

令和元年5月30日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18399

研究課題名(和文) 過排卵が難しい疾患モデル動物の系統保存に向けたその原因因子の探索と胚保存法の開発

研究課題名(英文) Search for the inhibiting factors and development of cryopreservation methods of embryos for strain preservation of disease model in which superovulation is difficult

研究代表者

竹鶴 裕亮 (Taketsuru, Hiroaki)

基礎生物学研究所・IBBPセンター・特任助教

研究者番号：90622283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：過排卵誘起により得られる卵子の数にはバラつきが見られる。本研究では、これまでの過排卵誘起に代わる新たな卵巣内の卵母細胞を用いた成熟卵子の獲得法およびそこから得られた胚の保存法の開発を目的とした。これまでの研究から、過排卵誘起が難しいラット系統においても、卵巣内の卵母細胞は体外で成熟・受精し、産仔へと発生することが明らかとなった。また、受精卵の耐凍性は、発達段階により異なり、前核期胚は凍結保存する際の発達時期によって、その後の産仔への発生に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過排卵誘起に非感受性ラットの原因因子の一つとして、PMSG投与により卵胞は発達するため、卵母細胞の成熟あるいは排卵過程に障害があることが示された。本研究で用いる方法は、卵巣内にある多数の卵母細胞を利用するため、卵母細胞の成熟や排卵の過程に問題があっても過排卵を誘起しにくいすべてのラットに対して有効な手段となる可能性がある。また、これまで胚保存が困難であった系統や、希少動物の卵母細胞保存のための技術開発にも道が開かれる。さらに、多くの成熟した卵母細胞を得られないヒトの新たな治療法や薬の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The number of oocytes obtained by superovulation show a variation. The objective of the present study was to development of new methods for acquiring matured oocytes alternative to superovulation and cryopreservation of embryos obtained from matured oocytes. In this study, it became clear that oocytes in the ovaries mature, fertilize and develop into offspring even in rat strains where superovulation is difficult. In addition, it was suggested that the tolerance to cryopreservation of the embryos differs depending on the developmental stage, and the developmental stage during cryopreservation of the pronuclear stage embryo has an influence on the subsequent development to offspring.

研究分野：実験動物学

キーワード：過排卵誘起 卵母細胞 体外成熟 凍結保存

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ラットは繁殖能力が高く過排卵を誘起できる実験動物である。しかし、系統差が大きく、産仔数が少なく、かつ過排卵誘起をしても多くの卵母細胞を得にくい系統もある。本研究では、過排卵が誘起しにくい系統を解析し、その原因となる因子を同定することにより、卵母細胞が得にくい疾患モデルラット系統での問題解決を目指す。さらに、過排卵誘起がしにくい疾患モデルラットから多くの受精卵を作出し、作出した受精卵（初期胚）を凍結保存する技術を確立することで、これまで凍結保存が困難であった疾患モデルラット胚の新たな胚保存法を開発できると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、過排卵誘起による卵母細胞採取が困難なラット系統の新たな過排卵誘起法および胚保存法を開発を目的とした。これによって、これまで多くの卵母細胞の採取が困難であった疾患モデル系統においても卵母細胞の採取や系統保存が容易にできるようになり、実験動物学に貢献できる。また、本研究が異なる動物種における新たな過排卵誘起や胚保存法を開発に貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

過排卵を誘起しにくい近交系ラットを用いて、過排卵誘起の障害となる原因因子を探索する。また、成熟した卵母細胞の獲得法・受精法について検討し、さらに作出した受精卵（初期胚）を凍結保存することによって、過排卵を誘起しにくい疾患モデルラットの胚保存法を開発する。

(1) 過排卵を誘起しにくい原因因子を探索する。(2) 近交系 BN ラットより成熟した卵母細胞を獲得する方法を開発する。(3) 成熟した卵母細胞の受精法を開発する。(4) ガラス化保存法を用いて、体外受精した受精卵および未成熟卵母細胞の凍結保存を試みる。(5) 過排卵を誘起しにくい疾患モデルラットについても、未成熟卵母細胞の体外成熟・受精法を開発する。さらに、作製された受精卵の凍結保存を試みる。

4. 研究成果

(1) PMSG/hCG を腹腔内投与し過排卵誘起後、成熟した卵母細胞（MII）を採取した場合、3 系統間（Wistar ラット、F344 ラット、BN ラット）に有意な差が見られた。しかし、PMSG を投与し 48 時間後に卵巣より採取した卵母細胞-顆粒膜細胞複合体（OGCs）に有意な差は見られなかった。

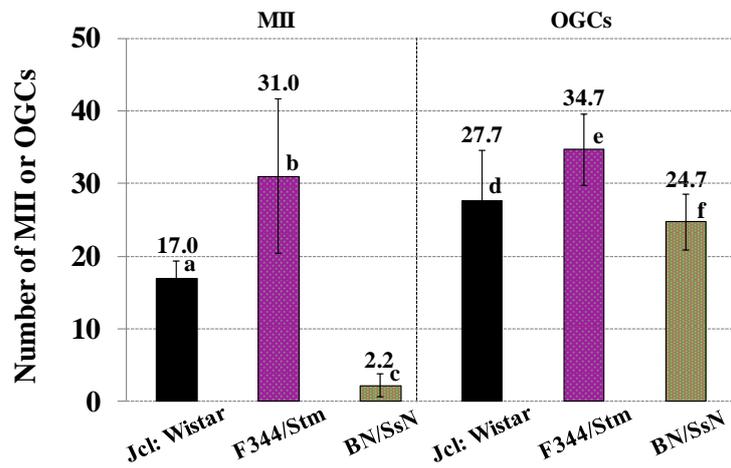


図1 過排卵誘起後に採取した MII 数および卵巣より採取した OGCs 数

(2) PMSG を投与し、48 時間後に採取した未成熟な卵母細胞を 4 つの培養液 (HTF、 α MEM、HTF + α MEM、TYH + α MEM) を用いて 16 時間体外成熟すると、成熟する卵母細胞が観察された。その後、ストロンチウムを用いて体外成熟した卵母細胞を活性化すると、 α MEM を用いて体外成熟させた卵母細胞で多くの卵母細胞の活性化が観察された。

