

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08134

研究課題名（和文）細胞小器官の機能最適化による機能性胚培養液の開発

研究課題名（英文）Development of culture media optimizing organelle functions for preimplantation embryos

研究代表者

岸上 哲士（Kishigami, Satoshi）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10291064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、ヒトの不妊治療や実験動物の発生工学技術に不可欠な着床前胚の体外培養技術改善を目的として、胚の核やミトコンドリアを含む細胞小器官の機能制御による「機能性胚培養液」の開発を目指した。その結果、ミトコンドリアの機能障害の克服、体外成熟卵子の発生能の改善、グルコース代謝と発生能、細胞シグナルとクロマチン形成、オートファジーと発生能等について胚発生率改善につながる重要な知見を得ることができた。これらの新しい知見は今後発生率改善に向けた新規培養液開発に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の着床前胚の体外培養技術は、ヒトの不妊治療や実験動物の発生工学技術に不可欠である。しかしながら、現在の培養液では体内環境に比べ容易に発生が停止し、その産子への成功率が限られている。本研究課題では胚の核やミトコンドリア、オートファジーを含む細胞小器官の機能制御の視点から「機能性胚培養液」の開発を行った。本研究を通じて、発生率改善につながるいくつかの重要な知見を得ることができ、今後産子率向上に向けて培養液改善につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：This research project aims to improve the in vitro culture technique of preimplantation embryos, which is essential for human infertility treatment and developmental engineering technology of experimental animals, by controlling the functions of organelles including the nucleus and mitochondria of embryos. As a result, we have obtained important findings such as overcoming mitochondrial dysfunction, improving in vitro matured egg development, glucose metabolism and developmental competency, cell signaling and chromatin formation, autophagy and developmental competency. It is expected that these new findings will contribute to the development of new culture solutions for improving the embryonic development in the near future.

研究分野：発生工学分野

キーワード：発生工学 体外培養 着床前胚発生 細胞小器官

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の着床前胚の体外培養技術は、ヒトの不妊治療や実験動物の発生工学技術に不可欠である。しかしながら、現在の培養技術では体内環境に比べ体外環境では容易に発生が停止し、その産子への発生率は限られている。

卵子が精子との受精により始まる初期胚の発生は着床前までの発生過程において、ゲノム DNA のメチル化状態、ミトコンドリアの形態、代謝、遺伝子発現プロファイルなどがダイナミックに変化する。この時期の胚は、受精時に近いほど外的ストレスへの感受性が高く胚が脆弱であることが知られている。これまで着床前胚の発生能を低下させる要因(リスク要因)は、まだ十分解明されず克服されていないのが現状である。現在もマウスの胚の培養液として一般に使われている培養液 CZB および KSOM はいずれも 1990 年前後に開発されて以降大きな改善はなく、栄養成分の最適化のみでは大きな発生率向上は難しく新たな視点が必要であると考えられる。

着床前の発生には、2 細胞期、4・8 細胞期、桑実期胚、胚盤胞と変化し、この間に細胞小器官の機能はダイナミックに変化する。発生能を低下させる要因(リスク要因)として、卵巣や卵管から体外に取り出された正常な卵子や胚は、外的温度変化や培地など栄養成分の変化、胚操作による様々なストレスやそれによる細胞小器官の機能障害が考えられる。実際、ミトコンドリア、小胞体、オートファジーの細胞小器官の機能不全と胚の発生障害が明らかになりつつある。本研究では従来の栄養の視点からの培養液に加えて、核やミトコンドリアを含む細胞小器官の制御という新しい視点を加えて発生能の機構解明および向上を目指す。

