

令和4年7月6日

国立大学法人山梨大学

フリーズドライ体細胞からクローンマウスの作出に成功 ー遺伝資源の究極の保存方法としてー

生物多様性の維持は人類の未来にとって不可欠です。そのため、すでにいくつかの動物種で精子や卵子の保存が始まっていますが、液体窒素を使う現在の方法では、震災等で液体窒素の補充ができなければ全て溶けて使えなくなってしまいます。山梨大学大学院総合研究部・発生工学研究センターの若山清香助教らの研究グループは、液体窒素を使わないで精子を保存する「凍結乾燥（フリーズドライ）」技術を開発してきましたが、精子は幼弱や高齢、あるいは不妊のオスから採取することはできません。メスから卵子を採取することはどんな場合でも困難です。そこで本研究グループは性別や年齢、健康状態に関係なく採取可能な体細胞に着目しました。新鮮な体細胞であればクローン技術で子孫を作ることができるため、体細胞も遺伝資源として利用できますが、これまでフリーズドライ化した細胞からクローン動物を作ることは出来ませんでした。今回本研究グループは、最適な凍結乾燥保護剤を見つけ、様々な試行錯誤の末に、ついにフリーズドライ化して最長で9か月間保存した体細胞からクローンマウスを作り出すことに成功しました。調べたクローンマウスはすべて正常な繁殖能力を持っていました。本方法は、遺伝資源をどんな個体からでも回収でき、液体窒素を使わないため安全かつ低コストで保存できるため、遺伝資源の究極の保存方法になると考えられます。

本成果は Nature communications のハイライトに選ばれ、日本時間7月6日（水）午前0時にオンライン掲載されました。

タイトル：Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells.

本研究のポイント

- フリーズドライで長期間保存した体細胞からクローン動物を作り出すことに初めて成功
- 液体窒素を使わないため、安全かつ低コストで保存できる
- 体細胞が遺伝資源として利用可能なことを証明

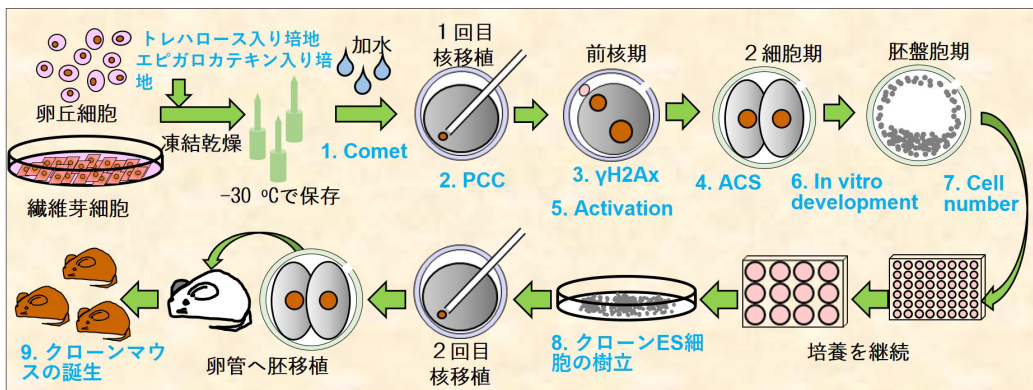
1. 背景

遺伝資源は我々人類にとってもっとも貴重な財産です。そのため、温暖化などの環境変異や、未知の病気の蔓延など地球規模の災害が起こっても食糧資源の維持や自然環境の再現ができるように、可能な限り多くの遺伝資源を保存し、生物多様性を維持しなければなりません。植物ではビル・ゲイツらが出資して、永久凍土の地下に世界中の種子を保存する取り組みが始まっています（スバ

ールバル種子貯蔵庫)(注1)。ところが動物の遺伝資源、すなわち卵子や精子の保存には液体窒素が必要なため、取り扱いが難しく高コストになってしまうだけでなく、大規模震災等で液体窒素の供給が止まってしまうと、すぐに溶けて利用できなくなるという問題があります。また、動物の卵子を採取することは非常に難しく、精子も老齢や幼弱、および不妊個体からは採取できないため、まだほんの一部の動物種でしか遺伝資源は保存されていません。

山梨大学の研究グループは、液体窒素を使わずに精子を保存するフリーズドライ化技術の開発を20年以上にわたり行ってきました(注2)。これまでに、机の引き出しの中で1年以上保存したフリーズドライ精子や(注3)、国際宇宙ステーションで約6年間保存したフリーズドライ精子から仔マウスを作り出すことに成功しており(注4)、精子のフリーズドライ保存法は動物遺伝資源を安全かつ低コストで(さらには地球外でも)長期間保存できることを証明してきました。また本研究グループは、核移植技術を用いれば体細胞からでも子孫(クローン)を作れることから、体細胞クローン技術(注5)による遺伝資源の保存にも力を入れています。今までに、16年間冷凍庫で保存されていた死体や(注6)、尿から回収した細胞でクローンを作成することに成功し(注7)、クローン技術が絶滅危惧種の救済にも適した方法であることを証明しています。

もし体細胞のフリーズドライ保存が可能になれば、全ての個体から簡単に遺伝資源(=体細胞)を採取でき、液体窒素を使わずに保存できるため、安全かつ低コストな究極の保存方法になると思われます。しかし精子のフリーズドライ保存に成功してから四半世紀近く経つにもかかわらず、まだ精子以外の細胞でフリーズドライ保存に成功したことはありませんでした。今回当研究グループは、凍結乾燥保護剤や乾燥方法を改良し、さらに同グループが開発した連続核移植技術(注8)を組み合わせることで(図1)、フリーズドライした体細胞からクローンマウスを作ることに世界で初めて成功しました。



本研究は、山梨大学発生工学研究センターの若山清香助教、伊藤大裕(大学院生)、林えりか(大学院生)、石内崇士准教授、若山照彦教授による成果です。

図1: 凍結乾燥体細胞からクローンマウスを作出する方法

細胞の採取からクローンマウスの作製までたくさんの工程がある。それぞれの工程で体細胞に生じたダメージを測定し、改善することで、ついにクローンマウスの作出に成功した。

2. 研究方法

ドナーマウスは雌雄、近交系および交雑系の6種類を用意し、体細胞は卵丘細胞(メス)および尻尾の繊維芽細胞(オスとメス)を採取しました。細胞は凍結乾燥保護剤(トレハロースあるいはエピガロカテキン)で処理し、ガラスアンプルビンへ入れ、様々な条件で凍結

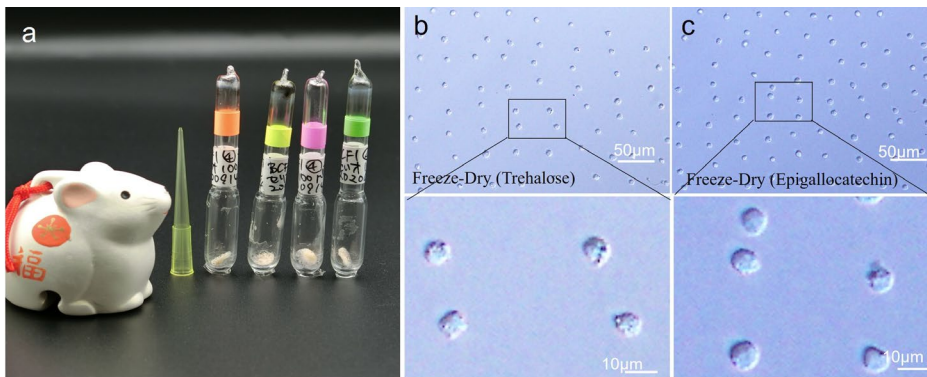


図2. 凍結乾燥した体細胞

(a) 凍結乾燥した体細胞が入っているアンプルビン。(b、c) 加水して元に戻した凍結乾燥体細胞。トレハロース (b) よりエピガロカテキン (c) の方がきれいな形状の細胞に戻った。

しました。その後真空乾燥機で完全に乾燥させ (図2 a)、 -30°C で最長9か月間保存してから実験に使用しました。
実験では、アンプルビンへ使用直前に水を加えて細胞をもとに戻し、1. 体細胞のDNA損傷度、2. 核移植した後のリモデリング、3. 卵子内でのDNA修復、4. 染色体分離異常、5. 初期化時間、6. クローン胚の発生能、7. クローン胚盤胞の細胞数、8. クローンES細胞(注8)の樹立成績、および9. クローンマウスの出産成績について調べました (図1)。また、得られたクローンES細胞については核型を調べ、Y染色体が抜け落ちてしまったクローンES細胞株については、X染色体の不活化状態を調べました。

3. 結果

最初に、メスマウスから採取した体細胞 (卵丘細胞) を用いて、凍結乾燥保護剤であるトレハロースあるいはエピガロカテキンを用いて保護効果を比較したところ、エピガロカテキンの方がトレハロースよりフリーズドライで生じるダメージを軽減し、比較的きれいな細胞に戻すことが出来ました (図2 b, c)。

