

平成30年6月14日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10692

研究課題名(和文) 初期胚・多能性幹細胞培養におけるオクタン酸を中心とした脂肪代謝の研究

研究課題名(英文) Effect of Octanoic acid and lipid metabolism in preembryo and pluripotent stem cells culture

研究代表者

久慈 直昭 (KUJI, NAOAKI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80169987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：市販されているヒト体外受精培養液には、遺伝子組み換えアルブミン製剤を含めて500uM-1000uM程度のオクタン酸が含まれており、遺伝子組み換えアルブミンのみを用いた場合は100uM程度と非常に低い。さらにF1マウスおよび純系マウスを用いて、オクタン酸126uMの基礎培養液に0-1200uMのオクタン酸を加えて培養すると、800uM-1200uM添加群で明らかに発生スピード、着床率が低下し、胚盤胞の遺伝子発現・出生後体重にも差が見られた。

研究成果の概要(英文)：It was demonstrated that commercially available human in-vitro fertilization medium had contained 500uM-1000uM octanoic acid, using mass spectrometric analysis. Using F1 and inbred mice in-vitro fertilized embryo, several effects were recognized in the medium containing 800 and 1200uM of OA ; 1) in vitro embryo development (up to blastocyst stage) were delayed and disturbed, 2) implantation rates were decreased and 3) body weight were decreased after 179days after birth. Gene expression analysis revealed that expression pattern were different in several genes, including imprinting genes.

研究分野：産婦人科学(生殖医学)

キーワード：マウス 体外受精 オクタン酸 胚発生 インプリンティング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、ヒト体外受精由来出生児でインプリント異常疾患の増加や、自然妊娠児との出生体重の差が報告されていることから、ヒトにおける体外受精・胚培養操作によって胚がうける影響についての関心が高まっている。卵巣刺激、体外受精、体外胚培養、黄体補充など多数の介入的医療技術から成り立っている体外受精法の中でも、初期胚培養液は体外受精法を用いるかぎり使用が必須であり、それ故最も根本的技術であるといえる。しかしその初期胚培養液は、組成の差が初期胚発生能・細胞数や遺伝子発現プロファイルに影響していることがマウスを用いた複数の報告からすでに示されており<sup>1)</sup>、またこれだけ普及したヒト体外受精に用いられる各社の培養液間でもメチル化維持の程度が明らかに異なっていることがマウスを用いた実験で示されている<sup>2)</sup>。

各培養液によって初期胚培養成績に差がある理由の一つに、成分中唯一その組成が化学的に決定されていないヒト血清アルブミンの存在がある。ヒト血清アルブミンは現在ヒト体外受精に用いられているほとんどすべての初期胚培養液に含まれるが、本質的に血漿分画製剤であるためにアルブミンタンパク以外の微量成分をロットにより様々な濃度で含んでいる。さらに血清アルブミンには、混入ウイルス不活化の目的で用いられる60、10時間の低温殺菌に伴うアルブミン重合抑制のために、(遺伝子組み換えアルブミンも含めて)中鎖脂肪酸であるオクタン酸(octanoic acid、以下OA;別名カプリル酸)が約5-10M(培養液により異なる)添加されている。

ここで我々は、マウス初期胚培養過程においてこの添加されるOAが培養液中から減少していること、さらにOAがTCA cycleに取り込まれて初期胚のエネルギー代謝にかかわっていること、および脂肪酸除去アルブミン

へOAを添加することで胚発生率が改善することを、メタボローム解析を用いて偶然発見した<sup>3)</sup>。OAはパルミチン酸やステアリン酸などの長鎖脂肪酸と異なり水溶性であり、また脂肪のATP産生経路(-酸化経路)が存在するミトコンドリアに取り込まれる際、カルニチン-CPT系を必要としないために、速やかにエネルギー源として利用される。さらにこの酸化は卵子核成熟<sup>4)</sup>や初期胚発生<sup>5)</sup>の際に必須であると報告されている。

(2) このように体外受精の臨床では、初期胚のエネルギー代謝や発生に大きく関与しているOAを、(低温殺菌の間にかかる重合抑制のためという)別の目的で無意識に添加してきたことになる。従って今後、初期胚培養液中のアルブミンを遺伝子組み換え由来のものに置換したり、別のタンパクで置換したりしてchemically-definedな培養液を開発する際には、これまで添加していたOAの初期胚への影響を知っておくことが(これまでのヒト初期胚培養成績を正しく理解するためにも)必須である。

## 2. 研究の目的

本研究では、現在アルブミンの安定化剤としてほぼすべての初期胚培養液に添加されている中鎖脂肪酸オクタン酸の、マウス初期胚の増殖・分化、および初期胚から由来する胎仔への影響を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) (2015-2016年度)同位体を標準品として用い、質量分析によりヒト体外受精培養液中(Sydney-IVF社 cleavage medium, Vitrolife社 G1+5%GMM, および G1+5%HSA) および遺伝子組み換えアルブミン(Ibuki, Bioverde社)を0.1%(w/v)含むKSOM溶液中のオクタン酸濃度を質量分析にて解析した。なお、Vitrolife社GMMは遺伝子組み換えアルブミンである。

