

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08049

研究課題名(和文) 初期胚における光応答機構の分子基盤

研究課題名(英文) Biological effects of near-infrared laser irradiation on molecular processes in the mammalian embryos.

研究代表者

横尾 正樹 (Yokoo, Masaki)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10396541

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)：体外で作出された受精卵の品質は低いことから、受精卵の品質を改善するための技術開発が求められている。我々は、近赤外光照射が哺乳動物受精卵の品質に及ぼす影響について調査した。近赤外光を凍結保存受精卵に照射することで、凍結融解後の受精卵の発生率を改善することが明らかとなった。さらに、近赤外光を受精卵に照射することで低レベルのROSを産生させ、それが引き金となって品質改善効果を引き出している可能性を示唆するデータを得ることができた。これらの研究成果は、我々の技術が哺乳動物受精卵の品質改善技術として有用であることを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

畜産分野(家畜生産)や医療分野(不妊治療)で行われている初期胚の体外操作は、初期胚の品質(生存性、活力)の低下、さらには受胎成績の低下にもつながることから、体外で生産した初期胚の品質改善技術の開発が求められている。本研究の成果は、光による初期胚の品質改善効果の作用機序の一端を明らかにした内容であり、将来的に、家畜生産や不妊治療に及ぼす波及効果は大きく、これらの分野の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Establishing an improved in vitro method is required for increasing the quality of embryos, and will contribute to enhancing reproductive efficiency in humans and domestic animals. In the present study, we assessed the effects of near-infrared laser irradiation on the in vitro development of mammalian embryos. Our study revealed that near-infrared laser irradiation of cryopreserved blastocysts had positive effects on their subsequent development. Moreover, our data suggested that one of the key factors that affect the efficacy of near-infrared laser irradiation for blastocyst stage embryos is low level of ROS. These results support that our method may be useful for improving the quality of embryos and contribute to improvements in reproductive technologies in mammals.

研究分野：動物生殖科学

キーワード：近赤外光 初期胚 ミトコンドリア ROS

1. 研究開始当初の背景

今日、体外で受精卵を生産して産子を得る受精卵移植技術は、畜産分野では優良家畜の増産や家畜改良に、医療分野（産婦人科領域）では不妊治療に欠かせない技術となっている。しかしながら、体外における受精卵の人為的操作は、受精卵の品質（生存性、活力）の低下、さらには治療成績の低下にもつながっていると考えられ、体外で作出された受精卵の品質を改善させることができる技術が強く求められている。

細胞内のミトコンドリアはATPを産生する重要な細胞内小器官であり、受精卵のエネルギー代謝の中心としても重要な役割を果たしている。受精卵の発生過程では、細胞内のミトコンドリアが形態的に成熟し、活性も上昇する。また、受精卵のミトコンドリア活性は受精卵の孵化や着床能力とも関連していることが報告されている。これらのことから、受精卵の品質は、細胞内のミトコンドリア活性に依存していることが知られている。つまり、体外で作出された受精卵の品質を改善させるためにはミトコンドリアをターゲットとした技術開発が必要であると考えられる。

医学領域では古くから創傷治癒や疼痛緩和を促すために近赤外領域の光が広く使用されている。近年、光治療の研究が進み、近赤外光がミトコンドリア電子伝達系のシトクロムcオキシダーゼ活性を向上させる効果があることが報告された。これらの研究成果は、受精卵に対して近赤外を照射することにより、受精卵のミトコンドリア活性、ひいてはその品質を改善できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

最近、我々は近赤外光（904nm）を胚盤胞に照射することで、孵化までの所要時間の短縮や受精卵移植後の受胎成績を改善する効果があることを報告した（Yokoo and Mori, 2017）。すなわち、近赤外光を利用した体外受精卵の品質改善技術の開発につながる可能性が期待される。しかし、近赤外光照射が受精卵のミトコンドリア機能への影響など、その詳細な作用メカニズムは未だ明らかになっていない。そこで本研究の目的は、哺乳動物の受精卵に対する近赤外光照射の効果を解明することにある。

3. 研究の方法

(1) 哺乳動物の受精卵の生存性に及ぼす近赤外光照射の影響

近赤外光を照射することによって、凍結保存したウシ体外受精卵の生存性や品質を改善することができるかを調査した。屠場由来のウシ卵巣から卵丘細胞-卵子複合体を採取し、IVMD101培地で22時間体外成熟培養を行った。培養後、媒精液（IVF100培地）中で6時間体外受精し、体外発生培地（5%FBS添加CR1aa）で培養した。培養7日目の胚盤胞をCryotec Animalで超急速ガラス化保存し、融解後は、1.5mMのグルコースを添加した体外発生培地で72時間培養した。なお、全ての培養条件は38.5°C、5%CO₂、95%空気とした。近赤外光の照射はLHU-904（波長904nm, Rian Corp.）を使用した。照射時間は3分間とし、照射タイミングは、凍結前（凍結前区）、融解3時間後（融解後区）とし、融解後の生存率、胚盤胞の構成細胞数、孵化率、孵化開始までの所要時間を評価した。なお、凍結・融解時に近赤外光を照射せずに培養した胚盤胞を非照射区（対照区）とした。

