、凍結による保存は災害などの不測の事態が起きた場合、液体窒素や電力の安定的な供給ができず溶けて試料が損失するため、確実な保存方法とは言い難い。つまり、従来の動物資源の凍結保存方法では“サステナブルな遺伝資源保存”とは程遠いのが現状である。これらの問題を解決するために、簡便かつ低コストで、さらに電力供給がなくなっても確実に生物試料を長期に保存できる方法の開発が望まれている。そこで申請者は、培養細胞(体細胞や ES 細胞)をフリーズドライ化し、水を加えるだけで、再び培養可能となる全く新しい保存方法を開発することを最終目標として研究を行った。

〔研究経過および成果〕

私は今までに体細胞をフリーズドライ(FD)化し、その細胞からクローンを作成する研究を行ってきた(2022)。しかし、当時発表した実験では、凍結乾燥後細胞は加水後、細胞膜に障害が生じ、ふたたび培養しても、細胞分裂は起こらなかった。つまり、現在の手法では細胞としての増殖能を失っており、“死んでいる”状態であることが分かっている。(図1参照)。またFDからの産仔率は0.002%と非常に低い。クローン技術であれば、死んでしまった凍結乾燥細胞からも個体の作成は可能であるが、“生きた”細胞であれば新鮮細胞のように10倍以上成功率が高くなる。

一方、核移植では、受精と違い卵子に存在するMPF(M phase promoting factor)によって、体細胞由来の染色体はM期型になり、紡錘体を形成する。このことを核のリモデリングと呼んでおり、2022年の研究において、FD 体細胞のリモデリングが新鮮な体細胞と比較し約1時間ずれていることが観察された。そこで、この1時間のズレを新鮮体細胞に近づけることができれば、出産率向上につながり、最終的に FD 体細胞



の再培養
への道が
開けるの
ではない
かと考え、

本研究では様々な凍結保護材で作成したFD 体細胞核を除核しない MII 卵子に移植することで、核のリモデリングフェーズを追い、最適な防護材の探索に役立てることにした。

研究 1. 凍結乾燥に用いる基礎培地の決定

どの基礎培地(PBSとTris 培地)が凍結乾燥に適しているかを明らかにするために、リモデリングのタイミングとDNA 損傷度合いを新鮮体細胞と比較することで検証を行った。

PBSとTris 培地を用いて凍結乾燥した体細胞の核のリモデリング結果を図2bに示した。Tris区では2時間後からPCCが起こり始め、3時間後にはPCCが十分起こっているPhase 3も16.6%出現した。しかしながら、PBS区では注入から3時間経過してもPCCが見られなかった。

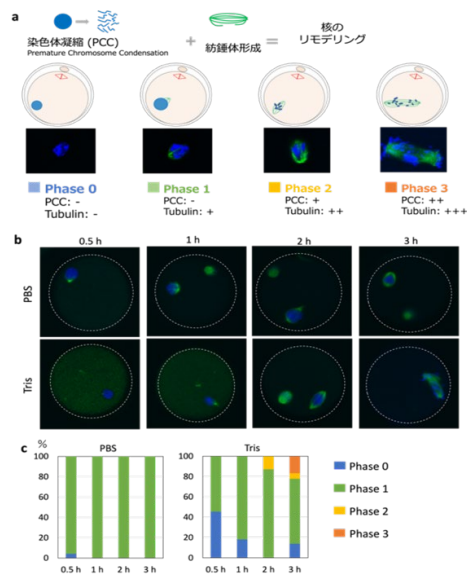


図2 PBSとTris培地を用いた凍結乾燥細胞の核のリモデリング比較

a 核のリモデリングの模式図と段階分け。b 核のリモデリングの観察写真。c 核のリモデリングのグループ分け結果。

次に、PBS、Tris 培地を用いた時の γ H2Ax の染色画像を図 3a に、定量結果を図 3b に示した。、PBS と Tris の輝度平均には統計的に有意な差があった。こ

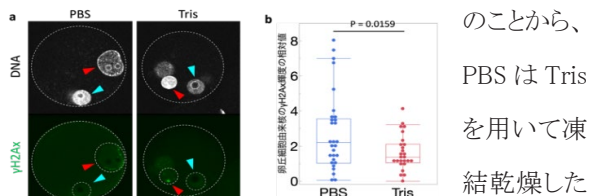


図3 PBSとTris培地を用いた凍結乾燥細胞の γ H2Ax 免疫染色

a 免疫染色写真。b γ H2Ax の輝度定量結果。

場合のものより核の DNA 損傷修復が多く行われていることがわかった。以上 2 つの実験結果より凍結体細胞の基礎培地には Tris を用いることが最適であると結論に至った。

研究2. 凍結乾燥時に用いる添加材の検討

研究1で決定した凍結乾燥に用いる基礎培地に添加剤を加え、凍結乾燥による核 DNA 損傷を低減するような添加材を探索した。

注入後 2 時間時点において、新鮮体細胞の区では 94.5%が Phase 3 に到達していたのに対し、凍結乾燥処理を行なった区では、グルタミン酸ナトリウム/Tris

で 51.5%、マンニトールで 43.5%、トレハロース/Tris で 33.2%、セリオキープで 39.4%が PCC を起こしていた。

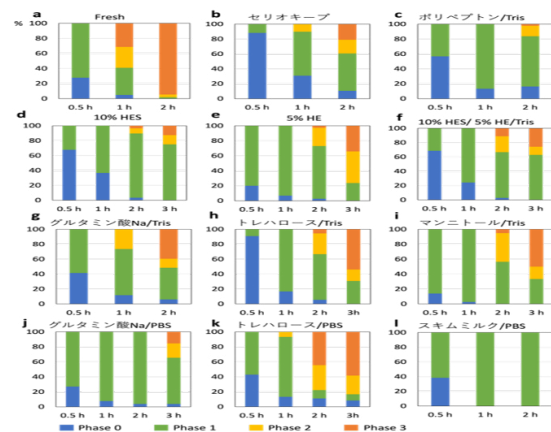


図4添加剤を加えたときの核のリモデリング

a Fresh, b セリオキープ, c ポリベプトン/Tris-EGTA, d HES/Tris-EGTA, e HE/Tris-EGTA, f HES/HE/Tris-EGTA, g グルタミン酸Na/Tris-EGTA, h トレハロース/Tris-EGTA, i マンニトール/Tris-EGTA, j グルタミン酸Na/PBS, k トレハロース/PBS, l スキムミルク/PBS.

これらの結果より、グルタミン酸ナトリウム、ヒドロキシエクトイン、トレハロース、マンニトールを用いたとき、リモデリングが新鮮体細胞の結果に近づくことが分かった。

まとめ

本研究助成期間において、体細胞の凍結乾燥時に用いる基礎培地は Tris が最適であることを見出すことができた。

しかしより良い保護材を見出せる可能性を示唆することができたものの、未だ新鮮体細胞のリモデリングにまで追いつくことはできていない。今後、乾燥後“生き返る”細胞を実現するためにはさらなる実験を重ねる必要があるだろう。

〔発表論文など〕

1. 凍結乾燥による体細胞核の DNA 損傷を低減する条件の探索（並木 愛 修論 20243 月 31 日）
2. 凍結乾燥で生じる体細胞核の DNA 損傷を抑える保護剤の検討(第 114 回日本繁殖生物学会 大会 2024 年 9 月)