(2)(2015-2016年度)B6C3F1マウスとICRオスマウスの交配による受精卵を用いて、OA添加によるマウス胚発生への影響を、遺伝子組み換えアルブミン(OA不含;IBUKI™、BioVerde)にOAを適量添加してタンパク源として加え培養した。

(3)(2016-2017年度)遺伝的背景を均一にするため実験に用いるマウスに雄、雌とも純系(C57BL/6N CrI、日本チャールスリバー)を用い、各胚で受精からの時間を一定にするために体外受精により胚を作成した。培養液へのオクタン酸添加濃度0、400、800、1200 $\mu$ Mの各群で体外培養での胚発生、および移植による産仔への発生、そして産後の発育(体重等)を観察するとともに、発生した胚盤胞で遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) cleavage medium, G1+5%GMM, G1+5%HSA, 0.1%Ibuki加KSOM中のオクタン酸濃度は、それぞれ644、624、806、121.5 $\mu$ Mであり、遺伝子組み換えアルブミンを用いた培養液(GMM)であっても624 $\mu$ Mと高値であった。このOA(C8:0)濃度は、C10:0からC18:0の飽和脂肪酸濃度がそれぞれ10-100 $\mu$ M程度であるのに比較してはるかに高かった。

(2) オクタン酸を0、500、1000、3000 $\mu$ M添加した0.1%Ibuki加KSOM中での2細胞期胚の48時間後の胚盤胞発生率は、77、85、92、50%と、有意差はないが3000 $\mu$ M添加群で低い傾向を認めた。このことからOAはマウス胚培養における胚発生効率に影響し、非添加群より1000 $\mu$ M程度の添加群でむしろ発生率が高い可能性があり、以後の実験は500-1000 $\mu$ MのOAをIBUKIに添加して行うのが妥当であると考えられた。

(3) 胚培養の結果、72時間での胚盤胞発生率は0、400、800、1200 $\mu$ M添加群でそれぞれ

58.8、37.0、29.0、14.8%で、400 $\mu$ M以上の添加で発生スピードが低下する傾向を認めた。96時間の胚盤胞発生率は同様に0、400、800、1200 $\mu$ M添加群でそれぞれ93.8、87.0、73.0、80.2%で、800 $\mu$ M以上の添加で発生スピードが低下する傾向を認めた。72時間で胚盤胞に発生した胚の移植実験では、0、400、800、1200 $\mu$ M添加群で総着床数はそれぞれ61.3、60.3、48.9、28.0%、産仔数はそれぞれ23.8、28.8、20.2、8.6%で、いずれも1200 $\mu$ M添加群で着床・産仔への発生が低下する傾向を認めた。96時間で胚盤胞へ発生した胚の遺伝子発現解析では、インプリント遺伝子を含む遺伝子の発現変化が見られた。また出生後179日目以降の体重は、OA無添加群に比較して雄、雌とも800、1200 $\mu$ M添加群で低下する傾向を認めた。

結論として、市販されているヒト体外受精培養液には、遺伝子組み換えアルブミン製剤を含めて500 $\mu$ M-1000 $\mu$ M程度のオクタン酸が含まれており、遺伝子組み換えアルブミンのみを用いた場合は100 $\mu$ M程度と非常に低いことが確認された。さらにF1マウスおよび純系マウスを用いた実験では、800 $\mu$ M-1200 $\mu$ M添加群では明らかに発生スピード、着床率が低下し、胚盤胞の遺伝子発現・出生後体重にも差が見られた。オクタン酸濃度の高いヒト体外受精培養液では胚発生への影響が懸念され、ヒト細胞を用いた検証が望まれる。

#### <引用文献>

1) Denomme MM, Mann MR. Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction*. 2012 Oct;144(4):393-409.

2) Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MR. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse

model: suboptimal in vitro culture interferes

with imprint maintenance. Biol Reprod. 2010 Dec;83(6):938-50.

3 ) Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A

medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. Sci Rep. 2012;2:930.

4 ) Valsangkar D, Downs SM. A requirement for fatty acid oxidation in the hormone-induced meiotic maturation of mouse oocytes. Biol Reprod. 2013 Aug 29;89(2):43.

5 ) Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. Biol Reprod. 2010 Dec;83(6):909-18.