(2) 近赤外光照射が受精卵の細胞内プロセスに及ぼす影響

近赤外光照射が受精卵に及ぼす作用メカニズムを解明するため、近赤外光を照射した受精卵のミトコンドリア関連機能を調査した。ICR 系統の雌マウスに過剰排卵処理を施し、卵管灌流によって得られた 2 細胞期胚を培養した (37°C, 5% CO₂, 95% 空気)。培養 3 日目に発生した胚盤胞を用いて、ミトコンドリア膜電位、細胞内活性酸素 (ROS) レベル、ATP 含量、ミトコンドリア DNA コピー数および遺伝子発現を調査した。近赤外光の照射は LHU-904 を使用し、照射時間は 1 分間とした。

4. 研究成果

(1) 哺乳動物の受精卵の生存性に及ぼす近赤外光照射の影響

融解 72 時間後の生存率は、非照射区は 35.6%、凍結前区は 45.5%、融解後区は 51.2% となり、各実験区に有意差は見られなかった (図 1)。しかし、72 時間後に生存していた胚盤胞の平均構成細胞数を計測したところ、非照射区で 112.5±10.8 個、凍結前区で 211.0±20.4 個、融解後区で 176.2±17.5 個となり、いずれの照射区でも非照射区と比較して有意に高かった (P<0.05; 図 2)。さらに、孵化率は、非照射区 8.9%、凍結前区 36.4%、融解後区 34.9% であり、非照射区とよりも近赤外光を照射した実験区で有意に高かった (P<0.05; 図 3)。また、融解から孵化開始までの所要時間は、非照射区 51.8±6.8 時間、凍結前区 42.2±3.9 時間、融解後区で 36.0±3.6 時間となり、融解後区で、近赤外光を照射した受精卵は発生速度が速くなる傾向が観察された (図 4)。以上の結果から、近赤外光照射は、融解後の生存率を改善する効果は認められなかったものの、生存胚盤胞の品質を改善することが示された。

(2) 近赤外光照射が受精卵の細胞内プロセスに及ぼす影響

近赤外光照射 5 分後に受精卵の ATP 含量が減少する傾向が観察されたことから、一時的にエネルギー代謝が上昇している可能性が示唆されたものの、先行研究で報告されているようなミトコンドリア活性を増加させる現象は観察することはできなかった。一方、近赤外光照射によって受精卵内の ROS レベルが一時的 (照射後 3~5 分) に増加することを観察した (P<0.05)。ROS は細胞内蓄積が進むことで細胞に対して酸化ストレスを引き起こすが、その一方で、低レベルの ROS はシグナル伝達分子としての役割も担っていることが報告されている。そこで、今回観察された一時的な ROS レベルの上昇もシグナル伝達分子として機能していると仮定して、ROS によって発現が誘導される NO 合成酵素の遺伝子発現を調査した。その結果、iNOS mRNA の発現が近赤外光の照射後に上昇する傾向が観察された。ROS は NO 合成酵素の発現を刺激し NO 産生を引き起こすことや、受精卵で産生された NO は、その後の孵化に重要であることが報告されている。我々の報告 (Yokoo and Mori, 2017) においても、近赤外光の照射によって受精卵の孵化胚盤胞までの所要時間が短縮することが確認されていることから、近赤外光は低レベルの ROS 産生を介して、受精卵の孵化やその後の受胎性に影響することが推察された。本研究では、近赤外光照射によって引き起こされる細胞内プロセスの詳細を調査することはできなかったが、今後、ROS を起点としたシグナル伝達機構を調査することで、哺乳動物の受精卵における光応答機構の全容解明に繋がると考えられた。

