

# カルボキシル基導入ポリリジンを用いた ラット初期胚のガラス化保存法の開発

## Successful vitrification of rat embryos using a carboxylated $\epsilon$ -poly-L-lysine

鴨下 真紀<sup>1#</sup>・中野 成実<sup>2#</sup>・藤原 克祥<sup>1</sup>・須山 あゆみ<sup>2</sup>・  
松村 和明<sup>3</sup>・玄 丞然<sup>4</sup>・伊藤 潤哉<sup>1,2\*</sup>・柏崎 直巳<sup>1,2</sup>

Maki Kamoshita<sup>1#</sup>, Narumi Nakano<sup>2#</sup>, Katsuyoshi Fujiwara<sup>1</sup>, Ayumi Suyama<sup>2</sup>,  
Kazuaki Matsumura<sup>3</sup>, Suong-Hyu Hyon<sup>4</sup>, Junya Ito<sup>1,2\*</sup> and Naomi Kashiwazaki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院獣医学研究科 〒252-5201 相模原市

<sup>2</sup>麻布大学獣医学部動物繁殖学研究室 〒252-5201 相模原市

<sup>3</sup>北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 〒923-1292 能美市

<sup>4</sup>鹿児島大学共同獣医学部 〒890-0065 鹿児島市

<sup>1</sup>Graduate School of Veterinary Science, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-5201, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-5201, Japan

<sup>3</sup>School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan

<sup>4</sup>Lab, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

**要旨：**近年CRISPR/Cas9をはじめとするゲノム編集技術の発展により、数多くの遺伝子改変ラットが作製され、活用されている。こうした遺伝子改変ラットを遺伝資源として効率的に保存するためには、初期胚の状態、液体窒素中で半永久的に保存する超低温保存法が有効である。本研究では、さらなるラット初期胚における超低温保存後の発生能の向上を目的として、エチレングリコール (EG) およびジメチルスルホキシド (DMSO) を用いたガラス化液 (E15D15) あるいは、EGと新規凍害保護物質であるCOOH-PLL添加保存液 (E20P10) を用い、異なる発生ステージにおけるラット初期胚を最小容量ガラス化法により保存し、加温後の生存率と胚発生率を評価した。さらに、胚移植を行うことで個体への発生率についても調べた。その結果、COOH-PLL添加保存液で保存したラット初期胚は、E15P15保存液を用いて保存した胚よりも高い発生能を示した。本研究の結果は、ラットバイオリソースなどにおいて有用であると考えられる。

**キーワード：**ラット, 初期胚, ガラス化保存

**Abstract:** Recently, production of genetically modified animals using a genome editing system such as CRISPR/Cas9 has been useful for modifying various species including rats. Such genetically modified rats can be preserved as germ cells to reduce the costs of maintenance of live animals. Vitrification of preimplantation embryos is valuable for many researchers. However, it is known that rat embryos are sensitive to physiological and physical stress and further improvement of the vitrification protocol is required. In this study, we examined whether a new cryoprotective agent (CPA), carboxylated  $\epsilon$ -poly-L-lysine (COOH-PLL), is suitable for vitrification of rat embryos from the pronuclear to blastocyst stages in a minimal volume cooling protocol. Our results show that most of the embryos vitrified with ethylene glycol and COOH-PLL survived and developed to the blastocyst. After the transfer of vitrified embryos, the survival rate to term was similar to that of fresh embryos. We conclude that our vitrification protocol is suitable for rat embryos.