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Thapa Yelungka, 伊東 宏絵, 久慈 直昭, 小島 淳哉, 久保田 海雄, 井坂 恵一  
イソフラボンが子宮内膜癌細胞において STAT3 の発現を抑制し、細胞増殖を阻害する 東京医科大学雑誌(0040-8905)75 巻 4 号 Page442-449(2017.10) 査読有り
2. 佐々木 健吾, 町田 正和, 川崎 友之, 内田 孟, 阪本 靖介, 梅澤 明弘, 笠原 群生, 阿久津 英憲 ヒト多能性幹細胞由来腸管オルガノイドの代謝機能評価 移植 (0578-7947)5 巻 2-3 号 Page288(2017.09) 査読無し
3. 諫田 泰成, 中村 和昭, 山崎 大樹, 片岡

健, 青井 貴之, 中川 誠人, 藤井 万紀子, 阿久津 英憲, 末盛 博文, 浅香 勲, 中村 幸夫, 小島 肇, 関野 祐子, 古江 美保[楠田] 「細胞培養における基本原則」の提案 組織培養研究(0912-3636)36 巻 2 号 Page13-19(2017.05) 査読有り

4. 小島 淳哉, 久慈 直昭, 井坂 恵一 万能幹細胞・幹細胞とゲノム編集-再生医療の進歩が医療を変える産婦人科領域における再生医療とゲノム編集 ES/iPS 細胞からの絨毛分化 臨床婦人科産科(0386-9865)71 巻 5 号 Page451-458(2017.05) 査読無し
5. 上條 慎太郎, 浜谷 敏生, 山田 満稔, 小川 誠司, 阿久津 英憲, 秦 健一郎, 田中 守, 青木 大輔 胚性遺伝子 Kzpi は Differentially methylated regions におけるメチル化を保護して胚発生に寄与する 日本産科婦人科学会雑誌 (0300-9165)69 巻 2 号 Page845(2017.02) 査読無し
6. タバヤルンカ, 伊東 宏絵, 久慈 直昭, 長谷川 瑛, 小島 淳哉, 北水 万里子, 濱田 千代, 井坂 恵一 発情前期 Wistar ラット (Rattus norvegicus) において Cetrotide は排卵前期での黄体形成ホルモン上昇を抑制する東京医科大学雑誌 (0040-8905)75 巻 1 号 Page151-152(2017.01) 査読無し
7. 林 茂空, 久慈 直昭, 原田 紋奈, 長谷川 朋也, 吉田 梨恵, 大石 康文, 小島 淳哉, 長谷川 瑛, 伊東 宏絵, 井坂 恵一 体外受精培養液中のオクタン酸濃度と胚発生への影響 日本生殖医学会雑誌(1881-0098)61 巻 4 号 Page340(2016.10) 査読無し
8. 山田 満稔, 阿久津 英憲, Egli Dieter ヒト卵子は 1 型糖尿病の体細胞核をリプログラミングして 2 倍体の多能性幹細胞を樹立する日本卵子学会誌(2432-0404)1 巻 1 号 Page S50(2016.04) 査読無し

9. 阿久津 英憲 精子・卵子研究から生殖補助医療への新たな展開 多角的ゲノム解析からみる卵子の質評価の可能性 日本卵子学会誌(2432-0404)1 巻 1 号 Page S7(2016.04) 査読無し
10. 高田 ふみ, 阿久津 英憲, 伊東 紀子, 的場 亮 マイクロアレイを用いた1細胞からのゲノムコピー数異常の検出 組織培養研究(0912-3636)35 巻 1 号 Page106(2016.03) 査読無し
11. 村上 裕太, 芳野 雄一, 大野 由尊, 萩屋 啓太, 野見山 早苗, 前川 敏彦, 畠 賢一郎, 阿久津 英憲 細胞増殖・分化 bFGF 結合性リコンビナントタンパク質を用いたヒト iPS 細胞の新規培養法開発 組織培養研究(0912-3636)35 巻 1 号 Page56(2016.03) 査読無し
12. 涌井 隆史, 松原 兼太, 松本 剛, 山口 博司, 阿久津 英憲 培養細胞の画像解析法について 組織培養研究(0912-3636)35 巻 1 号 Page49(2016.03) 査読無し
13. 三木 卓也, 脇谷 晶一, 阿久津 英憲, 梅沢 明弘, 西野 光一郎 ヒト iPS 細胞の Naive 型様への形質転換における未分化維持機構の解析 日本獣医学会学術集会講演要旨集(1347-8621)158 巻 Page413(2015.08)査読無し

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

久慈 直昭 (KUJI, NAOAKI)  
 東京医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：80169987

(2)研究分担者

伊東 宏絵 (ITO, HIROE)  
 東京医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：00307307

研究分担者

井坂 恵一 (ISKA, KEIICHI)  
 東京医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：10201310

研究分担者

阿久津 英憲 (AKUTSU, HIDENORI)  
 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・部長  
 研究者番号：50347225

研究分担者

小田 佳奈子 (ODA, KANAKO)  
 新潟大学・脳研究所・助教  
 研究者番号：60708212

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )