

令和 2 年 4 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18267

研究課題名（和文）ラマン分光法を用いたマウス胚の分子レベルでの卵質評価

研究課題名（英文）Assessment of mouse oocyte quality using Raman spectroscopy

研究代表者

石垣 美歌 (Ishigaki, Mika)

島根大学・学術研究院農生命科学系・助教

研究者番号：60610871

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：卵子成熟に伴う卵内物質変化と受精能との関係性を評価した。hCG投与後13h、15h、18h、24hの卵子からラマンスペクトルを取得し、主成分分析を行って卵子成熟に伴う分子組成変化を導出した。主成分1によって24hのデータセットが他実験区から分けられ、不飽和脂肪酸の相対濃度が過熟胚で高くなっていることが示された。また主成分4により15hの胚で均一的にリン酸濃度が高く、リン酸のバンド強度比から、過熟胚が酸性に傾いている可能性が示された。そしてレーザー照射後の卵子に体外受精を施し、胚盤胞への発生率を調べた結果、発生率50%という良好な結果が得られ、レーザーによる影響はほとんど検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果により、特に不妊治療分野において、卵子及び受精卵の新たな評価手法を提示できる可能性がある。レーザーによる影響が全くない条件を検討できれば、胚中タンパク質のリン酸化をラマン分光法によって非破壊、非染色に評価して受精能や発生能を予測し、受精卵を体内に戻すことができると予想される。卵質の分子レベルでの無侵襲評価という、不妊治療分野における医療技術の進歩に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It was aimed to identify biomarkers for mice oocyte maturation in metaphase II in vivo and in situ using Raman spectroscopy. Principal component analysis of Raman data points of oocytes at Phase 13h, 15h, 18h, and 24h showed that the phosphoric acid concentration uniformly increased in oocytes with higher developmental competence than in oocytes at other maturation stages, and proteins were more phosphorylated. Furthermore, detections of higher concentration of unsaturated fatty acids in overmatured oocytes indicated that a decline in metabolic activity due to overmaturation induced a surplus of these lipid components. Upon assessing invasiveness by laser irradiation, about 50% irradiated oocytes progressed to morula and blastocyst stages in good conditions. Thus, Raman spectroscopy holds promise in evaluating oocyte maturation and quality based on molecular information in infertility treatment.

研究分野：分子光学

キーワード：ラマン分光法 卵質評価 非破壊評価

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精卵は分化全能性を持っているが、全てが生存可能なわけではなく、その生存可能性は受精卵の質に依ると言われている。そして養殖業や不妊治療など、受精卵が主体となる分野において、しばしばこの“受精卵の質”が重要な鍵となり、近年受精卵の分子発生メカニズムに関する研究や卵質に関する研究が盛んに行われている。

生物物質を網羅的に解析する現存の手法では、組織を破壊あるいは染色する必要があり、受精卵を生かしつつ分子発生メカニズムや卵質についての評価を行うことができない。また、胚の形態学的特長は卵質評価の指標の1つとはなり得るが、卵質とは何かという疑問に対して情報を提供することができない。さらに、受精卵培養液からの代謝活性評価は、分化発生メカニズムや卵質の間接評価手法であり、より直接的に受精卵の代謝活性を評価することができれば、より確実な情報を基にこれら进行评估できると考えられる。非破壊・非侵襲な受精卵の評価手法を確立することで、生きた状態の代謝活性を分子レベルで評価できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ラマン分光法を用いたマウス胚卵質の非侵襲評価法を確立することを目的とした。卵子成熟やエイジングに伴う卵内物質変化の情報を、生きたままの卵子から非破壊・非侵襲的に取得し、卵質に関係するバイオマーカーを探る。またそのマーカーにより、受精能・発生能の高い卵子を判別できるか検証する。そして、卵子に対するレーザー照射の影響を評価し、ラマン分光法の卵質評価への応用可能性について検証することを目指す。

3. 研究の方法

マウス卵子はhCGホルモンによる過排卵処理したICRマウスから採取した。排卵された卵子のうち、hCG投与後15時間の卵子が受精能・発生能ともに高いことが知られている。そこで、hCG投与後13時間(I)、15時間(II)、18時間(III)、24時間後(IV)の卵子を採取し、ラマン測定を行った(図1)。測定には、CO₂インキュベータ搭載の顕微ラマンシステムを用い、37°Cに保って測定を行った。785 nmの励起波長、40倍水深レンズを使用し、サンプルポイント60 mW、露光時間30秒で測定した。

測定データに対して主成分分析(PCA)を行い、卵子成熟に伴う生体分子組成の変化を導出した。その結果、主成分1(PC1)のローディングには不飽和脂肪酸由来のスペクトルパターンが表れており(1271, 1308, 1445, 1658, 1742 cm⁻¹)、24時間の胚で脂質の相対濃度が高くなっていることが示された(図2)。またPC4で時間経過に伴い、大きく2つのデータセットに分かれた。PC4のローディングでは、リン酸に由来するバンドが検出され(980, 1046, 1080 cm⁻¹)、15時間の胚でリン酸濃度が高く、またタンパク質がよりリン酸化されていることを示唆する結果が得られた(図2)。これは細胞質成熟に伴うタンパク質のリン酸化を検出している可能性がある。

さらに、リン酸由来の2つのピーク(980, 1080 cm⁻¹)が、PC4において逆向きに現れていることについて考察を行うため、液性を変化させた時の2つのバンド強度変化について調べた。980, 1080 cm⁻¹のバンドはそれぞれdibasic (-OPO₃²⁻)、monobasic (-OPO₃H)由来のバンドであり、リン酸化セリン水溶液の液性を変化させると、酸性で1080 cm⁻¹、アルカリ性では980 cm⁻¹のバンド強度が高くなることが確認できた(図3)。つまり、PC4のリン酸バンドの向きから、13時間、

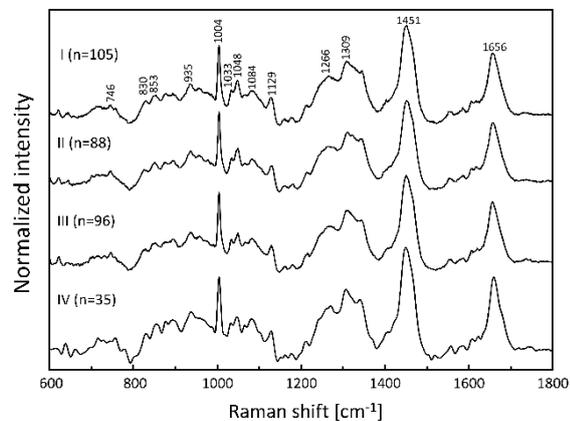


図1: hCG投与後13h, 15h, 18h, 24hの平均ラマンスペクトル。

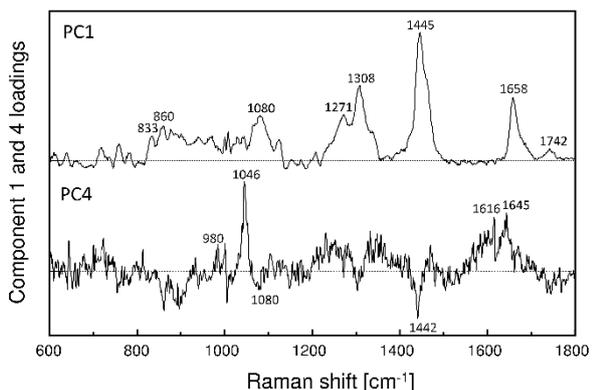
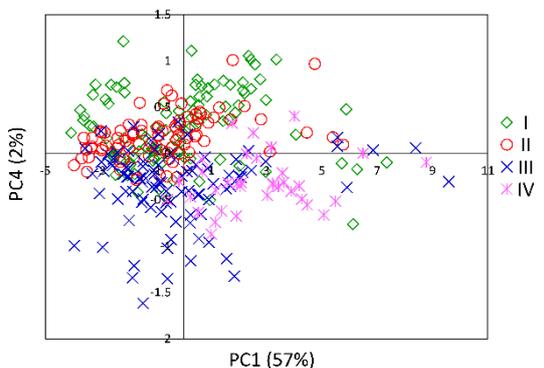


図2: 主成分分析。(左) スコアプロット、(右) ローディングプロット。

15 時間の胚では 980 cm^{-1} のバンド強度が 1080 cm^{-1} に対して相対的に強くなっていることを示している。つまり、過熟胚が酸性に傾いている可能性が示された。

次に PC4 を用いて線形判別分析を行った。4 つの実験区から半分のデータセットを抜き出し、成熟過程の前半 (13h, 15h) と後半 (18h, 24h) に対するスペクトルモデルを作成し、残りの未知サンプルをモデルに当てはめて、正しく判別されるか検証した。その結果、84.5%の精度で前半、後半を正しく判別でき、15 時間では 90.7%と最も判別精度が高くなった。13 時間では、LDA スコアの値が高いものが見受けられるが、全体的にばらつきが大きく、15 時間では均一的な値を取ることから、リン酸化の状態が 15 時間の胚で均一的に良い状態になって成熟が完了していると解釈された (図 4)。

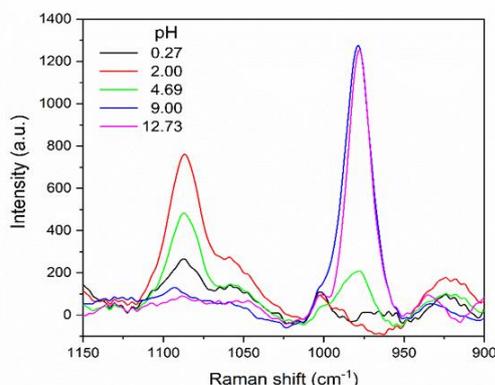


図 3 : リン酸化セリンのラマンスペクトル。

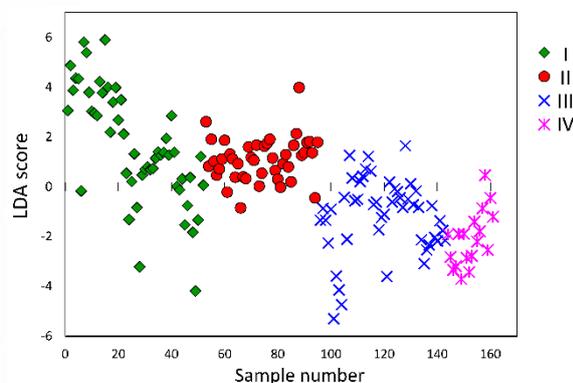


図 4 : 線形判別分析のスコアプロット。

最後にレーザー照射による影響を評価するため、レーザー照射後の卵子に体外受精を施し、培養してその後の発生過程を観察した。図 5 は、体外受精後 5 日目の胚であり、桑実胚・胚盤胞への発生率を求めた。その結果、レーザー照射後の胚発生率は約 50% (レーザー未照射: 約 60%) となり、良い培養状態であることが確認された。今回はレーザー強度を強くして卵子に照射したにも関わらず、ほとんどその影響が検出されなかった。そのため、今後はさらに全くレーザーによる侵襲のない条件を検討できる可能性が示唆された。

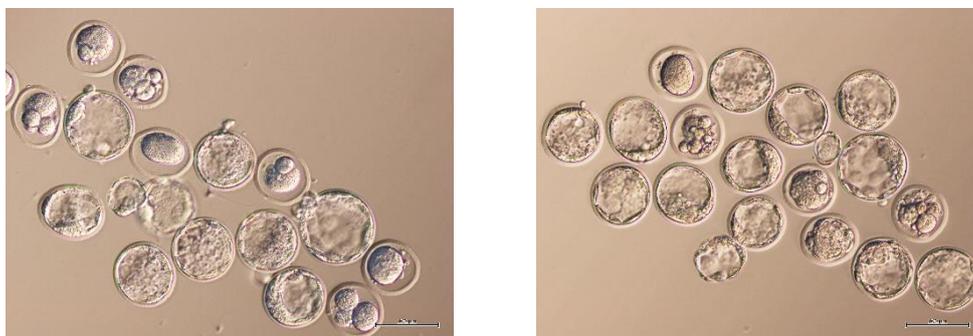


図 5 : 体外受精後 5 日目の胚。(左) レーザー照射、(右) レーザー未照射。

4. 研究成果

以上のように、卵子成熟に伴う生化学的分子組成変化を、ラマン分光法を用いて非侵襲的にモニタリングできる可能性が示された。本研究で得られた結果により、特に不妊治療分野において、卵子及び受精卵の新たな評価手法を提示できる可能性がある。レーザーによる影響が全くない条件を検討できれば、胚中タンパク質のリン酸化をラマン分光法によって非破壊、非染色に評価して受精能や発生能を予測し、受精卵を体内に戻すことができると予想される。卵質の分子レベルでの無侵襲評価という、不妊治療分野における医療技術の進歩に貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mika Ishigaki, Yumi Hoshino, Yukihiro Ozaki	4. 巻 144(5)
2. 論文標題 Phosphoric acid and phosphorylation levels are potential biomarkers indicating developmental competence of matured oocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 1527-1534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C8AN01589A	査読の有無 有
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7件（うち招待講演 4件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Mika Ishigaki, Yumi Hoshino, Yukihiro Ozaki
2. 発表標題 Non-invasive assessment of developmental competence of mouse oocytes using Raman spectroscopy
3. 学会等名 The 26th International Conference on Raman Spectroscopy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mika Ishigaki, Yumi Hoshino, Yukihiro Ozaki
2. 発表標題 Non-invasive assessment of mouse oocyte maturation using Raman spectroscopy
3. 学会等名 International Conference on Advancing Molecular Spectroscopy（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石垣美歌, 星野由美, 尾崎幸洋
2. 発表標題 ラマン分光法を用いたマウス卵子成熟の非破壊分析
3. 学会等名 第15回医用分光学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石垣美歌, 星野由美, 尾崎幸洋
2. 発表標題 ラマン分光法を用いたマウス卵子成熟に伴う受精能・発生能の分析
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石垣美歌
2. 発表標題 ラマン分光法・近赤外分光法を用いたがん組織, 受精卵の非破壊分析
3. 学会等名 第13回 近畿分析技術研究奨励賞受賞講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mika Ishigaki
2. 発表標題 Assessment of bioactivity by Raman spectroscopy
3. 学会等名 Raman Fest 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mika Ishigaki, Hina Mitsutsuka, Hemanth Noothalapati, Yumi Hoshino, Tatsuyuki Yamamoto
2. 発表標題 Relationship between protein phosphorylation and bioactivity analyzed by Raman spectroscopy
3. 学会等名 ICAVS 10 (招待講演) (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
--	---------------------------	-----------------------	----