(3) さらに、体外成熟した卵母細胞の受精能力を調べるために、体外成熟した卵母細胞と同系統の凍結保存した精子を受精 (顕微授精) したところ、系統による産仔数に差は見られたが、産仔へと発生した。

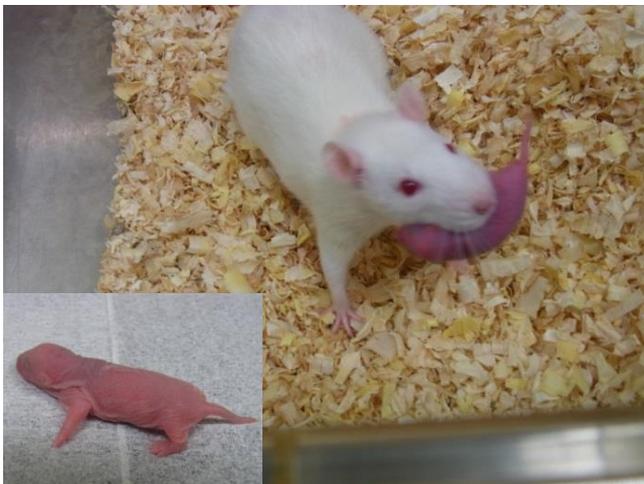


図2 体外成熟した卵母細胞より得られた産仔

(4) Wistar ラットを用いて、過排卵誘起後に採取した前核期胚・2 細胞期胚・桑実胚の凍結保存を試みたところ、胚の発達段階によって凍結-融解後の産仔への発生率に違いが見られた (前核期胚: 19%、2 細胞期胚: 33%、桑実胚: 52%)。

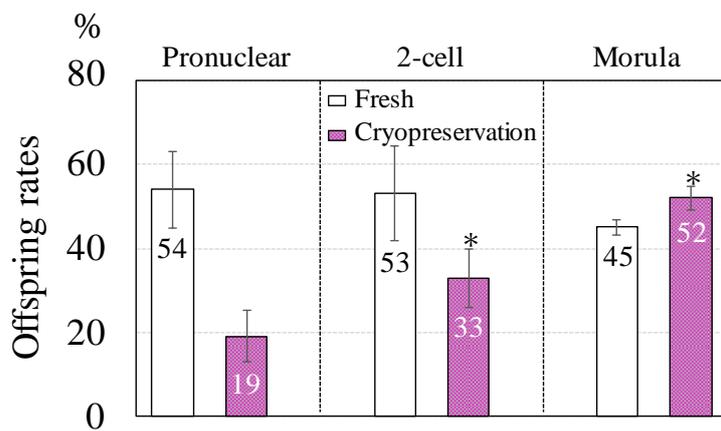


図3 凍結保存した前核期胚・2細胞期胚・桑実胚の産仔への発生率

(5) 凍結前に前核期胚を培養することで、凍結－融解後の産仔率が上昇する傾向が見られた(0時間培養: 12%、4時間培養: 25%、7時間培養: 24%)。

Pronuclear stage embryos

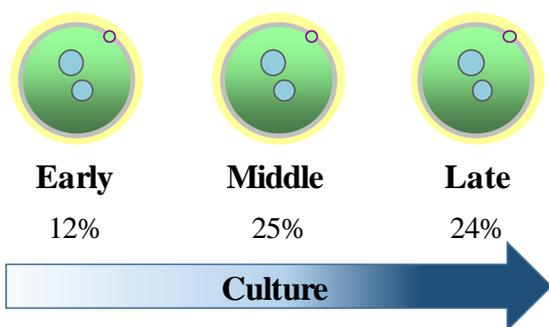


図4 前核期胚の発達時期による耐凍性の違い

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Taketsuru H, Kaneko T. Tolerance to vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Cryobiology*. 2018; 84: 1-3. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.09.002. 査読有

(2) Taketsuru H, Kaneko T. *In vitro* maturation of immature rat oocytes under simple culture conditions and subsequent developmental ability. *The Journal of Reproduction and Development*. 2016; 62: 521-526. Doi: 10.1262/jrd.2016-057. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

(1) 竹鶴 裕亮、金子 武人、ラット前核期胚の発達時期がガラス化保存後の発生に及ぼす影響、**Cryopreservation conference 2018**、2018 年。

(2) 竹鶴 裕亮、金子 武人、ラット前核期胚の発達時期がガラス化保存後の発生に及ぼす影響、**第 111 回 日本繁殖生物学会大会**、2018 年。

(3) 竹鶴 裕亮、金子 武人、ラット系統別の排卵数と凍結保存後の胚発生、**Cryopreservation conference 2017**、2017年。

(4) Taketsuru, H., Kaneko T. Development of rat vitrified embryos in each developmental stage.
Fourth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017), 2017.

(5) 竹鶴 裕亮、金子 武人、ラット胚のステージの違いによる凍結保存後の産仔発生への影響、**Cryopreservation conference 2016**、2016年。

(6) 竹鶴 裕亮、金子 武人、ラット卵母細胞の体外成熟およびその後の発生能について、**第109回 日本繁殖生物学会大会**、2016年。

(7) 竹鶴 裕亮、金子 武人、ラット前核期胚の凍結保存および移植後の産子への発生について、**第63回 日本実験動物学会総会**、2016年。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。