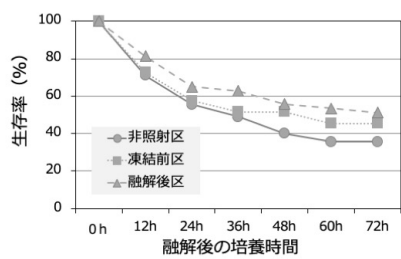


図1：融解後の胚盤胞生存率

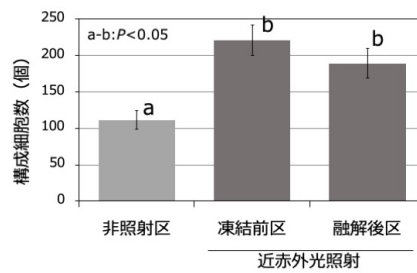


図2：培養72時間後の構成細胞数

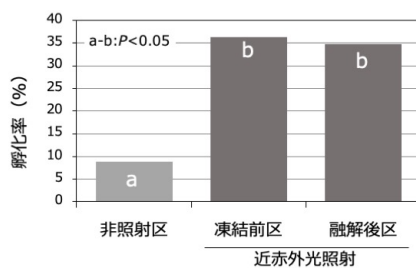


図3：培養72時間以内に孵化する割合

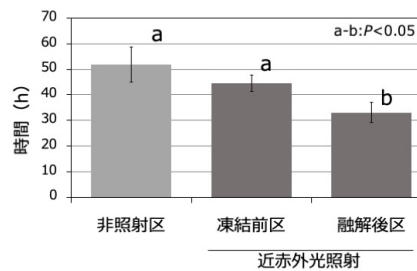


図4：孵化開始までの所要時間

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 横尾 正樹, 伊藤 謙, 佐藤 勝祥, 伊藤 一志	4. 巻 5
2. 論文標題 カーボンナノチューブ複合材の細胞培養シートとしての特性評価	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 秋田県立大学ウェブジャーナルB	6. 最初と最後の頁 187-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 横尾 正樹	4. 巻 69
2. 論文標題 異分野技術を活用した肉用牛の生産性向上に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 東北畜産学会報	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 立原 昂平, 中岡 麻衣, 嵯峨 くらら, 伊藤 謙, 佐藤 勝祥, 横尾 正樹
2. 発表標題 近赤外光照射がウシ凍結融解受精卵の生存性および品質に及ぼす影響
3. 学会等名 第68回東北畜産学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 仁, 長谷川 昇司, 渥美 孝雄, 横尾 正樹
2. 発表標題 低エネルギー飼養管理下で発情が回帰した長期不受胎繁殖牛の代謝プロファイルテスト
3. 学会等名 第2回日本胚移植技術研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松原 和衛, 小岩 佳夏子, 門岡 憲, 鈴木 幸太, 佐々木 邦明, 横尾 正樹, 平田 統一
2. 発表標題 ウシ超早期妊娠因子抗体の妊娠卵巢・受精卵との反応性
3. 学会等名 第33回日本生殖免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 勝祥, 角山 夏実, 小沢 聡恵, 伊藤 謙, 横尾 正樹
2. 発表標題 日本短角種由来の筋衛星細胞におけるアベリン刺激の影響
3. 学会等名 第68回東北畜産学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横尾 正樹
2. 発表標題 異分野技術を活用した肉用牛の生産性向上に関する研究
3. 学会等名 第68回東北畜産学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横尾 正樹, 清水 司, 辻 周一朗, 佐藤 勝祥, 伊藤 謙, 渡邊 潤, 小林 仁, 河村 和弘
2. 発表標題 マウス卵巢内卵胞の発育に及ぼすリゾホスファチジン酸の影響
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	伊藤 謙, 佐藤 友紀, 齋藤 雅昭, 後藤 滉, 立原 昂平, 西山 佳南恵, 田村 美穂, 佐藤 勝祥, 渡邊 潤, 横尾 正樹
2. 発表標題	清酒粕の飼料原料としての利用性向上およびプロイラーの腸管免疫関連遺伝子発現量に及ぼす影響
3. 学会等名	第126回日本畜産学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	松原 和衛, 岩崎 節子, 片平 睦子, 門岡 憲, 中村 啓哉, 横尾 正樹
2. 発表標題	超早期妊娠因子ELISAによるウシの妊娠診断とELISAに使用する抗体の胚の反応部位
3. 学会等名	第64回日本生殖医学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Kanae Nishiyama, Hiroyuki Imanishi, Ken Ito, Jun Watanabe, Masaki Yokoo and Katsuyoshi Sato
2. 発表標題	Effects of raspberry feeding on peripheral blood immune cells populations in calves
3. 学会等名	The 13th International Symposium on Ruminant Physiology 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Katsuyoshi Sato, Natsumi Tsunoyama, Kanae Nishiyama, Ken Ito, Jun Watanabe and Masaki Yokoo.
2. 発表標題	Effects of apelin stimulation on cell proliferation and differentiation of myoblasts from Japanese short horn cattle
3. 学会等名	The 13th International Symposium on Ruminant Physiology 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----