

凍結されたウシ骨髄組織からの効率的な細胞核回収方法の開発

近藤 健二¹、加藤 博己²、安齋 政幸²、三谷 匡²、鈴木 淳夫²、
松本 和也^{1,2}、佐伯 和弘^{1,2}、細井 美彦^{1,2}、入谷 明^{1,2}

要 約

本研究では、マンモス骨髄組織からの効率的な細胞核の回収方法を開発するために、組織の状態が類似したウシ凍結骨髄組織からの効率的な細胞核の回収方法の開発を試みた。さらに、回収方法の有用性を検討するために、回収したウシ凍結骨髄組織由来細胞核をマウス除核未受精卵子に注入し、回収された核の生物学的特性の有無を検討した。

初めに、凍結保存されたウシ骨髄組織からの効率的な細胞核の回収方法の開発を試みた。ウシ骨髄組織から細胞核を回収する際に、Collagenase 処理を行う事によって、細胞核の回収量が有意に向上した。次に、回収したウシ凍結骨髄組織由来ドナー細胞核をマウス除核未受精卵子へ注入し、再構築卵子の早期染色体凝集および前核様構造物の確認を行った。その結果、早期染色体凝集ならびに前核様構造物の形成は観察されなかったものの、細胞核の注入直後に観察された Propidium iodide による強い赤色蛍光が、細胞核注入後 7 時間ではほぼ消失していた事から、生物学的特性は保持されていると考えられた。

以上の結果より、生物学的特性を保持した状態の細胞核を大量に回収できる新しい細胞核の回収方法を開発する事に成功した。

緒 言

近年、Wakayama らは、 -20°C で 16 年間凍結保存したマウス個体から回収した細胞核を用いて体細胞核移植 (somatic cell nuclear transfer ; SCNT) を行う事により、体細胞核移植胚由来 ES 細胞を樹立し、その細胞を核ドナー細胞として、再び核移植を行うことによって、クローンマウスの作製に成功した¹⁾。この報告により、死後凍結保存されていた組織または細胞があれば、体細胞核移植技術によって個体を復活させることが可能であることが示された。

我々の研究グループでは、永久凍土から出土したマンモス組織から細胞核を回収し、マウス除核未受精卵子に注入する事で、マンモスの組織内に存在する細胞核の初期の動態の観察を試みた²⁾。その結果、マンモスの皮膚および筋肉組織からの細胞核の回収には成功したものの、回収効率は低く、また回収された核を注入した再構築卵子で、早期染色体凝集ならびに前核様構造物の形成は確認されなかった。このため、マンモスの皮膚および筋肉組織から細胞核は回収されるものの、その保存状態は悪い可能性が考えられることと、マンモス骨髄組織からの効率的な細胞核の回収方法の開発が課題として挙げられた。

そこで本研究では、マンモス骨髄組織からの効率的な細胞核回収方法を開発する事を目的に、マンモス骨髄組織と同様に脂肪組織化した黄色骨髄組織を持つウシ凍結骨髄組織からの効率的な細胞核の回収方法の開発を試みた。また、回収した細胞核が生物学的特性を保持した状態で回収されているのかどうかを検討する事を目的に、開発した細胞核回収方法を用いて回収したウシ凍結骨髄組織由来ドナー細胞核をマウ

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

ス除核未受精卵子へ注入し、早期染色体凝集 (premature chromosome condensation ; PCC) ならびに前核様構造物の形成の有無を観察した。

材料および方法

(1) 供試動物

供試サンプルとして、岐阜県畜産研究所より供与された、成熟したウシの中手骨から回収した骨髄組織を使用した。また、ウシ骨髄組織は、 -80°C ディープフリーザーで約2年間、その後、更に -20°C の冷凍庫で2年6ヶ月間凍結保存したサンプルを使用した。

マウス骨髄組織は、B6D2F1 (C57BL/6Cr \times DBA/2Cr) 系統雌マウス (日本 SLC (株)) のマウスの大腿骨から回収した骨髄組織を使用した。SCNT に供するレシピエント卵子は、成熟週齢の B6D2F1 (C57BL/6Cr \times DBA/2Cr) 系統雌マウス (日本 SLC (株)) により回収した。

なお、本実験に際して、実験の立案や実験動物に関わる取り扱いについては、近畿大学動物実験規定に準じて実施した。

(2) ドナー細胞核の回収

それぞれの実験区で、各 0.2g ずつのウシ凍結骨髄組織を実験に使用した。今回の実験では、3つの実験区と、1つの対照区を設け、実験を行った。3つの実験区では、組織のホモジナイズを行う前処理として、1ml の 0.1% Collagenase Type IV を加え、 37°C 温度下で、それぞれ 30 分間、60 分間、120 分間酵素処理を行い、対照区として、0.1% Collagenase Type IV を加えない未処理区を設けた。これらの Collagenase 処理以降は、同条件で実験を進めた。ガラスホモジナイザー内に、0.1% Collagenase Type IV による処理を行ったサンプルを移し、Kuretake らにより開発された Nuclear isolation medium (123.0mM KCl, 2.6mM NaCl, 7.8mM NaH_2PO_4 , 1.4mM KH_2PO_4 , 3mM EDTA-2Na, 0.5mM PMSF) を $500\mu\text{l}$ 加え³⁾、8 分間、 4°C 下で組織を破碎した。破碎後、 $100\mu\text{m}$ フィルターを用い、フィルトレーションを行い、2.0ml チューブにサンプル溶液を回収した。回収後、500g、5 分間、 4°C で遠心し、上清を除去した。 $200\mu\text{l}$ の NIM を加え、ペレットを懸濁し、再び 500g、5 分間、 4°C で遠心し、上清を除去した。 $100\mu\text{l}$ の NIM を加え、ペレットを再懸濁し、Propidium iodide (PI) を $10\mu\text{l}$ 加え、20 分間、 4°C でインキュベートした。インキュベート後、血球計算盤を用い、蛍光顕微鏡下で細胞核数を測定した。血球計算盤を用いた細胞核数の測定は、各実験区につき 4 回行い、その平均をそれぞれの細胞核数とした。

(3) SCNT

SCNT 操作は、常法に従った⁴⁾。過剰排卵処理を行った B6D2F1 雌マウスの卵管膨大部より卵子を回収し、0.1% Hyaluronidase 処理で処理を行うことにより卵丘細胞を除去した。卵子の除核および細胞核の注入には、倒立型蛍光微分干渉顕微鏡にピエゾマイクロマニピュレーターを取り付けたものを用いた。減数分裂中期停止染色体-紡錘体複合体を除核用ピペットで吸引し、除核を行った。核ドナー細胞核には、回収した細胞核を用い、除核した卵子へ注入した。細胞核を注入して約 1 時間後に、蛍光顕微鏡下で再構築卵子の観察を行い、PCC の形成の有無を観察した。そして、活性化処理後は、KSOM 培地内で、 37°C 、6% CO_2 インキュベーター内にて培養を行い、細胞核注入後 7 時間、再び蛍光顕微鏡下で再構築卵子の観察を行い、前核様構造物の形成の有無を観察した。

(4) 統計学的解析

有意差検定は Stat View program Version 5.0 (SAS Institute) を用いて、分散分析を求めた後、Fisher の PLSD により解析し、それぞれ危険率が 0.05 以下のもの ($p < 0.05$) を有意な差があるとした。

結 果

(1) ウシ凍結骨髄組織からの効率的な細胞核回収方法の検討

0.1% Collagenase Type IVによる前処理を行わなかった未処理区と比較して、前処理として 37°C温度下で、0.1% Collagenase Type IVによる処理を 30 分間、60 分間、120 分間行った 3つの区では、細胞核の回収量がそれぞれ、約 26 倍、47 倍および 26 倍程度まで向上し、有意な差が認められた。

