

京都大学	博士（医 科 学）	氏 名	小 野 哲 男
論文題目	Novel preservation method of germ cells and somatic cells (新しい生殖細胞と体細胞の保存法の開発)		

(論文内容の要旨)

【目的】 遺伝子保全の観点から生殖細胞および体細胞の冷凍保存に関する研究は盛んにおこなわれてきたが、継続的な液体窒素の供給や高額な超低温冷凍庫などが必要である。そこでそれらの細胞を室温で長期間保存するための方法が開発され始めた。これまでに開発された哺乳類精子の凍結乾燥保存法は画期的な技術であり、室温保存の可能性を示しただけでなく輸送コストの削減も示された。しかし精子以外の細胞ではいまだ成功しておらず、また、室温で保存可能な期間は最長でわずか1ヶ月であることから、新規保存方法の開発が必要だと考えられていた。本研究では最初に体細胞の凍結乾燥保存を試み、保存後に核移植技術により遺伝子資源の維持が可能か調べた。一方、塩や糖類は食品を室温で長期間保存できることが知られており、実際に卵子および精子を高濃度の塩溶液で保存した実験が報告されている。そこで次に塩及び糖類を用いた精子および卵活性化因子の室温保存方法の開発を行った。

【方法】(体細胞保存) GFP-Tg マウスから回収した卵丘細胞、ES 細胞を用いトレハロース存在下あるいは非存在下で凍結乾燥し、真空状態で1日～1週間4℃で冷蔵保存した後、核移植実験に用いた。核移植方法は死滅細胞を扱えるよう溶液の最適化を試みた。作出したクローン胚は胚盤胞まで発生させた後、全てをntES細胞(核移植胚由来のES細胞)の樹立に使用した。樹立したntES細胞は、ICRマウスの受精卵由来4-8細胞期胚へ注入してキメラマウスを作製し、次世代にntES細胞由来すなわち凍結乾燥した体細胞の遺伝情報が伝わるか確認した。(精子保存) B6D2F1マウスの精巣上体を直接、NaClあるいはグルコース、ラフィノース粉末中で1日～1年室温で保存した。その後、洗浄・再水和させ精子を回収した。保存した精子は顕微授精技術により卵内へ注入し卵子活性化能力と発生能を調べた。

【結果】(体細胞保存) 凍結乾燥した細胞は、細胞膜が壊滅的に破壊され死滅していたが、卵子への核移植により1～4%がクローン胚盤胞まで発生した。次にこれらの胚からntES細胞の樹立を試みたところ、5株(23%)樹立することに成功した。これら全てのntES細胞はOct-3/4、Nanogの発現及びアルカリフォスファターゼ染色陽性であった。胚盤胞への発生率、ntES細胞の樹立率に対するトレハロースの効果は見られなかった。ntES細胞のキメラマウスへの寄与率は高く、それらのキメラマウスを交配した結果、毛色およびGFPの発現から凍結乾燥細胞由来の産仔が確認できた。(精子保存) 精子の卵活性化能力は、糖で保存した精子は7ヶ月までに失われてしまったが、塩で保存した精子は1年以上室温で保存しても維持されていた。しかし保存精子で受精した胚の発生能はコントロールよりも急激に低下し、わずか1日保存で出産率は1-7%となり、1週間保存では産仔を得ることができなかった。それらの胚の染色体解析を行った結果、2細胞期胚で、NaClでの保存で100%、グルコースでの保存で

88%の胚に染色体分離異常が起こっていたことから（新鮮精子では7%）、精子核のダメージが発生率低下の原因であると考えられた。

【総括】 以上の結果から、凍結乾燥で 4℃保存されていた死滅体細胞であっても核移植を行えば生きた細胞へ復活でき、その遺伝子を子孫に伝えられることが初めて明らかとなった。ほ乳類で凍結乾燥体細胞から子孫が得られたのは初めてである。また、精子核は高濃度の塩で保存するとダメージを受けてしまうが、卵活性化因子は1 年以上室温で保存できることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子資源保全は生殖細胞を液体窒素や超低温冷凍庫で保存する方法が主流であるが、生殖細胞が得られない場合、長期冷凍保存の維持費や安全面から、新しい保存方法開発が求められる。申請者は室温保存を最終目標とした新規保存法の研究を行った。

最初に高張液による室温保存を、核凝縮により保存しやすい精子について試み、マウス精子の卵子活性化因子は保存できたが、顕微授精による正常胚や産仔作出には成功しなかった。

次に精子で研究が進むフリーズドライ法を用いて体細胞の保存を試みた。核移植によって体細胞から産仔作出が可能となり遺伝子資源として利用できる。しかし凍結乾燥された体細胞から遺伝子資源保存に成功した報告はない。申請者は核移植方法を改良して、凍結乾燥後 4℃で保存したマウス体細胞の核移植による胚発生に成功した。胚盤胞発生率は新鮮体細胞に比べ低下したが ES 細胞株樹立に成功した。凍結乾燥時にトレハロースを加えることで成績を改善出来た。ES 細胞株の多能性マーカーや核型に異常は見られず、キメラマウスへの寄与率は高く、交配により ES 細胞由来の産仔が得られたので、遺伝子資源保全に利用可能なことが明らかとなった。

以上の研究は遺伝子資源の保全における新技術開発に貢献し、医学や実験動物学における有用動物系統の保存と維持に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成22年2月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。