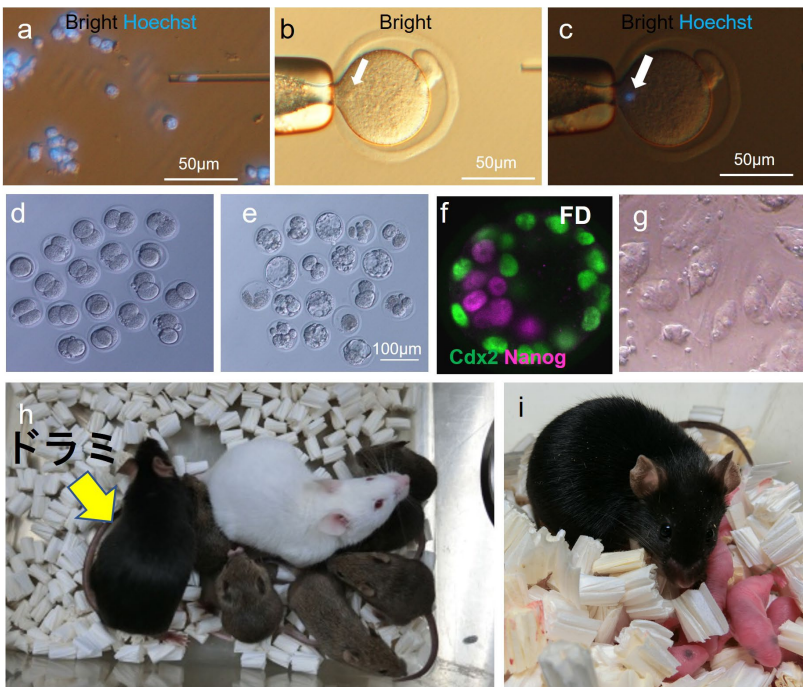


図3. 凍結乾燥した体細胞由来のクローン胚とクローンマウス

(a-c) 核移植の様子。(d-f) クローン胚の発生。胚盤胞は免疫染色により詳細を調べた (f)。(g) 樹立したクローンES細胞。(h) 凍結乾燥したメスの体細胞から生まれた世界初のクローン。名前はドラミ。正常な繁殖能力があった。(i) オスの体細胞から生まれたメスのクローン。

フリーズドライした体細胞を核移植し (図3 a-c)、得られたクローン胚を4日間培養したところ、トレハロースを用いた場合、クローン胚盤胞へはほとんど発生しませんでした (0.1%)、エピガロカテキンを用いることで発生率が有意に改善されました (2.1%)

(図3 d-f)。それらのクローン胚をES細胞樹立用培地で約2週間培養した結果、フリーズドライした体細胞からクローンES細胞を樹立することが出来ました (約1%) (図3 g)。そこでこれ以降はすべてエピガロカテキンを使用することにしました。

次にオスとメスの尻尾から採取した体細胞 (線維芽細胞) を用いて同様に核移植を行い、クローンES細胞の樹立を試みたところ、雌

雄および系統に関係なく 4~13%がクローン桑実期／胚盤胞へ発生し、1~2%がクローン ES 細胞として樹立できました。

最後に、樹立できたクローン ES 細胞（合計 49 株）をドナーとしてもう一度核移植を行ったところ、たくさんのクローンマウスを作出することに成功しました（0.2~5%）（表 1）。最初に成功したクローンマウス（名前はドラミ。図 3h）は妊娠能力も正常で、寿命も正常な範囲内でした（676日間生存）。繁殖能力は遺伝資源として利用可能であることを示す重要な証拠であり、調べたクローンマウスはすべて正常でした。

しかし、オスのドナーマウスのうちの 1 匹は、実験中に細胞から Y 染色体が抜け落ち、生まれてきたクローンマウスはすべてメスになってしまいました。しかし外見に異常はなく、生殖能力も正常でした（図 3i）。

表 1. フリーズドライした体細胞由来のクローン ES 細胞から生まれたクローンマウス

	保護剤	使用卵子数	核移植に成功した卵子数(%)	翌日 2 細胞期へ発生した胚数 (%)	クローンマウス数 (%)*
卵丘細胞	トレハ	3146	2356 (74.9)	1400 (59.4)	3 (0.2)
	エピガロ	2369	1875 (79.1)	1016 (54.2)	16 (1.6)
繊維芽細胞	エピガロ	1868	1460 (78.2)	867 (59.4)	47 (5.4)
	エピガロ	1200	884 (73.7)	520 (58.8)	9 (1.7)