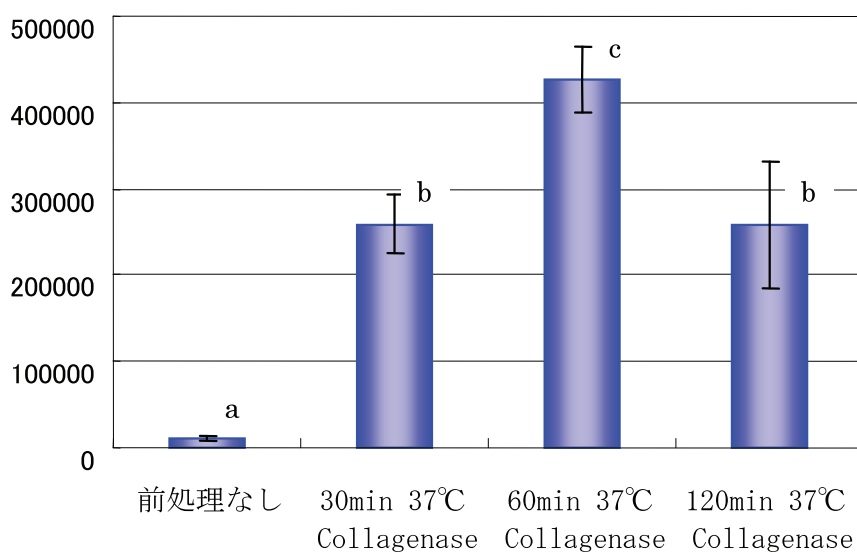
さらに、前処理として 37°C温度下で、0.1% Collagenase Type IVによる処理を 30 分間、120 分間行った 2つの区と比較して、60 分間 0.1% Collagenase Type IVによる処理を行った区では、細胞核の回収量が約 2 倍程度まで向上し、有意な差が認められた。

表 1. Collagenase 処理をして回収したウシ凍結骨髄組織由来細胞核

各実験区	第 1 回(個)	第 2 回(個)	第 3 回(個)	第 4 回(個)	平均±SE*
未処理区	13750	15000	7500	7500	10938±2001 ^a
30 分間 Collagenase	206250	200000	300000	331250	259375±33121 ^b
60 分間 Collagenase	477500	325000	412500	493750	427188±38319 ^c
120 分間 Collagenase	377500	141250	118750	393750	257188±73674 ^b

*: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$) (n=4)

図 1. Collagenase 処理をして回収したウシ凍結骨髄組織由来細胞核



異符号間に有意差あり ($p < 0.05$) (n=4)

(2) Collagenase 処理をして回収したウシ凍結骨髄組織由来ドナー細胞核を用いた再構築卵子の観察

表 2 および図 2 は、Collagenase 処理をして回収したウシ骨髄組織由来ドナー細胞核をマウス除核未受精卵子へ注入した再構築卵子の発生成績と、得られた再構築卵子の写真である。対照区である新鮮なマウス骨髄組織由来細胞核をドナーとして核移植を行った区では、17 個中 1 個と、低率であるが、PCC ならびに前核様構造物の形成が観察されたが、Collagenase 処理の有無に関わらず、ウシ凍結骨髄組織由来細胞核をドナーとして核移植を行った区では、PCC ならびに前核様構造物の形成は観察されなかった。

図 2 は、ウシ凍結骨髄組織およびマウス新鮮骨髄組織由来ドナー細胞核を用いた再構築卵子の細胞核注入直後と細胞核注入 7 時間後の観察結果を示している。新鮮なマウス骨髄組織由来細胞核をドナーとして核移植を行った区では、細胞核注入後 7 時間で前核様構造物の形成が観察されたが（黒矢印）、Collagenase 処理の有無に関わらず、ウシ凍結骨髄組織由来細胞核をドナーとして核移植を行った二つの区で、前核様構造物の形成は観察されなかった。しかし、細胞核注入直後に蛍光顕微鏡下で観察された PI による強い赤色蛍光（白矢印）が、細胞核注入後 7 時間では、ほぼ消失していた。

表 2. Collagenase 処理をして回収したウシ骨髄組織由来ドナー細胞核をマウス除核未受精卵子へ注入した再構築卵子の発生成績

供試ドナー細胞	生存卵子数	PCC 形成 卵子数 (%) ※	前核様構造形成 卵子数 (%) ※※
ウシ凍結骨髄組織由来ドナー 細胞核 60 分間 Collagenase 処理	43	0	0
ウシ凍結骨髄組織由来ドナー 細胞核 Collagenase 未処理区	5	0	0
マウス新鮮骨髄由来ドナー細胞核	17	1 (6)	1 (6)