**Key words:** Rat, Embryo, Vitrification

(受付 2019年12月7日 / 受理 2019年12月11日)

別刷請求先：〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-71 麻布大学獣医学部動物繁殖学研究室

\*To whom correspondence should be addressed. e-mail: itoj@azabu-u.ac.jp #Contributed equally

## はじめに

ラットは様々な疾患研究やがん、あるいは毒性試験のモデル動物として有用な動物であり、同様にモデル動物として使用されるマウスよりも体のサイズが大きいため、得られるサンプル量等で大きな利点がある<sup>1)</sup>。近年CRISPR/Cas9をはじめとするゲノム編集技術の発展により、数多くの遺伝子改変ラットが作製され、活用されている<sup>2)</sup>。こうした遺伝子改変ラットを飼育、維持するためには膨大なスペースや費用が必要となることから、ラット遺伝資源として効率的に保存するためには、初期胚の状態、液体窒素中で半永久的に保存する超低温保存法が有効である。しかし、超低温保存したラット初期胚、特に前核期胚や2細胞期胚などの早い発生ステージの初期胚においては、胚盤胞への発生率は低く<sup>3)</sup>、改善が必要である。我々は、これまでにCryotopを用いた最小容量冷却法<sup>4)</sup>により、ラット前核期胚が効率的に保存できることを報告した<sup>5)</sup>。

一方、マウス未受精卵<sup>6)</sup>あるいはマウス前核期胚<sup>7)</sup>、さらにはブタ前核期胚<sup>8)</sup>の保存に関して、新規凍害保護物質として開発されたカルボキシル基導入ポリリジン (COOH-PLL)<sup>9,10)</sup>を用いることで、ガラス化保存後の卵あるいは胚の発生能を向上させることにも成功した。COOH-PLLは不凍タンパク質様の性質を示し、凍結や融解の際の氷の再結晶化を防ぐ効果から、ヒトiPS細胞やマウス線維芽細胞などにおいて超低温保存後の生存性を改善することが報告されている<sup>9,10)</sup>。

本研究では、さらなるラット初期胚における超低温保存後の発生能の向上を目的として、以前の報告<sup>5)</sup>で用いたジメチルスルホキシド (DMSO) 添加保存液とCOOH-PLL添加保存液を用い、異なる発生ステージにおけるラット初期胚を最小容量ガラス化法により保存し、加温後の生存率と胚発生率を評価した。さらに胚移植を行うことで個体への発生率についても調べた。

## 対象と方法

### 供試動物

本研究には日本チャールズリバーより購入したWistarラットを使用した。ラットの飼育は気温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ で行い、飼育室の明期は午前6時から午後6時までの12時間とした。飼料と水は不断給餌の環境下で飼育した。本研究におけるすべての動物実験は、麻布大学動物実験委員会の認可の下に行った。

### ラット初期胚の回収

ラット初期胚の回収はSeita et al (2009)<sup>5)</sup>を参考に行った。4–8週齢の雌ラットに300 IU/kg妊馬血清性腺刺激ホルモン (eCG: 動物用ピーエムエスA1,000単位、日本全薬工業、福島、日本) および300 IU/kgヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG: 動物用ゴナトロピン 3000、あすか製薬、東京、

日本) を48時間間隔で腹腔内投与し、過剰排卵を誘起した。hCG投与後に12–24週齢の雄ラットと同居させることにより交配させた。hCG投与24–29時間後に雌ラットの卵管から胚を回収し、1%ウシ胎子血清 (FCS, Life Technologies, CA, USA) および0.1%ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich, MO, USA) を添加したPB1<sup>11)</sup>にて卵丘細胞を除去した。その後パラフィンオイル (関東化学、東京、日本) でカバーした100  $\mu\text{L}$ のmR1ECM培地<sup>12)</sup>に移し、 $37.5^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、湿度飽和のインキュベータ内で体外培養した。培養開始直後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後および120時間後にそれぞれ前核期胚、2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚および胚盤胞を回収し、それぞれガラス化保存を行った。

### ガラス化保存と加温

ガラス化保存はCryotopによる最小容量ガラス化法<sup>4)</sup>を用い、Seitaらの方法<sup>5)</sup>を改変して行った。はじめに、ラット初期胚を室温にて20% FCSを添加したPB1 (洗浄液) で洗浄し、20% FCSおよび凍害保護物質 (Cryoprotective Agents, CPA) を添加したPB1 (平衡液) に7分間静置した後、20% FCS、0.5 Mシュクロース (Sigma-Aldrich) およびCPAを添加したPB1 (ガラス化液) に移動し、1分間以内にCryotopの先端シートに5–10個の初期胚を充填し、速やかに液体窒素中に投入した。

本実験において、平衡液およびガラス化液中のCPAは以下のように設定した。①E15D15保存液; 平衡液: 7.5% (v/v) エチレングリコール (EG, 関東化学) + 7.5% (v/v) DMSO (Sigma-Aldrich), ガラス化液: 15% (v/v) EG + 15% (v/v) DMSO, ②E20P10保存液; 平衡液: 10% (v/v) EG + 5% (w/v) COOH-PLL, ガラス化液: 20% (v/v) EG + 10% (w/v) COOH-PLLとし、それぞれCPAを添加した。加温はCryotop先端シートを $37.5^\circ\text{C}$ に温めた20% FCSおよび0.5 Mシュクロース添加PB1に5分間浸漬させることにより行った。回収した初期胚は、室温の洗浄液に5分間平衡させ、 $37.5^\circ\text{C}$ のmR1ECM培地で洗浄後にパラフィンオイルでカバーした100  $\mu\text{L}$ のmR1ECM培地に移し、前述の条件下で培養した。培養1時間後に実体顕微鏡下で観察し、細胞膜が鮮明で形態的に異常が認められなかった胚を生存胚と判定し生存率を調べた。また、胚盤胞への発生率を調べた。

### 胚移植

胚移植は、Fujiwara et al (2017)の方法<sup>13)</sup>を参考に行った。レシピエントには、8–14週齢の雌Wistarラットを使用し、胚移植の前日に15–80週齢の精管結紮Wistar雄ラットと交配させ偽妊娠を誘起した。E20P10添加保存液でガラス化保存した2細胞期胚を加温し、レシピエントの卵管に移植した。移植日の21日後に産子を確認した。

### 統計処理

パーセントのデータはarcsin変換し、統計処理に使用し

た. 得られたデータは one-way ANOVA および Tukey-Kramer 検定を用いて多重比較し,  $P < 0.05$  で統計上有意な差があると判定した.

## 結果

前核期胚から胚盤胞までの異なる発生ステージのラット初期胚を E15D15 保存液でガラス化保存し, 加温後の生存率および胚盤胞への発生率を調べたところ, 生存率は全ステージで 90% 以上 (前核期胚:  $98.6 \pm 1.0\%$ , 2細胞期胚:  $95.9 \pm 1.7\%$ , 4細胞期胚:  $95.8 \pm 4.2\%$ , 8細胞期胚:  $91.9 \pm 2.8\%$ , 桑実胚:  $98.7 \pm 2.8\%$ , 胚盤胞:  $90.5 \pm 1.4\%$ ) を示し, 各ステージ間に有意な差はみられなかった ( $P > 0.05$ ) (図1). また, 胚盤胞への発生率は桑実胚 ( $75.3 \pm 4.1\%$ ) が最も高く, 前核期胚 ( $33.8 \pm 4.9\%$ ), 2細胞期胚 ( $46.5 \pm 4.9\%$ ) および 4細胞期胚 ( $44.9 \pm 8.2\%$ ) に対し有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (図1).

次に, 我々のマウス未受精卵および前核期胚における先行研究<sup>6,7)</sup>のなかで良好な生存性, 胚発生能および産子への発育能を示した E20P10 保存液で同様に前核期胚から胚盤胞までの異なる発生ステージのラット初期胚をガラス化保存し, 生存率および胚盤胞への発生率を調べた. その結果, 生存率は全ステージで 95% 以上を示し (前核期胚:  $96.5 \pm 1.6\%$ , 2細胞期胚:  $95.1 \pm 2.5\%$ , 4細胞期胚:  $100\%$ , 8細胞期胚:  $100\%$ , 桑実胚:  $100\%$ , 胚盤胞:  $97.6 \pm 1.6\%$ ), 各ステージ間に有意差はみられなかった ( $P > 0.05$ ) (図2). 胚盤胞への発生率は 8細胞期胚 ( $90.2 \pm 2.4\%$ ) および桑実胚 ( $85.7 \pm 2.9\%$ ) が前核期胚 ( $63.9 \pm 3.7\%$ ) に対して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (図2). E20P10 保存液で保存したラット初期胚の発生率は, すべてのステージにおいて E15P15 よりも高い割合を示した.

さらにガラス化保存したラット初期胚が, 産子への発生能を有するかを明らかにするため, E20P10 保存液でガラス化保存した 2細胞期胚を加温した後, 胚移植を行った. ガラス化保存した 2細胞期胚 39 個を 3 匹のレシピエントに移植した結果, 移植したすべてのレシピエントから産子が得られ, 産子数は計 15 匹であり, 産子率は 38.5% であった. 対照区として, 78 個の新鮮な 2細胞期胚を 4 匹のレシピエントに移植したところ, 産子数は 31 匹であり, 産子率は 39.7% であった.

## 考察

近年 CRISPR/Cas9 をはじめとするゲノム編集技術の発展により, ノックアウト, ノックインも含めた数多くの遺伝子改変ラットが作製され, 研究に用いられている<sup>14-16)</sup>. これらの遺伝子改変ラットを不慮の事故や疾病あるいは自然の突然変異などから, バイオリソースとして守るためには生殖細胞での保存が必須となる. ナショナルバイオリソースプロジェクト (National BioResource Project, NBRP) ラットでは, 精子あるいは 2細胞期胚での保存が行われており<sup>17,18)</sup>, 凍結精子を用いた人工授精<sup>19)</sup>, 体外受精<sup>20)</sup>, 顕微授精<sup>21)</sup>などの

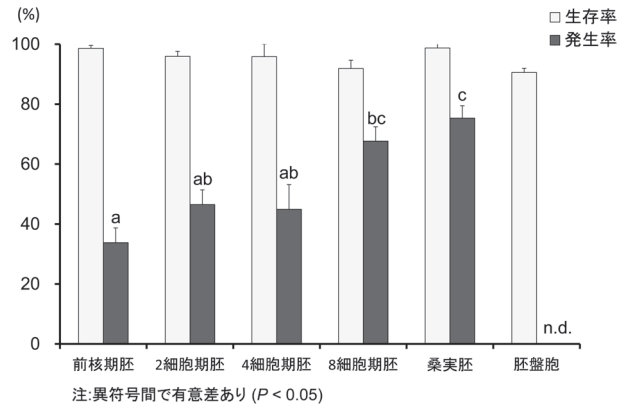


図1 E15D15 添加液を用いてガラス化保存したラット初期胚における加温後の生存率および胚盤胞への発生率

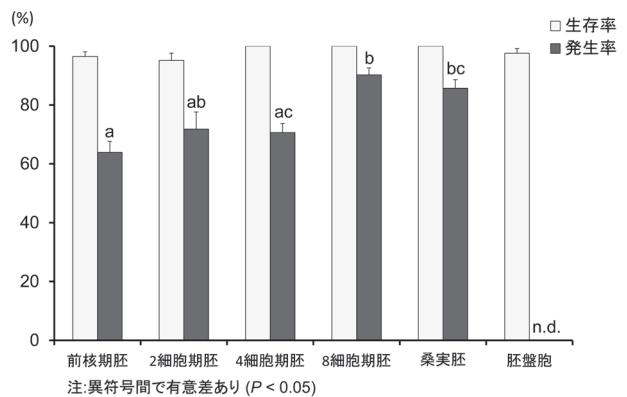


図2 E20P10 添加液を用いてガラス化保存したラット初期胚における加温後の生存率および胚盤胞への発生率

生殖技術により個体復元されている. これらの生殖技術には, 特殊な設備あるいは熟練した技術が必要となる.

一方, 2細胞期胚を含めた初期胚での保存は, レシピエントの卵管および子宮に胚移植することで産子が得られることから, マウスにおいても広く用いられている有用な保存法である. これまでに多くの研究者によってラット初期胚の保存法の開発が行われており, EFS40 を用いたガラス化法<sup>3)</sup>や P10 および PEPeS 法<sup>22)</sup>等が報告されているが, ラットの初期胚は低温への感受性が高く, 保存後の生存率および胚発生率が低いことが知られていた<sup>2,23)</sup>.

我々は, これまでにヒト生殖医療で用いられている最小容量ガラス化法に着目し, E15D15 保存液を用いることで, ラット前核期胚の保存に成功している<sup>5)</sup>. また新規 CPA である COOH-PLL を用いることで, マウス未受精卵<sup>6)</sup>, 前核期胚<sup>7)</sup>, さらにブタ前核期胚<sup>8)</sup>の保存にも成功している. 本実験においても E15D15 保存液, E20P10 保存液のどちらで保存したラット初期胚でも高い生存性を示し, 多くの胚が発生することが明らかにされた. また, E20P10 保存液でガ

ラス化保存したラット初期胚は、E15D15保存液で保存したもののより優れた発生能を示した。さらにE20P10保存液に関しては胚移植後、新鮮胚と同等に産子へと発生することも確認した。

COOH-PLLは不凍タンパク質様の性質を示し、凍結や融解の際の氷の再結晶化を防ぐ効果から、ヒトiPS細胞やマウス線維芽様細胞などにおいて超低温保存後の生存性を改善することが報告されている<sup>9, 10)</sup>。我々の以前の研究において、蛍光色素を付着したCOOH-PLLを用いてマウス未受精卵のガラス化保存を行った結果、COOH-PLLはほとんど卵細胞質内には取り込まれなかったことから、卵を外部から保護することで保存後の高い生存性や発生率を維持したと考えている<sup>6)</sup>。本実験においてもCPAの一部をEGからCOOH-PLLに置き換えることで、前核期胚から胚盤胞までのすべてのラット初期胚のステージにおいて、超低温保存が可能であることが示された。本研究の方法は、NBRPなどのバイオリソースにおいても有用であると考えられる。

## 文 献

- 1) Charreau, B., Tesson, L., Soulillou, J.P., Pourcel, C. and Anegon, I. (1996): Transgenesis in rats: technical aspects and models. *Transgenic. Res.*, 5, 223–234.
- 2) Meek, S., Mashimo, T. and Burdon, T. (2017): From engineering to editing the rat genome. *Mamm. Genome.*, 28, 302–314.
- 3) Han, M.S., Niwa, K. and Kasai, M. (2003): Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, 59, 1851–1863.
- 4) Kuwayama, M. (2007): Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67, 73–80.
- 5) Seita, Y., Okuda, Y., Kato, M., Kawakami, Y., Inomata, T., Ito, J. and Kashiwazaki, N. (2009): Successful cryopreservation of rat pronuclear-stage embryos by rapid cooling. *Cryobiology*, 59, 226–228.
- 6) Watanabe, H., Kohaya, N., Kamoshita, M., Fujiwara, K., Matsumura, K., Hyon, S.H., Ito, J. and Kashiwazaki, N. (2013): Efficient production of live offspring from mouse oocytes vitrified with a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine. *PLoS One*, 8, e83613.
- 7) Shibao, Y., Fujiwara, K., Kawasaki, Y., Matsumura, K., Hyon, S.H., Ito, J. and Kashiwazaki, N. (2014): The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage. *Cryobiology*, 68, 200–204.
- 8) Kamoshita, M., Kato, T., Fujiwara, K., Namiki, T., Matsumura, K., Hyon, S.H., Ito, J. and Kashiwazaki, N. (2017): Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine. *PLoS One*, 12, e0176711.
- 9) Matsumura, K. and Hyon, S.H. (2009): Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials.*, 30, 4842–4849.
- 10) Matsumura, K., Bae, J.Y. and Hyon, S.H. (2010): Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. *Cell Transplant.*, 19, 691–699.
- 11) Whittingham, D.G. and Wales, R.G. (1969): Storage of two-cell mouse embryos in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22, 1065–1068.
- 12) Oh, S.H., Miyoshi, K. and Funahashi, H. (1998): Rat oocytes fertilized in modified rat 1-cell embryo culture medium containing a high sodium chloride concentration and bovine serum albumin maintain developmental ability to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 59, 884–889.
- 13) Fujiwara, K., Kamoshita, M., Kato, T., Ito, J. and Kashiwazaki, N. (2017): Generation of rats from vitrified oocytes with surrounding cumulus cells via in vitro fertilization with cryopreserved sperm. *Anim. Sci. J.*, 88, 180–184.
- 14) Yu, D., Zhong, Y., Li, X., Li, Y., Li, X., Cao, J., Fan, Z., Fan, H., Yuan, L., Xu, B., Yuan, Y., Zhang, H., Ji, Z., Wen, J.G., Zhang, M., Nesland, J.M. and Suo, Z. (2016): Generation of TALEN-mediated FH knockout rat model. *Oncotarget*, 7, 61656–61669.
- 15) Yu-Taeger, L., Ott, T., Bonsi, P., Tomczak, C., Wassouf, Z., Martella, G., Sciamanna, G., Imbriani, P., Pontorio, G., Tassone, A., Schulze-Hentrich, J.M., Goodchild, R., Riess, O., Pisani, A., Grundmann-Hauser, K. and Nguyen, H.P. (2019) Impaired dopamine- and adenosine-mediated signaling and plasticity in a novel rodent model for DYT25 dystonia. *Neurobiol. Dis.*, 134, 104634.
- 16) Ma, Y., Yu, L., Pan, S., Gao, S., Chen, W., Zhang, X., Dong, W., Li, J., Zhou, R., Huang, L., Han, Y., Bai, L., Zhang, L. and Zhang, L. (2017): CRISPR/Cas9-mediated targeting of the Rosa26 locus produces Cre reporter rat strains for monitoring Cre-loxP-mediated lineage tracing. *FEBS J.*, 284, 3262–3277.
- 17) Nakatsukasa, E., Kashiwazaki, N., Takizawa, A., Shino, M., Kitada, K., Serikawa, T., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Takahashi, R., Ueda, M., Nakashima, T. and Nakagata, N. (2003): Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats. *Comp. Med.*, 53, 639–641.
- 18) Kashiwazaki, N., Seita, Y., Naoi, K., Takizawa, A., Kuramoto, T. and Serikawa, T. (2007): Generation of rat offspring derived from cryopreserved spermatozoa in Japanese national bioresources. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19, 124–125.
- 19) Nakatsukasa, E., Inomata, T., Ikeda, T., Shino, M. and Kashiwazaki, N. (2001): Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 degrees C. *Reproduction*, 122, 463–467.
- 20) Seita, Y., Sugio, S., Ito, J. and Kashiwazaki, N. (2009): Generation of live rats produced by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Biol.*



- Reprod., 80, 503–510.
- 21) Hirabayash, M., Kato, M., Aoto, T., Sekimoto, A., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N. and Hoshi, S. (2002): Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Res.*, 11, 221–228.
- 22) Eto, T., Takahashi, R., Kamisako, T., Hioki, K. and Sotomaru, Y. (2014): A study on cryoprotectant solution suitable for vitrification of rat two-cell stage embryos. *Cryobiology*, 68, 147–151.
- 23) Takahashi, R., Hirabayashi, M. and Ueda, M. (1999): Production of transgenic rats using cryopreserved pronuclear-stage zygotes. *Transgenic Res.*, 8, 397–400.