* : 移植した胚に対する出産率

4. 今後の期待

本研究におけるクローンマウスの成功率は、最初のドナー細胞から計算すると、1 回目の核移植でクローン ES 細胞が樹立できる確率が約 1%、その細胞株をドナーとして 2 回目の核移植でクローンマウスが生まれてくる確立が約 2%、したがって最初のドナー細胞からクローンマウスが生まれる成功率はわずか 0.02%しかありません。この成績は哺乳類最初のクローン動物である羊のドリー（0.4%）よりも低い値です。長期保存後でも確実にクローンを作れるという保証がなければ、遺伝資源として広く利用されるようになることは難しいでしょう。今後は信頼性を得るために、成功率のさらなる改善が必要です。

また、今回の研究ではフリーズドライ細胞を -30℃の冷凍庫で保存しました。液体窒素を使わないで保存することには成功しましたが、大災害などで電力供給が止まっても安全に保存できるようにするためには、室温保存に成功することが不可欠です。本研究グループが初めて精子のフリーズドライ保存に成功した時も、最初は室温で長期保存はできなかったのですが今では可能になっており（注 3）、体細胞の室温保存も実現可能だと本研究グループは考えています。将来的にはこの技術を応用して、乾燥保存されているニホンオオカミやニホンカワウソなどの毛皮からクローンを作り出せるかもしれません。

一方、1例だけですがフリーズドライ保存したオスの尻尾の細胞から Y 染色体が抜け落ち、メスのクローンマウスがたくさん生まれた場合があります。偶然の成功例ですが、オスしか生き残っていない絶滅危惧種からメスを作り出すことで、絶滅する運命だったその種を復活させることが可能なこ

とが示されました。Y 染色体がいつどのようにして抜け落ちたのか明らかにすることで、人為的にオスからメスのクローンを作り出せるようにすることが次の目標です。

生物多様性、すなわち遺伝資源は人類の貴重な財産であり、可能な限り多くの遺伝子資源を永久に保存する必要があります。本研究で示した体細胞のフリーズドライ保存技術を用いれば、動物の遺伝資源も植物の種子と同様に簡単に回収でき、低コストで安全に保存できるようになります。本研究グループは地球で大地震や洪水が起こっても問題ないように、月の地下で遺伝資源を永久的にバックアップ保存することを提唱しています（注9）。今はまだ現実的ではありませんが、フリーズドライ体細胞の成功により遺伝資源の網羅的回収の可能性が示された今、未来の子供たちへすべての遺伝資源を残す重要な研究だと考えています。

謝辞 この研究は高橋産業経済研究助成金、浅田生殖医学研究助成金、キャノン財団研究助成金などで実施されました。

原論文情報



nature
COMMUNICATIONS

ARTICLE Check for updates

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31216-4> OPEN

Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells

Sayaka [Wakayama](#)^{1,2✉}, Daiyu [Ito](#)¹, Erika [Hayashi](#)¹, Takashi [Ishiuchi](#)¹ & Teruhiko [Wakayama](#)^{1,2✉}

<補足説明>

注1. スバルバル世界種子貯蔵庫

永久凍土の地下で世界中の種子を貯蔵することで、たとえ大規模災害が起き電力供給が止まっても半永久的に種子の保存を可能にした施設。しかし温暖化により永久凍土が溶け、絶対に安全とされてきたスバルバル種子貯蔵庫が洪水被害にあってしまいました。果たして地球上に、絶対に安全な保存場所はあるのでしょうか。

<https://www.regjeringen.no/en/topics/food-fisheries-and-agriculture/jordbruk/svalbard-global-seed-vault/id462220/>

<https://www.discoverychannel.jp/0000007121/>

注 2. 凍結乾燥（フリーズドライ）精子

哺乳類の細胞や精子はフリーズドライするとすべて死んでしまいます。しかし本研究グループは 1998 年に、フリーズドライにして保存した精子から健康な産仔を作ることに世界で初めて成功しました（Wakayama et al, Nature Biotech. 1998,16 : 639-641）。最初に生まれたマウスの名前は「ドライモン」です。この技術によって、それまで液体窒素がなければ保存できなかった精子を室温でも保存できるようになりました。

注 3. フリーズドライ精子の極限環境耐性と長期保存

山梨大学の研究グループは、精子をフリーズドライ化すると高温、低温、放射線などに対して強い耐性を獲得し、机の引き出しの中でも長期間保存可能なことを発見しました。また、フリーズドライ精子をハガキに張り付けて普通郵便で送ることに成功しました。

<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2019/04/20190403pr.pdf>

<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2018/07/20180718pr.pdf>

<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2021/08/20210802pr-1.pdf>

注 4. 国際宇宙ステーションでフリーズドライ精子を 6 年間保存

山梨大の研究グループは、国際宇宙ステーション（ISS）でフリーズドライ精子を最長 6 年間保存し、精子に対する宇宙放射線の影響を調べる研究を行いました。ISS での長期保存により、精子 DNA は宇宙放射線によってダメージを受けましたが、出産にはあまり影響はなく、孫世代も健康に生まれてきました。本研究によりフリーズドライ精子は宇宙放射線に対してかなり強い耐性があり、理論上 ISS で 200 年保存可能であることが分かりました。本研究は哺乳類初の宇宙生殖実験だったこともあり、比較的レベルの高い科学雑誌（PNAS 2017; Science Advances 2021）に掲載され、国内外のメディア等で広く紹介されました。

<https://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/Space%20pup%20press%20release%2020170523.pdf>

<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2021/06/20210607pr.pdf>

注 5. 体細胞クローン動物

哺乳類初の体細胞クローン動物は、1997 年にスコットランドの研究所で作られた羊のドリーです。それまで哺乳類のクローンは不可能だと考えられていたため、この発表は世界中に衝撃を与えました。しかし羊は大型動物で実験が容易ではなく、飼育費も高額となってしまうため、小型実験動物であるマウスでの成功が待ち望まれていました。山梨大の研究グループを率いる若山（当時はハワイ大学）は、翌 1998 年に体細胞クローンマウスの作出に初めて成功し（Nature の表紙を飾る）、これ以降マウスを使ったクローンの研究が世界中で行われるようになりました。この時生まれた世界初のクローンマウス「キュムリーナ」のはく製は、スミソニアン博物館に収蔵されました。

<https://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/smithsonian.pdf>

<https://americanhistory.si.edu/press/releases/cumulina>

注6. 16年間冷凍庫で保存されていたマウスの死体からクローンマウスの作出に成功

それまでクローン動物は生きた細胞からしか生まれていませんでしたが、本研究では-30℃の冷凍庫で16年間もの間、凍った状態で保存されていたマウスの凍結死体からクローンマウスを作ることによって初めて成功しました。本研究により絶滅動物の復活も夢ではない、という可能性を示しました。

http://www.cdb.riken.jp/04_news/articles/pdf/08/081104_frozen.pdf

注7. 尿に含まれている細胞からクローンマウスの作出に成功

尿の中には、膀胱や尿管の表面から剥がれ落ちた細胞がわずかですが含まれています。山梨大の研究グループは、マウスの尿からそれらの細胞を回収し、クローンマウスを作り出すことに初めて成功しました。体を傷つけることなく体細胞を回収しクローン技術で増やすことが可能なため、絶滅危惧種の救済が可能になります。この成功は新幹線の電光掲示板でもニュースとして紹介されました。

<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2016/04/20160329.pdf>

注8. 連続核移植技術

体細胞を核移植して作ったクローン胚をES細胞樹立用培地で培養し続けると、ES細胞と全く同じ性質を持つクローンES細胞を樹立することができます。このクローンES細胞をドナーとして2回目の核移植を行うことで、従来の1回だけの核移植より高い成績でクローンマウスを作ることが可能になります。

注9. 遺伝資源の宇宙保存

山梨大の研究グループは、動物遺伝資源を月の地下で保存することを提唱しています(Wakayama et al., PNAS2017; Science Advances 2021)。当グループが開発した細胞のフリーズドライ保存技術を用いれば、ロケットでの運搬費用が大きく削減できるだけでなく、フリーズドライ精子や細胞の放射線耐性を強化できます。月に保存すれば、地球規模の大震災が起こっても影響を受けないため、地球の遺伝資源を永久に保存できるでしょう。

(注) カラー写真等をご入用の方は下記広報担当までお知らせください。

(本件に関する問い合わせ先)

山梨大学 発生工学研究センター

助教 若山 清香 sayakaw@yamanashi.ac.jp

教授 若山 照彦 twakayama@yamanashi.ac.jp

TEL : 055-220-8826 FAX : 055-220-8827

(広報担当)

同 企画部広報企画課

TEL : 055-220-8005, 8006 FAX : 055-220-8799

E-mail : koho@yamanashi.ac.jp