※ 早期染色体凝集の観察は、細胞核注入後 1 時間で行った。

※※ 前核様形態の観察は、細胞核注入後 7 時間で行った。

図2. Collagenase 処理をして回収したウシ凍結骨髄組織由来ドナー細胞核を用いた再構築卵子の観察結果

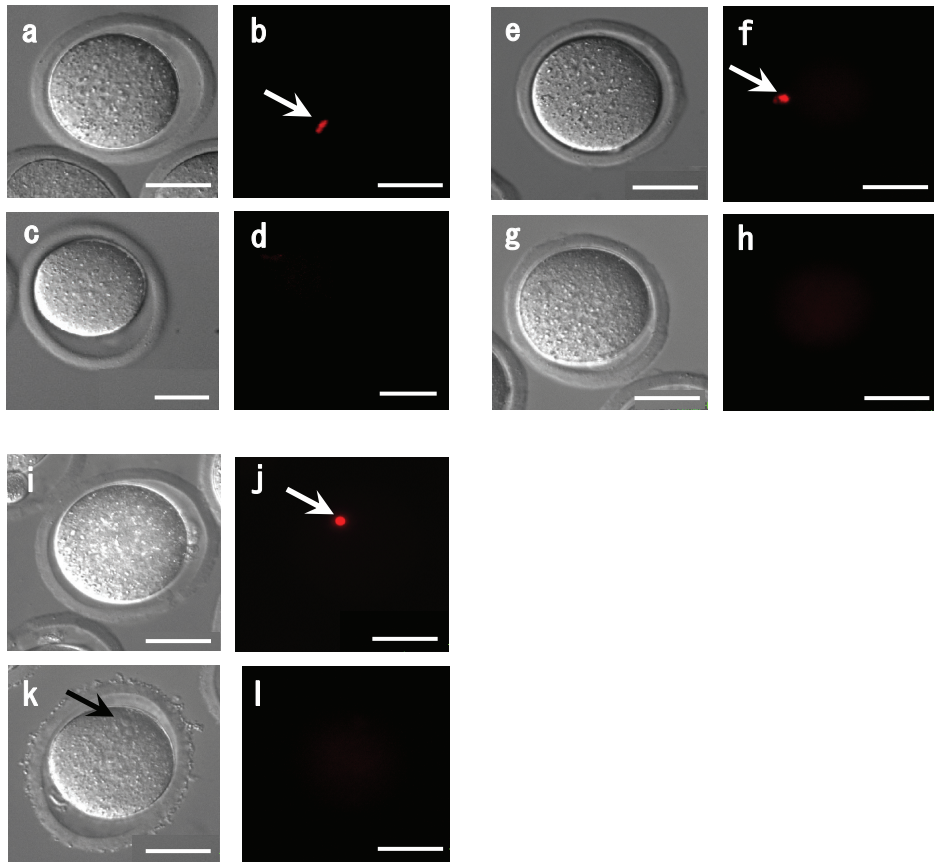


図2. ウシ凍結骨髄組織およびマウス新鮮骨髄組織由来ドナー細胞核を用いた再構築卵子の細胞核注入直後と細胞核注入7時間後の観察像
(a-d) は、Collagenase 処理を用いて回収したウシ凍結骨髄組織由来細胞核を注入した再構築卵子の写真で、細胞核注入直後の (a) 透過光像、(b) 蛍光像、および、細胞核注入7時間後の (c) 透過光像、(d) 蛍光像を示している。(e-h) は、Collagenase 処理を用いず回収したウシ凍結骨髄組織由来細胞核を注入した再構築卵子の写真で、細胞核注入直後の (e) 透過光像、(f) 蛍光像、および、細胞核注入7時間後の (g) 透過光像、(h) 蛍光像を示している。(i-l) は、マウス新鮮骨髄組織由来細胞核を注入した再構築卵子の写真で、細胞核注入直後の (i) 透過光像、(j) 蛍光像、および、細胞核注入7時間後の (k) 透過光像、(l) 蛍光像を示している。

考 察

ウシ骨髄組織を破碎する直前に Collagenase 処理を行う事で、細胞核を効率的に回収できる事が示された。これは、ウシ骨髄組織内に含まれる多くの脂肪組織化した細胞が Collagenase 処理により分解されたためと考えられた。また本実験では、0.1% Collagenase Type IVによる酵素処理を60分間行う事で、細胞核を最も多く回収する事ができた。しかし、Collagenase による酵素処理を120分間行う事で細胞核の回収量が減少したため、Collagenase による過度な酵素処理が、細胞核の分解につながったと考えられた。

開発した細胞核回収方法により回収したウシ凍結骨髄組織由来細胞核を、マウス除核未受精卵子へ注入した結果、PCCならびに前核様構造物の形成は観察されなかったが、細胞核注入直後に蛍光顕微鏡下で確認されたPIによる強い赤色蛍光が、細胞核注入後7時間では、ほぼ消失していた。近年、我々の研究グルー

プは、マンモスの皮膚および筋肉組織から回収した細胞核をマウス除核未受精卵へ注入し、その再構築卵子の初期の動態を観察した²⁾。その結果、マンモス組織由来細胞核を注入した7時間後の再構築卵子内では、PIによる強い赤色蛍光はそのまま残存しており、マウス骨髄組織から回収した細胞核を注入した7時間後の再構築卵子では、PIによる赤色蛍光はほぼ消失していた。この報告から、今回開発された細胞核回収方法により回収した細胞核は、前核様構造物の形成は観察されなかったものの、PIによる赤色蛍光がほぼ消失していた事から、PIの排出を行っており、生物学的特性を保持している可能性が示された。

一般に、成体の大型哺乳類の骨髄組織内に存在する骨髄細胞は、加齢に伴い脂肪組織化していくことが知られており、マンモスの骨髄組織も同様であると考えられるため、細胞核は状態良く保存されていると考えられる。今後この方法を更に改良する事により、マンモスの復活に結びつけられる可能性が考えられる。

謝 辞

本研究の実施にあたり、ウシの骨および骨髄組織を提供して頂きました、岐阜県畜産研究所 林 登先生に感謝の意を表します。

参 考 文 献

1. Wakayama S., Ohta H., Hikichi T., Mizutani E., Iwaki T., Kanagawa O., Wakayama T. (2008) Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 (45):17318-17322.
2. Kato H., Anzai M., Mitani T., Morita M., Nishiyama Y., Nakao A., Kondo K., Lazarev R.A., Ohtani T., Shibata Y., Iritani A. (2009) Recovery of cell nuclei from 15,000 years old mammoth tissues and its injection into mouse enucleated matured oocytes. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85 (7):240-247.
3. Kuretake S., Kimura Y., Hoshi K., Yanagimachi R. (1996) Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol. Reprod.* 55:789-795.
4. Wakayama T., Perry A.C.F., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.* 394:369-374.

英文要旨

Development of effective cell nuclei recovery method from cryopreserved cattle bone marrow tissues

Kondo K.¹, Kato H.², Anzai M.², Mitani T.², Suzuki A.²,
Matumoto K.^{1, 2}, Saeki K.^{1, 2}, Hosoi Y.^{1, 2}, and Iritani A.^{1, 2}

Abstract

We tried to develop the effective nuclei recovery method from cryopreserved cattle bone marrow tissues for the development of effective nuclei recovery method from mammoth bone marrow tissues. In addition, we studied whether its cell nuclei still kept their biological characteristics by injecting recovered nuclei into mouse enucleated matured oocytes.

First, we tried to develop the effective nuclei recovery method from cryopreserved cattle bone marrow tissues. The amount of recovered cell nuclei was significantly increased by using collagenase treatment. Subsequently, we tried to inject recovered cell nuclei into mouse enucleated matured oocytes and checked for premature chromatin condensation and pronuclear-like structure. As a result, there was no oocyte with premature chromatin condensation and pronuclear-like structure, but because the highly-red fluorescence which was observed shortly after injection nearly disappeared after 7 hours, their cell nuclei were shown to keep biological characteristics.

Based on these results, our method was shown to be effective in mass recovery of cell nuclei that kept their biological characteristics.

1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan
2. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan