

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11242

研究課題名(和文) 大気圧プラズマ照射によるマウス生殖細胞および受精卵活性化法の開発

研究課題名(英文) Application of cold atmospheric pressure plasma in mouse oocytes and embryos

研究代表者

中川 佳子 (Nakagawa, Yoshiko)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特任助教

研究者番号：30732739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、晩婚化による出産年齢の高齢化と生殖補助医療を利用して出産する女性の増加から、30代後半～40代の妊娠・出産率を向上させることは重要な課題となっている。そのため、この数年で培養細胞の増殖促進及びバイアビリティ上昇効果が示唆されつつある大気圧プラズマ照射をマウスの生殖細胞や受精卵へ応用し、これらの細胞の活性化を誘導することにより、受精率や胚発生率、妊娠率が上昇する方法の開発を目的として研究を行った。当センターでは、マウスの精子・胚バンクの運営を行うと共に、新たな生殖工学技術の開発を目的として研究を行っており、本研究は、ヒト生殖補助医療へ応用可能な技術の基盤作りを目指したものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖補助医療における出生率を向上させ、少子化対策の一助となる技術を開発するため、当センターの生殖工学技術と医療・ライフサイエンス分野で注目されつつある大気圧プラズマ処理技術を組み合わせることにより、マウスの精子や卵子、受精卵の活性化を可能とする新たな生殖工学技術の開発に取り組んだ。生殖細胞および受精卵への大気圧プラズマ照射による細胞活性化の研究報告は皆無であり、今回、体外受精-大気圧プラズマ処理-胚移植作業により、マウスの出生率を改善できたことは世界初の報告であり、ヒト生殖補助医療へ応用可能な基盤技術を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：The decline of birth rate following women's late marriage is one of the social problems. The number of women who gave birth to babies by using assisted reproductive technologies, such as in vitro fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), embryo transfer and cryopreservation of embryos or spermatozoa has increased. In recent years, cold atmospheric pressure plasma (CAP) has been reported to induce the enhanced mammalian cell proliferation and up-regulation of cell viability; however, there has been no report to activate mouse germ cells or embryos by CAP administration. Therefore, using CAP and our mouse reproductive engineering techniques, including IVF, cryopreservation and embryo transfer, we tried to improve the fertility rate of mouse oocytes and the birth rate of the embryos. Our study may become a basis of new assisted reproductive technology in combination with plasma medicine.

研究分野：発生工学

キーワード：卵子 受精卵 大気圧プラズマ 体外受精 発生率 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大気圧プラズマ照射は、工業分野ではプラスチックや半導体の表面処理、農業分野では殺菌などに利用・実用化され、様々な作業工程において必要不可欠な技術となっている(図1)。

近年は、国内外の医療・ライフサイエンス分野での大気圧プラズマ応用研究が急速に発展しており、プラズマ活性溶液の利用や患部への直接照射によるガンの治療、創傷治癒や止血効果、加齢黄斑変性治療での効果から、医療実用化されつつある。また、培養細胞において、細胞やDNAに障害を与えない程度のプラズマ照射を行うことにより、細胞増殖の促進、細胞バイアビリティの変化、免疫・発生・発育に関する遺伝子及びDNA修復遺伝子の発現上昇が確認されており、プラズマ照射によって誘導される様々な効果および障害についての研究成果およびそれらのメカニズム解明を目的とした研究成果が発表されてきている。

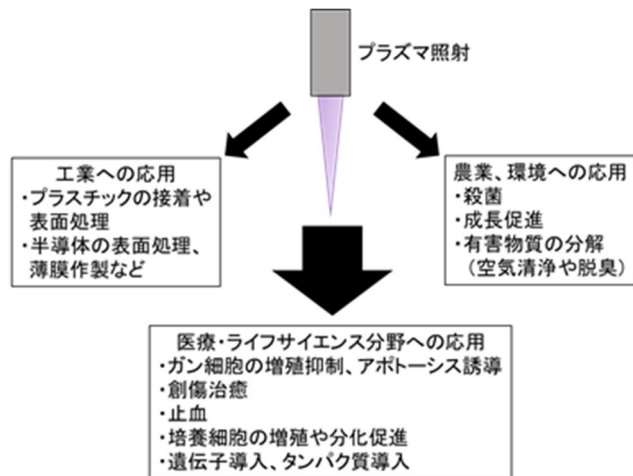


図1.大気圧プラズマの各研究分野への応用

しかしながら、その作用機序についてはまだ不明な点が多く、プラズマ照射により誘導される効果や障害の作用機序解明は今後の研究課題となっている。このように、大気圧プラズマを利用した研究は盛んに行われているものの、医療・ライフサイエンス分野においては、一部の限られた研究にしか導入されておらず、今後、新たな研究への応用が期待できると考えた。

現在、大きな問題となっている少子高齢化は、様々な対策がとられつつあるものの、目立った改善傾向はみられていない。少子高齢化の原因の一つとして、一人の女性が一生のうちに出産する子供の平均数減少があげられ、近年は1.3~1.4人となっている(厚生労働省、人口動態統計データより)。また、女性の初婚・初産年齢は上昇し続け、2015年には初産年齢が平均30.7歳となった。このような出産年齢の高齢化が進む中で、生殖補助医療技術を利用した妊娠・出産は年々増加し続けており、出生率を向上させることは非常に重要な課題である。そこで、本研究では、大気圧プラズマ照射と生殖工学技術を併用することにより、生殖細胞および受精卵の活性化を誘導し、体外受精率や胚発生率、妊娠率を上昇させる方法の開発を目的とし、本研究が少子化対策の一助となることを期待した。

2. 研究の目的

当研究室では遺伝子改変マウスの胚・精子凍結バンク業務を行うとともに、新たな生殖工学技術の開発、改良、確立を目的として研究を行っている。これまでにマウス胚・精子の凍結保存法、新鮮および凍結精子を用いた体外受精における受精率の向上、胚・精子の簡易冷蔵輸送など様々な生殖工学技術の開発、改良を行っており、当センターの生殖工学技術は世界的にも標準的な技術として認められ(Curr. Protoc. Mouse Biol., 4, 2014)、近年は、生殖工学技術とゲノム編集技術を組み合わせた効率的な遺伝子改変マウス作製法の技術開発も精力的に行っている(Exp. Anim., 63: 349-355, 2014、BMC Biotechnol., 15: 33, 2015、Biol. Open, 5: 1142-1148, 2016)。しかしながら遺伝子改変マウス作製時の産子への発生率は一般的に野生型マウスの産子への発生率より低率であり、繁殖が困難な遺伝子改変マウスも存在する。また、老齢マウスを使用する際には、精子の受精能低下や卵の採卵数や質の低下が問題となる。そこで、大気圧プラズマ照射を利用することにより、生殖細胞や受精卵のバイアビリティを高め、体外受精率や産子への発生率を改善できれば、遺伝子改変マウスの作製や繁殖を効率的に行うことができると同時にヒト生殖補助医療への応用が期待できると考えた。

3. 研究の方法

生殖細胞および受精卵への大気圧プラズマ照射による細胞活性化の研究報告は皆無であることから、老齢マウスの卵子および受精卵への大気圧プラズマ照射を行い、細胞自身のバイアビリティを高め、体外受精率や胚発生率を向上させる方法の開発を行う。また、プラズマ照射による卵子および受精卵活性化の作用機序解明に取り組み、ヒトへの応用が可能な研究の基盤作りを

行う。以下の計画にて研究を行うこととした。

- (1) 受精率や胚発生率が上昇する卵子および受精卵への大気圧プラズマ照射法を開発する。
- (2) 大気圧プラズマ照射が細胞内に与える影響について調べる。
- (3) プラズマ照射による卵子および受精卵活性化の作用機序を明らかにする。

プラズマ装置や照射の検討では、パルスパワーの発生・制御・応用研究に専門をおく本学パルスパワー科学研究所の王准教授、浪平准教授から技術協力を得ることにより、装置の開発を含め最先端の技術を用いて研究の推進を図った。

産子への発生率比較のための統計解析や遺伝子改変マウス作製では広島大学大学院統合生命科学研究所の山本教授、佐久間講師にご協力をいただいた。

4 . 研究成果

老齢雌マウスの卵子は採取するまでに約 1 年の飼育が必要であり、採卵数が非常に少ないことから、採取までの飼育期間が離乳までの約 4 週間と短く、当研究室で開発した超過剰排卵誘起法を用いることにより、非常に多数の卵子を採取することが可能な若齢雌マウスを用いて、条件検討を行った。

培養液中の受精卵へ数分から数十秒のプラズマ照射を行い、培養を続けたところ、ほとんどの卵が死滅あるいは発生を停止した。そこで、胚発生へ障害のないプラズマ条件を決定するため、プラズマ処理後、培養液を交換し、その影響を調べた。

使用するディッシュ、培養液およびその液量、プラズマの照射時間・距離について詳細な検討を行い、最適条件を決定した。採卵卵子塊あるいは受精卵へのプラズマ直接照射では、体外受精率および胚盤胞への発生率は照射無のコントロール区と同等あるいは若干低下し、その効果を確認できなかったため、直接照射ではなく、プラズマ処理培養液で卵子や受精卵を処理し、その影響を調べた。採卵卵子塊の処理では、体外受精率および胚発生率はプラズマ処理無の培養液を用いたコントロール区とほぼ同等であったが、受精卵の処理では、コントロール区に比べ胚発生率が上昇した。この受精卵を移植したところ、3 回の移植実験の結果、コントロール区の平均産子率は 35.4%であるのに対し、プラズマ処理区では平均 48.8%であり、若齢雌マウス由来の受精卵を大気圧プラズマ処理し、産子への発生率が上昇する条件を決定することができた。しかしながら、若齢雌マウス、妊娠・出産適週齢の性成熟雌マウス、老齢雌マウスにおいては、卵子の質が異なる可能性もあるため、大気圧プラズマ処理が、性成熟雌マウス、老齢雌マウス由来の受精卵においても胚盤胞への発生率や産子への発生率を上昇させるか否かの確認を行った。その結果、性成熟雌マウス、老齢雌マウスの受精卵においても培養胚の胚盤胞発生率の上昇、産子への発生率改善を確認することができた。

これらのことから「(1) 受精率や胚発生率が上昇する卵子および受精卵への大気圧プラズマ照射法を開発する。」については、受精率を上昇させることは難しかったが、受精卵を大気圧プラズマ培養液で処理し、移植後、産子への発生率が上昇する条件を決定することができた。「(2) 大気圧プラズマ照射が細胞内に与える影響について調べる。」については、酸化ストレスやミトコンドリア活性の観察を行い、本研究で使用している大気圧プラズマは、受精卵や培養胚に悪影響をもたらすことのない処理条件であることを確認した。「(3) プラズマ照射による卵子および受精卵活性化の作用機序を明らかにする。」については、確信を得られる結果が未だ得られておらず、現在も進行中の課題である。

