

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05550

研究課題名（和文）非破壊的可視化による配偶子インテグリティの予見

研究課題名（英文）Non-invasive prediction of gamete integrity

研究代表者

八幡 穰（Yawata, Yutaka）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：10586457

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 73,000,000円

研究成果の概要（和文）：1）マウス卵子の受精能予測：マウスの卵子集団は、生体由来の集団も、体外成熟由来の集団も、必ず受精・発生能力のないものが含まれている。本研究では自家蛍光の分析により、受精能の無い未成熟卵子を非破壊的に判別する技術が開発された。2）マウス精巣の構造可視化：精巣は、精原細胞とそれを補助する細胞により構成される。本研究では各細胞種が独特の自家蛍光の特徴をもっていることを明らかにし、手を加えない精巣組織構造の解析を可能とした。3）魚類生殖細胞の分取：代理新魚技術は、希少種の保全などへの活用が期待される技術である。本研究では生殖細胞のみを自家蛍光の特徴に基づいて分取する技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1）マウス卵子の受精能予測については、受精能のない卵子を非破壊的に見分けることで、将来的に体外受精効率の向上に資する可能性がある。2）マウス精巣の構造可視化については、手を加えない精巣組織構造の解析が可能となることで、精巣の機能や発達過程の理解に資することが期待される。3）魚類生殖細胞の分取では、代理新魚技術などの改善に役立つことが期待できるだけでなく、非モデル生物における細胞分取技術を確立したところに意義があるといえる。

研究成果の概要（英文）：1）Fertility prediction for mouse eggs: A population of mouse eggs, regardless of grown under in vivo or in vitro conditions, contains infertile individuals. In the present study, we developed a non-invasive method to detect the infertile eggs by innate fluorescence signature analysis. 2) Tag-free 3D visualization of mouse testis: A mouse testis consists of germ cells and feeder cells. In the present study, we found the innate fluorescence signature characteristic to each cell types and developed a tag-free 3D visualization of testis structure based on innate fluorescence. 3) Tag-free cell sorting technology: We developed a tag-free method to enrich specific types of cell from a mixed population using a combination of single-cell innate fluorescence analysis and cell-sorting technology.

研究分野：一細胞生態学

キーワード：配偶子 自家蛍光 CRIF 共焦点顕微鏡 機械学習

1. 研究開始当初の背景

*in vitro gametogenesis*で作られる配偶子のインテグリティ(完成度、発生能)は、生体内で産生される配偶子と比べて著しく低い。この原因の解明には、配偶子や配偶子形成過程の細胞のインテグリティを予見する技術が極めて重要である。しかし、インテグリティを非破壊的に予見する方法は、これまで存在しなかった。

研究代表者はこれまでに、細胞の内在性蛍光パターンを分析する CRIF 解析法(confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis)を世界に先駆けて開発し、これにより細胞の生理状態を無処理、非破壊で診断することに成功している。細胞内のタンパクや代謝産物は様々な種類・強弱の自家蛍光を有しており、それらを総合した内在性蛍光パターンは細胞の代謝状態を表現する“指紋”として機能する。内在性蛍光パターンに潜在する代謝状態ごとの特徴を人間が認識することは難しいが、機械学習(畳み込みニューラルネットワーク)を用いることで高精度かつ客観的な識別が可能になる。例えば研究代表者は、大腸菌において細胞の老化とともに内在性蛍光パターンに特徴的な長波長シグナルが現れ、さらにこれに基づいて1細胞の年齢(増殖相)を識別するシステムの構築に成功している。内在性蛍光パターンは、生きた1細胞の内部を顕微鏡でスキャンすることで光学的に記録し、侵襲的な操作や染色などの前処理を必要としない。尾畑班と事前に実施した予備的な実験では、生体由来の卵子と *in vitro* 由来の卵子を内在性蛍光パターンに基づいて>99%の正答率で識別することに成功しており、さらにスキャン操作がその後の発生能に影響を与えないことも確認されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、この技術を基盤とし、配偶子のインテグリティを非破壊的かつ定量的に評価する技術を確立することを目的とした。この技術の完成により、*in vitro gametogenesis*においてインテグリティの高い配偶子や配偶子形成過程の細胞を予見的に同定することが可能になる。この技術によりインテグリティを担保する遺伝子の同定や培養条件等の検討に資することを目指した。

3. 研究の方法

インテグリティを予見する革新的技術基盤の確立

本研究項目では CRIF 解析法を原始卵胞など立体的組織の内在性蛍光パターンを解析できる3次元解析手法に発展させることを目指した。生きた組織の内部を共焦点顕微鏡で断層撮影しながら各細胞の内在性蛍光パターンを記録する方法の開発を行った。具体的には内在性蛍光パターンをスキャンするために、4つの励起波長で順番に組織内を照明し、それぞれの励起波長について戻ってきた蛍光の強さと波長を記録する顕微鏡制御プログラムと、得られた撮影データから一細胞ごとの内在性蛍光パターンを再構築する画像処理アルゴリズムを作成した。

卵子のインテグリティ予見システム開発

本研究項目では内在性蛍光パターンと卵子のインテグリティとの相関を解明することを目指す。*in vitro*でPGCから産生されたマウス卵子集団内の一細胞ごとに内在性蛍光パターンを観測して記録した後に、観察した卵子を回収し、発生能解析を行い、胚盤胞への発生が内在性傾向パターンから予測できるかを検証した。

精子のインテグリティ予見システム開発

本研究項目では、内在性蛍光パターンと精子のインテグリティとの相関を解明することを目指した。マウス精巣の内在性蛍光パターンの分布の可視化する手法を開発した。また様々な環境で器官培養したマウス精巣との内在性蛍光パターンを比較することで内在性蛍光パターンと精子の生産能力との相関を調査する研究を進めた。

魚類生殖細胞の識別技術開発

林班(東京海洋大学吉崎教授:研究分担者)との連携で、魚類精巣内の細胞集団の不均一性を自家蛍光によりマッピングする手法の開発を目指した。まず生殖細胞と体細胞を自家蛍光により識別できるかを検討を行った。この結果に基づき、セルソーティングの設定を最適化することで、生殖細胞と体細胞を自家蛍光により Tag-free で分取できるかを検討した

4. 研究成果

インテグリティを予見する革新的技術基盤の確立

本研究項目では CRIF 解析法を配偶子の解析に適するように発展させ、原始卵胞など立体的組織の内在性蛍光パターンを解析できる 3 次元解析手法の基盤を構築することを目指した。今回の研究では生きた組織の内部を共焦点顕微鏡で断層撮影しながら各細胞の内在性蛍光パターンを記録する方法を開発することを一つのマイルストーンとしてきた。内在性蛍光パターンをスキャンするために、4 つの励起波長で順番に組織内を照明し、それぞれの励起波長について戻ってきた蛍光の強さと波長を記録する顕微鏡制御プログラムと、得られた撮影データから一細胞ごとの内在性蛍光パターンを再構築する画像処理アルゴリズムを作成した。上記の研究から得られた成果をアメリカ微生物学会の発光する Applied and Environmental Microbiology 誌に発表したほか、国際学会における招待講演 1 件を含む 8 件の発表を行った。本成果を基盤として、マウス精巣内の tag-free 三次元モルフォロジー解析(下記)などの成果が得られている。

卵子のインテグリティ予見システム開発

この研究項目では領域内連携(尾畑班)により内在性蛍光パターンと卵子のインテグリティとの相関をモデル化することを目指した。内在性蛍光パターンと受精能および発生能の相関を機械学習モデルに学習させ、内在性蛍光パターンに基づいて発生能を予測するシステムの構築に取り組んだ。尾畑班からの技術移転を受け、八幡班でも *in vitro* で PGC からマウス卵子を産生する基盤を整えた。同時に八幡班から尾畑班に共焦点顕微鏡による自家蛍光撮影技術を技術移転し、二拠点で連携しながらマウス卵子の自家蛍光解析が可能な世界でも類のない研究環境を構築した。

観察デバイスの開発 本研究では、マウス卵子の安定的かつ高スループット観察に向けて、新たな観察デバイス群の開発を行った。具体的には、1) 共焦点スペクトル顕微鏡によるスキャンとその後の発生運命の追跡を可能にする高密度多穴マイクロウェルデバイスの開発と、2) 原始生殖腺の発生過程の経時観察と回収を可能にする連続培養デバイス、3) 培地交換の自動化に対応したメンブレンインサート計上を開発している。1) の高密度多穴デバイスでは、共焦点顕微鏡の視野に 5 ウェルが収まる高密度実装を実現するために、高精度マシニングによる PDMS 素材への穴開け技術を開発している。2) の連続培養デバイスでは、原始生殖腺を培養後、卵胞を採取することに成功している。3) のメンブレンインサートでは、形状についての特許を出願している(特願 2021-039055)。

卵子成熟条件と内在性蛍光パターンの関係の検討 尾畑班の研究から、in vitro で成熟した卵子は、in vivo で成熟した卵子と比べてインテグリティが低く、受精率などが低いことが分かっている。また、同じく尾畑班の研究から、in vitro で成熟させる場合には、酸素濃度 7% 雰囲気下では同酸素濃度 20% より受精率が大幅に改善されることが明らかとなってきた。そこでこの研究項目では、こうした種々の成熟条件と内在性蛍光パターンの間の関係を検討した。種々の条件で成熟させたマウス M2 期卵の内在性蛍光パターンを取得し、多変量分析(PCA)を行った。その結果、より受精率が高い条件ほど、PCA 空間内の特定主成分が低い領域に分布する蛍光が観察された。主成分への寄与率の分析から、おもに青色 緑色の自家蛍光が弱いことが、受精率の高い条件の特徴であることが示唆された。

受精能と内在性蛍光パターンの関係の検討 上記の結果を受けて、M2 期卵の自家蛍光パターンから、受精能、発生能を予測できるか検討した。in vivo で成熟した卵子の内在性蛍光パターンを 1 細胞ごとに取得し、開発した高密度多穴デバイスを用いて、受精能および胚盤胞への発生、さらに胚移植により個体への発生を追跡した。その結果、受精能のない卵子は、青色 緑色の自家蛍光が有意 ($P < 0.01$) に高いことが見いだされた。さらに、取得したデータを用いて、予測受精能をスコア化する機械学習モデル(CNN)を訓練した。このモデルで低スコアとされた卵子と、高スコアと評価された卵子では受精が成功する確率に大きな差 (67% vs 9%) が確認された。この低スコア卵子についてさらに分析を進めたところ、低スコア卵子では細胞の中央部に青色 緑色の自家蛍光が局在しているのに対し、高スコア卵子ではより均一に分布している特徴が見いだされた。また染色実験の結果から、この青色 緑色の自家蛍光の空間分布はミトコンドリアの分布とほぼ一致していた。ここから、過剰排卵処理によって得られた卵子のグループに含まれた低スコア卵子は、M2 期卵として未熟な物であることが示唆された。この受精能予測技術については特許を出願している他(特願 2022-043135)、マウス卵子の自家蛍光の特徴についての報告を準備中である。

精子のインテグリティ予見システム開発

この研究では領域内連携(小川班)により内在性蛍光パターンにより、器官培養された精巣でのマウス精子の発生能改善に資する技術の開発を目指した。

マウス精細管内の tag-free 三次元モルフォロジー解析 この研究では、器官培養されたマウス精細管の構造的特徴を tag-free で可視化できる方法を、小川班との連携により開発した。精細管の自家蛍光パターンの分析から、精細管内部には大きく分けて 3 つの特徴的な領域が組み合わさって構成されている様子が可視化された。その内二つは特徴的な自家蛍光のピークを持ち、残りの一つは殆ど可視領域での自家蛍光が観察されなかった。DNA は可視領域での自家蛍光の放出ピークを持たないことから、この“暗い”領域は核であると推定された。この核を取り囲む領域は精原細胞、それに隣接する領域はセルトリ細胞であるとそれぞれ推定された。そこで、精細管をマイクロデバイスにより固定し、自家蛍光の分布を取得した後に、免疫染色を行い、それぞれの領域のアノテーションを行った。その結果、上記の推測が正しいことが確かめられた。この結果から、精細管内部の体細胞と精原細胞の分布を tag-free で可視化し、さらにその時間発展を探求するための技術基盤が構築された。この成果については、論文発表を準備中である。

tag-free ソーティング技術の開発

この研究では、林班(東京海洋大学吉崎教授: 研究分担者)との連携で非モデル生物において組織から目的の細胞を tag-free で分取する技術の構築を目指した。希少生物や食用動物など、伝

統的に“モデル”生物でなかった生物について、遺伝子組み換えや抗体作成の困難から、セルソーティングの適用が難しい。こうした生物についても、例えば生殖腺からの生殖細胞の分離を可能にする技術の確立を行った。

生殖腺内の細胞集団の一細胞自家蛍光パターン分析 ニジマス精巣から細胞集団を採取し、一細胞ごとに自家蛍光パターンの分析を行った。その結果から、上記マウスの精細管の場合と同じように、精巣は異なる自家蛍光の特徴を持った少なくとも 2 種類の細胞から構成されることが明らかとなった。

亜集団分離に向けたソーティング光学系設計アルゴリズム 観察された自家蛍光の特徴に基づき、セルソーターで亜集団を分離できる確立が高い分光光学系を提案するアルゴリズムを構築した。

Tag-free での精原細胞濃縮 上記のアルゴリズムに従ってセッティングしたセルソーターを用いて、精原細胞の濃縮が可能であるかを検討した。各ゲートで選別されたフラクションの発現解析をおこなったところ、精原細胞が有意に濃縮されることが確認された。本研究は代理親魚技術の効率向上の 1 手段となりえるだけでなく、今後資源保護や食料生産のために重要さを増す非モデル生物の研究に資することが期待される。この研究の成果については論文発表を準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okano Chigusa, Takabe Kyosuke, Hirayama Tomohiro, Nomura Nobuhiko, Yawata Yutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Three-dimensional morphology of bacterial community developed on the index-matched materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98943-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yawata Yutaka, Kiyokawa Tatsunori, Kawamura Yuhki, Hirayama Tomohiro, Takabe Kyosuke, Nomura Nobuhiko	4. 巻 85
2. 論文標題 Intra- and Interspecies Variability of Single-Cell Innate Fluorescence Signature of Microbial Cell	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00608-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 11件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yutaka Yawata
2. 発表標題 Behavioral Ecology of Environmental Microorganisms
3. 学会等名 IEEE-NANOMED（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutaka Yawata
2. 発表標題 Behavioral Ecology of Environmental Microorganisms
3. 学会等名 interdisciplinary discussions and seminars, universe science observatory in Rennes, France（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高部 響介 相木 泰彦 鈴木 慧 野村 暢彦 伊藤 弓弦 八幡 穰
2. 発表標題 自家蛍光イメージングと機械学習を組み合わせた ヒトiPS細胞品質管理技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hikaru shiohara, Yiyun Zhang, Nobuhiko Nomura, Yutaka Yawata
2. 発表標題 自家蛍光シグネチャー解析による微生物細胞死の時空間ダイナミクスの追跡
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩井 友香、張 譚云、野村 暢彦、八幡 穰
2. 発表標題 自家蛍光解析による包装済み食品の検査
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yawata Y, Chigusa Okano, Kyosuke Takabe, Nobuhiko Nomura, Katsuki Hara, Ayumi Hiroki, Yuka Iwai
2. 発表標題 Innate fluorescence predicts mitochondrial distribution dependent developmental fate of mouse oocytes
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 微生物の採餌行動とその多様性
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野 千草, 高部 響介, 平山 智弘, 野村 暢彦, 八幡 穰
2. 発表標題 低酸素環境下における緑膿菌バイオフィルムの3次元形態
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 細胞自家蛍光分析による非破壊的細胞診断
3. 学会等名 大阪商工会議所 次世代医療システム産業化フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原克樹、Zhang Yiyun、岡野千草、高部響介、八幡穰
2. 発表標題 自家系シングネチャーに基づくマウス卵細胞の質評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 微生物の行動生態学 とライブ可視化技術
3. 学会等名 新学術領域研究 超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学 第1回 公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 様々な時間軸と微生物の行動生態
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 微生物の行動生態学とライブ可視化
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会若手の会 秋のシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 細胞自家蛍光分析による非破壊的細胞診断
3. 学会等名 大阪商工会議所 次世代医療システム産業化フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Yawata
2. 発表標題 Single-Cell Innate Fluorescence Analysis by Confocal Microspectroscopy
3. 学会等名 TSB2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Yawata、Kyosuke Takabe、Nobuhiko Nomura
2. 発表標題 Single-Cell Innate Fluorescence Analysis by Confocal Microspectroscopy
3. 学会等名 - 日本顕微鏡学会第62回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Yawata、Kyosuke Takabe、Nobuhiko Nomura
2. 発表標題 Single-Cell Innate Fluorescence Analysis by Confocal Microspectroscopy
3. 学会等名 - 日本顕微鏡学会第62回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 カルチャーインサート	発明者 八幡 穰、今村 明 美、廣木 亜由美	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-039055	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞の表現型と自家蛍光の対応データ作成方法及びデータ使用方法	発明者 八幡穰 他5名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-029169	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 補正パラメータ設定方法及びデータ補正方法	発明者 八幡穰、八幡志央 美、岡野千草、野村 暢彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-019344	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 品質評価方法及び品質評価プログラム	発明者 八幡 穰 他7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-043135	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 処理システム、データ処理装置、表示システム及び顕微鏡システム	発明者 八幡穰、野村暢彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、7336654	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

八幡研究室 https://yawatalab.jp

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡野 千草 (Okano Chigusa)	筑波大学・生命環境系・博士研究員 (12102)	
研究協力者	高部 響介 (Takabe Kyosuke)	筑波大学・生命環境系・博士研究員 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------