2. 研究の目的

哺乳類の着床前胚の発生率向上に向けた体外培養技術の改善は、ヒトの不妊治療や実験動物の発生工学技術に不可欠な課題である。本研究では従来の栄養の視点からのみの培養液をさらに向上させるために、マウス胚を用いて各細胞小器官の機能を各発生ステージにおいて薬理的に様々なレベルで正または負に制御することで発生に与える影響を体系的に調べる。また、同時に細胞小器官の活性の非侵襲的な観察方法を開発し、胚の発生能の評価方法を検討する。そして、各細胞小器と表現型の関係を十分理解し、その結果にもとづき胚の発生率を向上させる最適な培養条件を探索することで、細胞小器官の機能を制御し、機能障害を克服する視点にたった胚の発生率を高める「機能性胚培養液」の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 発生能の低い体外成熟(IVM)した胚の培養時に、小胞体ストレス抑制効果が知られている化学シャペロン TUDCA(タウロウルソデオキシコール酸)を用いて、最適処理濃度と処理時間を検討し、胚胚盤胞および産子への発生率の改善を行った。
- (2) ミトコンドリアの電子伝達系阻害剤ロテノンを用いて、ミトコンドリア障害による発生低下を誘導した。さらにこの胚を用いて様々な試薬による発生向上の効果を検討した。その中で、化学シャペロン TUDCA(タウロウルソデオキシコール酸)添加の有効性を見出した。
- (3) 1 細胞期における MAPK カスケードである MEK(mitogen-activated protein kinase)シグナルが、核におけるクロマチン形成および発生能に果たす役割を解明するため、受精時に阻害を行い、その表現型の解析を行った。
- (4) 細胞シグナルの中で細胞エネルギーの恒常性維持における主要な制御因子である AMPK(AMP-activated protein kinase)シグナルに着目し、薬剤により AMPK の活性化および阻害によりマウス胚の発生能および胚盤胞形成過程における細胞分化への影響を検討した。
- (5) オートファジー活性のライブセルイメージング試薬である DAPI を用いて、胚で初めて観察に成功した。さらに発生能の高い体内で受精した胚と体外受精した胚のオートファジー活性の比較を行った。
- (6) 卵子の細胞膜と透明帯の空間である囲卵腔は、胚発生の重要な細胞外環境を提供する。囲卵腔のタンパク質の動態を可視化するために、疎水性および負の電荷をもつタンパク質に結合性をもつタンパク質染色試薬 Lumitein を用いてライブセルイメージングを試みた。

4. 研究成果

- (1) 体外成熟時に TUDCA を添加すると発生に負の影響が見られる一方、体外受精後の添加は、産子率は 2 倍以上の改善効果があった。さらに、濃度依存性も見られ、1000 μ M の高濃度が有効であることを見出した(図 1)。このことから、TUDCA の培養液への添加は、体外成熟(IVM)の受精卵においても有効であり、その添加のタイミングと処理濃度が重要であることが明らかとなった。

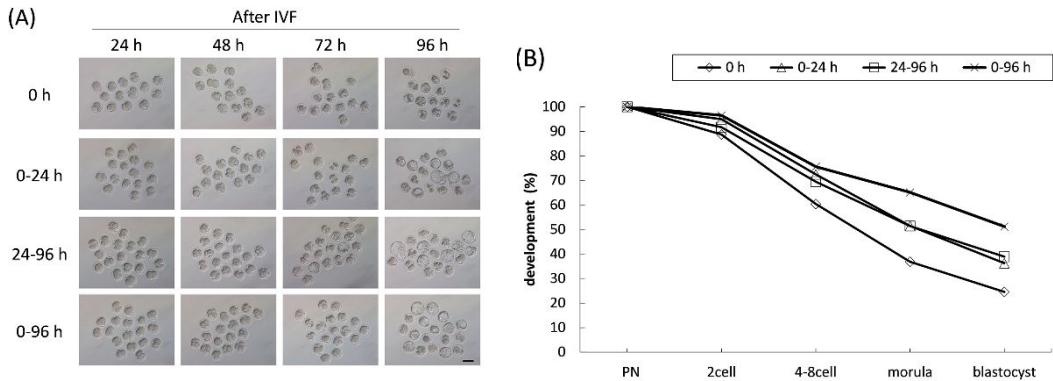


図 1 . TUDCA 添加による胚発生の改善効果 (Mochizuki M. et al., PLoS One 2018)

- (2) 電子伝達系阻害剤ロテノンの添加は、濃度依存的に胚発生能を低下させる。しかし、これらのミトコンドリア障害を持つ胚は、小胞体ストレスに効果のある TUDCA (タウロウルソデオキシコール酸) により発生能が回復することが見いだされた (表 1)。このことから、ミトコンドリア障害をもつ胚において TUDCA の添加が有効であることが明らかとなった。

rot(μ M)	TUDCA(μ M)	2cell	4cell	8cell	morula	blastocyst(%) [*]
0	0	90	88	87	86	84(93)
5	0	90	75	63	48	33(37)
5	1000	90	87	81	78	69(77)
5	100	90	82	75	63	51(57)
5	10	72	62	57	48	36(50)

表 1 . 1000 μ M TUDCA 添加がロテノン処理した胚の発生率をもっとも改善が見られた (宮城 ら、第 111 日本繁殖生物学会大会、2018)

- (3) 受精後の MEK シグナルを阻害した結果、雌性前核の早期形成、拡張、メチル化などヒストン修飾の変化 (図 2) を誘導し、さらに発生低下を引き起こすことが明らかとなった。このように 1 細胞期の細胞シグナルは正常な核やクロマチン形成に重要であることから、これらの細胞シグナルを攪乱するような環境因子は発生低下の原因になると考えられる。

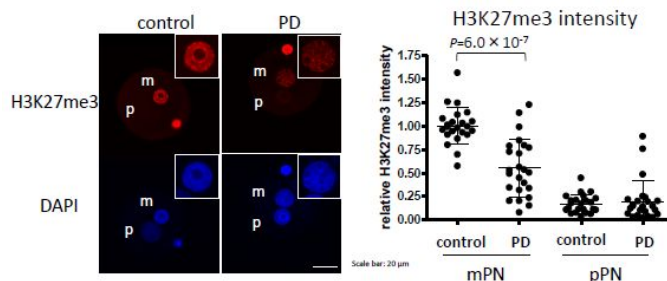


図 2 . 受精後の MEK シグナルの阻害はヒストンのメチル化を低下させる (Magara K. et al., IETS 年会、2020)

- (4) 着床前発生において AMPK の活性化 (AICAR) および阻害が (Compound C) はいずれも発生を低下させた。特に AMPK の活性化は、転写因子 YAP の核内蓄積を阻害することで、内部細胞塊の細胞を増加させ、栄養外胚葉の細胞の減少する結果となり (図 3)、細胞分化に影響を及ぼすことが明らかとなった。これらの結果から、薬剤により AMPK の活性調節をすることで発生能や細胞分化を調節することで改善できる可能性が考えられる。

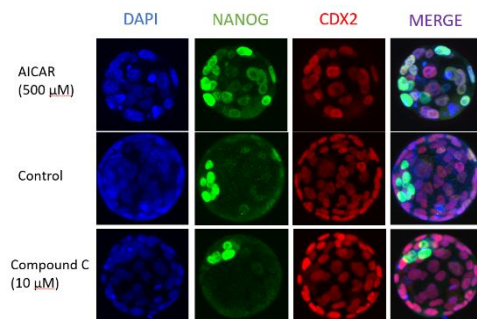


図 3 . AMPK の活性化 (AICAR) および阻害が (Compound C) 添加が細胞分化に与える影響 (中村ら、第 112 日本繁殖生物学会大会、2019)

- (5) オートファジー活性のライブセルイメージング試薬である DAPGreen を用いて、発生能の低い体外受精した胚 (IVF) と発生能の高い体内で受精した胚 (2 cell 灌流) の着床前発生におけるオートファジー活性の比較を行った。その結果、2 細胞期において体内受精胚は体外受精胚に比べてオートファジー活性が高く、また桑実期胚では体外受精胚はオートファジー活性が異常であることを見出した (図 4)。これらのことから、2 つの胚では生理学的に異なる状態にあることが示唆され、今後体外受精した胚の培養環境をオートファジー活性を指標にして改善することで発生能の改善が期待される。

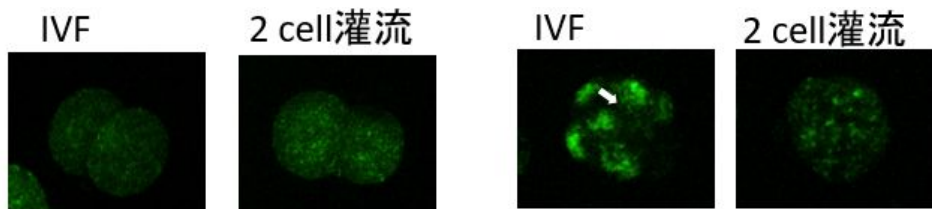


図 4 . 囲卵腔および卵子表面の Lumitein による蛍光が受精後大きく変化する様子をとらえた (蟹江ら、第 112 回日本繁殖生物学会大会、2019)。

- (6) タンパク質染色試薬 Lumitein による囲卵腔のライブセルイメージング法の開発に成功した。これにより、受精後の囲卵腔および卵子表面のタンパク質がダイナミックに変化することが明らかになった (図 2)。この方法を用いて卵子や受精卵の発生能を非侵襲的に評価する応用への可能性が期待される。

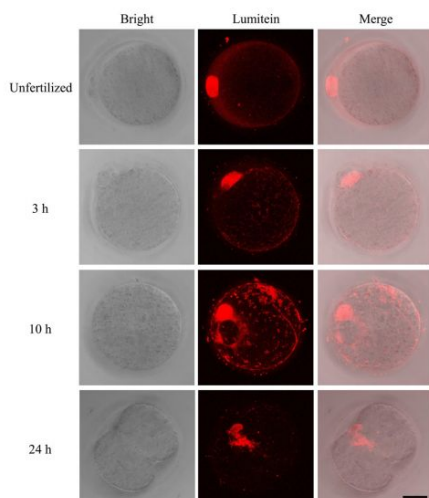


図 5 . 囲卵腔および卵子表面において Lumitein の蛍光が受精後大きく変化する様子をとらえた (Okaji H. et al., J Reprod Dev 2020)。

以上、本研究を通じて得られた主な結果を (1) ~ (6) に示した。これらの結果から、胚の発生率改善に向けて、核、ミトコンドリア、オートファジー活性、細胞シグナルの制御の重要性が明らかとなった。今後、これらの制御を最適に制御する方法を開発していくことで、体外においても体内と同様に発生率の高い胚の培養が可能になることが期待される。

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 Hiroka Okaji, Kenta Tetsuka, Ren Watanabe, Satoshi Kishigami	4. 巻 66
2. 論文標題 New cellular imaging of oocytes and preimplantation embryos using Lumitein: Evaluation of oocyte quality and new information on protein dynamics within the perivitelline space during the one-cell oocyte stage in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 155-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-114	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 Mochizuki Masato, Miyagi Kodai, Satoshi Kishigami	4. 巻 13
2. 論文標題 Optimizing treatment of tauroursodeoxycholic acid to improve embryonic development after in vitro maturation of cumulus-free oocytes in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0202962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0202962	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14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazunori Magara, Shiho Naruto, Ren Watanabe, Teruhiko Wakayama, Satohsi Kishigami
2. 発表標題 Analysis of abnormal chromatin configuration induced by inhibiting MEK at the 1-cell stage
3. 学会等名 46th Annual Conference of the International Embryo Technology Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成戸 志帆, 真柄 和典, 渡辺 連, 若山 照彦, 岸上 哲士
2. 発表標題 哺乳類における受精後MEKおよびSrcシグナリングがエピジェネティック制御及び発生に果たす役割について
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 沙知, 渡辺 連, 望月 和樹, 岸上哲士
2. 発表標題 受精後のBrd4阻害剤(+)JQ1処理のタイミングの違いが着床前の発生分化に及ぼす影響について
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蟹江 沙耶, 渡辺 連, 岸上哲士
2. 発表標題 体外と体内の受精環境が胚のオートファジー活性に与える影響について
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 芳樹, 岸上哲士
2. 発表標題 高グルコース含有培地およびAMPKシグナル阻害により誘導される胚盤胞形成過程における細胞分化の表現型の類似性について
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真柄 和典, 成戸 志帆, 渡辺 連, 若山 照彦, 岸上哲士
2. 発表標題 MEK阻害により誘導されるマウス着床前胚におけるエピジェネティック修飾の解析
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮城 昂大, 岸上 哲士
2. 発表標題 TUDCAによるミトコンドリアの機能障害を持つ胚の発生率の改善
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 芳樹, 岸上 哲士
2. 発表標題 グルコース代謝が胚盤胞形成過程における細胞分化に果たす役割
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真柄 和典, 成戸 志帆, 若山 照彦, 岸上 哲士
2. 発表標題 低分子阻害剤2iLにより誘導されるマウス受精卵のエピジェネティックな変化および発生への影響
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 海平 のどか, 松本 沙知, 望月 和樹, 岸上 哲士
2. 発表標題 胚の体外培養液の違いが長期に及ぼす影響
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡地 洸翔, 齋藤 由衣, 蟹江 沙耶, 岸上 哲士
2. 発表標題 TSA処理が胚発生に与える影響の培地依存性について
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Mochizukid, Masatoshi Ooga, Satoshi Kishigami
2. 発表標題 Effect of tauroursodeoxycholic acid addition on embryo development using cumulus-free oocyte in vitro maturation
3. 学会等名 第4回World Congress of Reproductive Biology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroki Kuwayama, Ah Reum Lee, Go Nagamatsu, Satoshi Kishigami
2. 発表標題 Enhanced rates of full-term development of cloned mouse embryos by TSA and 2i treatment
3. 学会等名 第4回World Congress of Reproductive Biology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yui Saitoh, Satoshi Kishigami
2. 発表標題 Requirement of mTOR signaling for normal blastocyst formation in the mouse
3. 学会等名 第4回World Congress of Reproductive Biology
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糖尿病モデル動物の作出方法及び糖尿病モデル動物	発明者 岸上哲士、望月和 樹、若山照彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-159174	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----