今後、今回開発した方法により、遺伝子改変マウスの作製や繁殖時の妊娠率および産子への発生率の改善効果を得ることが可能か確認するとともに、生殖細胞や受精卵活性化の作用機序解明を進め、ヒト生殖補助医療に応用可能な技術開発を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakagawa Y, Sakuma T, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Electroporation-mediated genome editing in vitrified/warmed mouse zygotes created by IVF via ultra-superovulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 535-543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.18-0062.	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 Deguchi Y, Nishina T, Asano K, Ohmuraya M, Nakagawa Y, Nakagata N, Sakuma T, Yamamoto T, Araki K, Mikami T, Tanaka M, Nakano H.	4. 巻 505
2. 論文標題 Generation of and characterization of anti-IL-11 antibodies using newly established Il11-deficient mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 453-459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.09.128.	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 Yoshiko Nakagawa, Tetsushi Sakuma, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, Toru Takeo, Naomi Nakagata and Takashi Yamamoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 706-713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1242/bio.025122	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中川 佳子、佐久間 哲史、若松 和子、坂本 亘、春口 幸恵、山下 紀代子、石田 恵理、位寄 かのこ、唐 哉代、大西 早苗、坂元 奈津子、土山 修治、竹尾 透、山本 卓、中瀧 直己
2. 発表標題 凍結受精卵加温後のエレクトロポレーションを行うタイミングが産子のモザイク率に与える影響について
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiko Nakagawa, Tetsushi Sakuma, Toru Takeo, Naomi Nakagata and Takashi Yamamoto
2. 発表標題 Highly versatile generation of electroporation-mediated genome-edited mice with the CREATRE method
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 佳子、佐久間 哲史、若松 和子、坂本 亘、近藤 朋子、竹下 由美、中牟田 裕子、石田 恵理、山下 紀代子、位寄 かのこ、唐 哉代、土山 修治、竹尾 透、山本 卓、中潟 直己
2. 発表標題 エレクトロポレーション法によるゲノム編集個体の作製-超過剰排卵誘起法を用いた体外受精卵の利用-
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiko Nakagawa, Tetsushi Sakuma, Toru Takeo, Naomi Nakagata and Takashi Yamamoto
2. 発表標題 Electroporation-Mediated Genome Editing in Vitrified/Warmed Mouse Zygotes Created by IVF via Ultra-Superovulation.
3. 学会等名 ゲノム編集学会第3回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹尾 透、中川佳子、中潟直己
2. 発表標題 生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製
3. 学会等名 平成30年度新潟大学脳研究所共同利用共同研究第1回 合同セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiko Nakagawa, Tetsushi Sakuma, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, Toru Takeo, Naomi Nakagata, and Takashi Yamamoto
2. 発表標題 Culture time of zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice
3. 学会等名 2nd annual Genome Editing & Engineering Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川佳子、佐久間哲史、西道教尚、横崎恭之、竹尾透、山本卓、中瀧直己
2. 発表標題 CRISPR-Casシステムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討
3. 学会等名 第2回日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川佳子、佐久間哲史、西道教尚、横崎恭之、若松和子、春口幸恵、近藤朋子、竹下由美、中牟田裕子、石田恵理、坂本亘、土山修治、竹尾透、山本卓、中瀧直己
2. 発表標題 CRISPR-Casシステムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川佳子、中瀧直己
2. 発表標題 ゲノム編集技術と生殖工学技術を用いた効率的な遺伝子改変マウス作製
3. 学会等名 第1回 合同セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川佳子、佐久間哲史、西道教尚、横崎泰之、近藤朋子、竹下由美、中牟田裕子、石田恵理、坂本亘、土山修治、竹尾 透、山本 卓、中 渦直己
2. 発表標題 CRISPR-Casシステムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討
3. 学会等名 第35回動物生殖工学研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>マウス生殖工学技術マニュアル http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/index.html 熊本大学生殖工学技術研修会 http://www.mouse-ivf-training.com/archives 熊本大学生命資源研究・支援センター 資源開発分野 http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html</p>
--

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 分 担 者	中渦 直己 (Nakagata Naomi) (30159058)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授 (17401)	
研究 協 力 者	竹尾 透 (Takeo Toru) (10517014)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・講師 (17401)	
研究 協 力 者	佐久間 哲史 (Sakuma Tetsushi) (90711143)	広島大学・大学院統合生命科学研究所・講師 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山本 卓 (Yamamoto Takashi) (90244102)	広島大学・大学院統合生命科学研究科・教授 (15401)	
連携 研究者	王 斗艶 (Douyan Wang) (30508651)	熊本大学・パルスパワー科学研究所・准教授 (17401)	
連携 研究者	浪平 隆男 (Namihira Takao) (40315289)	熊本大学・パルスパワー科学研究所・准教授 (17401)	