

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09439

研究課題名（和文）ヒト胚発育動態と細胞内外の電解質の時間的・空間的变化との関連

研究課題名（英文）Relationship between human embryonic development dynamics and temporal and spatial changes in intracellular and extracellular electrolytes

研究代表者

熊澤 由紀代（Kumazawa, Yukiyo）

秋田大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70400504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、2波長性のインジケータを用い、インジケータの分布の均一性に影響されないより精密なNa/Kの動態の観測を試みた。結果として2波長性インジケータの使用により客観性をもった電解質動態解析が可能となり当該年度の日本産科婦人科学会等で報告した。現在論文発表に向けて準備を進めている。

また、Na/K移動で重要な役割をするNa/K ATPaseについて、その分子については殆ど知見がない、そこで構成するサブユニット・ α につきそのアイソフォームについてq-RT-PCRを用いて解析し、論文発表を行い国際誌であるHuman Reproductionに当該年度に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

保険診療化された生殖補助技術であるがその医療としての効率は向上していない。胚（受精卵）培養は生殖補助技術の基盤であるがそれに使用される培養液は未だ実験的試薬として扱われており、最善の組成に関する情報は少ない。

本研究での知見のような基礎情報が積み重ねられることにより、さらに適した胚培養液が開発されることが期待され、生殖補助技術の効率向上（Time to Pregnancyの短縮）により主として受療する女性のさらなる社会進出、参入がすすむことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, a dual wavelength indicator was used to attempt more precise observation of Na/K dynamics that is not affected by the uniformity of the indicator distribution. As a result, the use of a dual wavelength indicator enabled more objective analysis of electrolyte dynamics, and this was reported at the Japan Society of Obstetrics and Gynecology and other conferences that year. Preparations are currently underway for publication of the paper. In addition, very little is known about the Na/K ATPase molecule, which plays an important role in Na/K transfer, so the isoforms of the constituent subunits α and β were analyzed using q-RT-PCR, and a paper was published that year in the international journal Human Reproduction.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胚盤胞 Naインジケータ Kインジケータ Na/K ATPase サブユニット

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は現在までに細胞間接着や電解質チャネルの発現、また TE ならびに ICM の細胞数という面からヒトおよびマウス胚発育についての検討を重ねてきた。特にコラプスや胞腔形成などの胚が示す動的な形態変化に着目し、発育良好胚と不良胚での構成細胞数や電解質チャネルの免疫染色による発現などの知見を重ねてきた。(PLoS ONE 2017,2019)

既報では阻害剤等を用いて各チャネルの働きについては様々な考察がなされている。しかし電解質チャネルは電解質の輸送だけではなく、メッセンジャー機能を持ち合わせていることも明らかになっており、阻害剤を使用するとそれら機能をも阻害してしまうため、電解質の濃度勾配のみがどこまで胚発育に関わっているのかは明らかにできていない。胚発育における実際の電解質の動態を捉えた報告はないが、心筋や神経細胞で細胞内外の種々の電解質の挙動を生体のまま解析しうるインジケーターが開発されている。今回我々がそれらインジケーターを用い胚盤胞発育までにおける電解質の動態を明らかにすることは、胚発育の細胞生理学的な知見を得る上で必要な動態であると考えに至った。さらに、現在ヒト体外受精の臨床で市販され使用されている培養液の電解質の濃度は動物胚培養や臨床の結果より経験的に設定されている。ヒト胚発育過程のそれぞれのステージでの実際の電解質挙動を解析することは、将来的によりよいヒト胚培養環境の開発に有益であると考えた。以上のように本研究にて得られた結果は生殖医学の発展において大きな萌芽になるのではないかと着想に至った。

2. 研究の目的

ヒト及びマウス胚の各発育段階における細胞内ならびに胞腔内の電解質濃度を明らかにし、さらにそれらの挙動と細胞間接着因子・電解質チャネルの発現との関連を解明する。それら知見から、胚の発育を改善させる培養環境を提言する。

3. 研究の方法

1: 胚発育段階における電解質と細胞間接着因子・電解質チャネルの関連

2細胞期からハッチングするまでのマウス胚培養系にナトリウムインジケーター (SBFI AM: Thermo Fisher) カリウムインジケーター (PBFI AM: Thermo Fisher) を添加することでそれらの電解質の細胞内濃度・胞腔内濃度の推移を可視化し、胚発育における電解質の挙動を共焦点レーザー顕微鏡により観察する。その後細胞間接着分子および各電解質チャネルの免疫染色を行い、それらの発現と電解質の挙動との関連を明らかにする。ナトリウムイオンが積極的に胞腔内に輸送されるため培養液よりもより高張液となると推定している。ナトリウムイオンを輸送する過程でカリウムイオンは胞腔内から積極的に TE 細胞内へ輸送されるためナトリウムと相反する挙動を示す可能性がある。

2: ヒト胚における電解質挙動と Na^+/K^+ ATPase の mRNA の定量

凍結融解後のヒト体外受精胚移植プログラムで生じた余剰胚に対し上記電解質インジケーターを用い、マウス胚で確立した電解質イメージングを行う。さらに融解後の TE 細胞を生検し、qPCR を用いて Na^+/K^+ ATPase の mRNA の定量を行い、電解質イメージングとの関連を明らかにする。マウス胚においては胚盤胞期において最も発現が多くなることが示されているものの、ヒト胚における Na^+/K^+ ATPase の mRNA の定量は未だ報告はない。本研究室ではマウス胚の胚収縮後に再拡張に向け Na^+/K^+ ATPase のサブユニットの mRNA である *Atp1a1* が上昇することを明らかにしている (Shimoda Y, [Kumazawa Y](#) et al. J Reprod Dev.2016)。現在ヒト胚の Na^+/K^+ ATPase の各サブユニットの mRNA の定量に向け実験を進めている。

3: 臨床で使用されているヒト胚培養液間での電解質の挙動の相違

現在、臨床では胚の培養においてはステージごとに培養液を変える Sequential medium と、すべてのステージで同じ溶液を使用する Single step medium が存在する。現時点では2種の培養液が胚発育に及ぼす相違は様々な議論がなされているが、臨床成績には大差ないとしているものが多い。今回はこれら2種の培養液を使用し、それぞれの使用時の電解質挙動の差を把握する。

4：体外受精胚移植の培養環境に関する電解質生理学知見からの提言の構築

上記のごとくタイムラプス観察と電解質インジケータを用いた観察を組み合わせることで、胚発育でみられるダイナミックな胚の挙動と電解質の関連を明らかとする。このことは既報では行われておらず、今まで間接的にのみ推測されていた胚の挙動を引き起こす細胞生理学的な原理を説明することができる。本研究の成果をもとに、新たな培養液を含む培養環境開発に向けての情報を発信する。

4．研究成果

1：胚発育段階における電解質と細胞間接着因子・電解質チャネルの関連

当施設ではこれまでに1波長性のNa/Kインジケータを用いて、Na/Kの胚盤胞における動態を明らかにした。ただし1波長性のインジケータでは、インジケータ濃度分布が観察結果に影響を及ぼす可能性があり、2波長性のインジケータを用い、インジケータの分布の均一性に影響されないより精密なNa/Kの動態の観測を試みた。結果として2波長性インジケータの使用により客観性をもった電解質動態解析が可能となり当該年度の日本産科婦人科学会および日本生殖医学会で報告した。

第74回日本産科婦人科学会学術講演会(2022.8.5-7 福岡)

藤島綾香, 藤嶋明子, 尾野夏紀, 富樫嘉津恵, 白澤弘光, 佐藤亘, 熊澤由紀代, 寺田幸弘(2022) 2波長性電解質インジケータを用いた胚盤胞期マウス胚におけるNa⁺濃度の経時的変化の解析.

第67回日本生殖医学会学術講演会(2022.11.3-4 横浜)

藤島綾香, 高橋和政, 岩澤卓也, 藤嶋明子, 白澤弘光, 佐藤亘, 熊澤由紀代, 寺田幸弘(2022)

2波長性電解質インジケータを用いた哺乳動物胚盤胞内の電解質濃度変化の解析.

なお上述の2波長性インジケータにおけるNa⁺のさらなる経時的解析により、マウス胚盤胞の栄養外胚葉細胞中のNa⁺濃度の変化に特徴的なパターンが存在すること、またそれが胚盤胞脱出と関連性があることが見出され、現在論文発表に向けて準備を進めている。

2：ヒト胚における電解質挙動とNa⁺/K⁺ ATPaseのmRNAの定量

また、Na/K移動で重要な役割をするNa/K ATPaseについて、その分子については殆ど知見がない、そこで構成するサブユニット α 1と α 3につきそのアイソフォームについてq-RT-PCRを用いて解析し、 α 1および α 3が有意に多く発現し、また免疫染色によりそれらが胞胚腔内壁に集中して発現していることを確認し論文発表を行い国際誌であるHuman Reproductionに当該年度に掲載された。

Hirakawa T, Goto M, Takahashi K, Iwasawa T, Fujishima A, Makino K, Shirasawa H, Sato T, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y (2022) Na⁺/K⁺ ATPase α 1 and α 3 subunits are localized to the basolateral membrane of trophectoderm cells in human blastocysts. Human Reproduction, 37(7):1423-1430.

3：臨床で使用されているヒト胚培養液間での電解質の挙動の相違

現在検討中である。

4：体外受精胚移植の培養環境に関する電解質生理学知見からの提言の構築

1に記したごとく、電解質動態の客観的評価は確立できたので、3の結果も含めて今後の研究の進捗拡大をもって正確性、タイミングを慎重に考慮したうえで発信できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Okabe Motonari, Shirasawa Hiromitsu, Ono Yuki, Goto Mayumi, Iwasawa Takuya, Sakaguchi Taichi, Fujishima Akiko, Onodera Yohei, Makino Kenichi, Miura Hiroshi, Kumazawa Yukiyo, Takahashi Kazumasa, Terada Yukihiko	4. 巻 22
2. 論文標題 An approach for live imaging of first cleavage in mouse embryos using fluorescent chemical probes for DNA, microtubules, and microfilaments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12551	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 Hasegawa H, Takahashi K, Kobayashi T, Iwasawa T, Fujishima A, Togashi K, Makino K, Shirasawa H, Miura H, Sato W, Kumazawa Y, Kobayashi J, Terada Y	4. 巻 50(2)
2. 論文標題 DIAMETER OF HUMAN DAY 6 BLASTOCYSTS REFLECTS THE GENETIC HOMOGENEITY OF TROPHECTODERM COMPONENTS.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Akita J Med	6. 最初と最後の頁 63-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20569/0002000071	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 -

1. 著者名 Fujishima Akiko, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Hirakawa Takeo, Iwasawa Takuya, Togashi Kazue, Maeda Eri, Shirasawa Hiromitsu, Miura Hiroshi, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Live visualisation of electrolytes during mouse embryonic development using electrolyte indicators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246337	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 -

1. 著者名 Shitara Akihiro, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Takahashi Harunori, Iwasawa Takuya, Onodera Yohei, Makino Kenichi, Miura Hiroshi, Shirasawa Hiromitsu, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246438	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 -

1. 著者名 Takahashi Harunori, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Hirakawa Takeo, Hasegawa Hisataka, Shitara Akihiro, Iwasawa Takuya, Togashi Kazue, Makino Kenichi, Shirasawa Hiromitsu, Miura Hiroshi, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Consistency between chromosomal status analysis of biopsied human blastocyst trophectoderm cells and whole blastocyst cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 444 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12400	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 Hirakawa T, Goto M, Takahashi K, Iwasawa T, Fujishima A, Makino K, Shirasawa H, Sato W, Sato T, Kumazawa Y, Terada Y	4. 巻 37
2. 論文標題 Na ⁺ /K ⁺ ATPase 1 and 3 subunits are localized to the basolateral membrane of trophectoderm cells in human blastocysts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 1423 ~ 1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/humrep/deac124	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24件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト配偶子、胚を用いたARTの基礎研究: add-onsの細胞生物学的検討
3. 学会等名 第65回北海道生殖医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊澤由紀代
2. 発表標題 秋田県における乳がん患者に対する妊孕性温存の実績について
3. 学会等名 第20回日本乳癌学会東北地方会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部基成、白澤弘光、後藤真由美、坂口太一、岩澤卓也、佐藤巨、熊澤由紀代、高橋和政、寺田幸弘
2. 発表標題 シンプルかつ遺伝子操作を伴わないマウス胚第一卵割ライブイメージングの開発
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部基成、白澤弘光、後藤真由美、岩澤卓也、坂口太一、熊澤由紀代、高橋和政、寺田幸弘
2. 発表標題 シンプルかつ遺伝子操作を伴わないマウス胚第一卵割ライブイメージングの開発
3. 学会等名 第64回日本卵子学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト配偶子、胚を用いた細胞生物学的研究の紹介
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部基成、白澤弘光、岩澤卓也、熊澤由紀代、高橋和政、寺田幸弘
2. 発表標題 蛍光プローブを用いたライブイメージングの哺乳類初期胚への応用
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野有紀
2. 発表標題 胚発生研究のNew technology-ヒト受精から初期有糸分裂の非侵襲的ライブセルイメージング
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊澤由紀代、尾野夏紀、白澤弘光、佐藤亘、寺田幸弘
2. 発表標題 卵巣組織凍結時に併用して行う卵子採取の取り組みについて
3. 学会等名 第47回日本外科系連合学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤島綾香、藤嶋明子、尾野夏紀、富樫嘉津恵、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 2波長性電解質インジケータを用いた胚盤胞期マウス胚におけるNa ⁺ 濃度の経時的変化の解析
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤島綾香、高橋和政、岩澤卓也、藤嶋明子、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 2波長性電解質インジケータを用いた哺乳動物胚盤胞内の電解質濃度変化の解析
3. 学会等名 第67回日本生殖医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋和政、九島紫織、岩澤卓也、白澤弘光、佐藤巨、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト受精卵の第一卵割動態と胚盤胞におけるPGT-Aの結果に関連性はあるか
3. 学会等名 第59回東北生殖医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田幸弘
2. 発表標題 ART現場でのヒト胚の取り扱いに関する現状とこれから必要な事項
3. 学会等名 第6回ART JAPAN生殖医療研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shirasawa H, Kumazawa Y, Sato W, Togashi K, Takahashi K, Terada Y
2. 発表標題 A study on the Necessity of time lapse monitoring for in vitro maturation in combined procedure at the timing of ovarian tissue cryopreservation
3. 学会等名 ASRM2021 scientific congress & expo
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田幸弘
2. 発表標題 卵子成熟：私なりの視点から参加者にお伝えしたいこと
3. 学会等名 第16回日本受精着床学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田幸弘
2. 発表標題 ARTおよびPGTAに関するヒト胚の細胞生物学的な検討
3. 学会等名 第7回愛媛生殖医学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田幸弘
2. 発表標題 卵の成熟
3. 学会等名 日本受精着床学会第17回ART生涯研修コース
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋和政、高橋玄徳、後藤真由美、富樫嘉津恵、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト胚盤胞栄養外胚葉細胞生検と胚盤胞全体の染色体解析結果の整合性に関する検討
3. 学会等名 第62回日本卵子学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白澤弘光、熊澤由紀代、佐藤亘、富樫嘉津恵、高橋和政、佐藤恵美子、九島紫織、五十嵐なつみ、寺田幸弘
2. 発表標題 当院におけるタイムラプスモニタリング結果を踏まえた、卵巣組織凍結時に併用するIVMの課題点
3. 学会等名 第62回日本卵子学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川久隆、京谷利彦、高橋和政、鈴木亮祐、塚本佳奈、菊本晃代、小林充、櫻井友義、齋藤優、小林淳一、寺田幸弘
2. 発表標題 ヒトD6胚盤胞径は、TEを構成する細胞の遺伝学的均一性を反映する
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 設楽明宏、高橋和政、高橋玄徳、岩澤卓也、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 使用済み培養液中のCell free DNAは、TE生検と比較して長期培養後胚のchromosomal statusをよく反映している
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋和政、高橋玄徳、藤島綾香、富樫嘉津恵、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 栄養外胚葉生検による染色体状態解析結果の胚全体に対する一致性に関する検討
3. 学会等名 第58回東北生殖医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川威夫、後藤真由美、高橋和政、富樫嘉津恵、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト胚盤胞おける Na ⁺ /K ⁺ -ATPase isoform の mRNA 発現量と発育挙動との関係
3. 学会等名 第62回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川威夫、後藤真由美、高橋和政、富樫嘉津恵、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト胚盤胞おける Na ⁺ /K ⁺ -ATPase isoform の 発現
3. 学会等名 第58回東北生殖医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川威夫、後藤真由美、高橋和政、富樫嘉津恵、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト胚盤胞おける Na ⁺ /K ⁺ -ATPase isoform の 発現
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	藤嶋 明子 (Fujishima Akiko) (00866460)	秋田大学・医学部附属病院・助教 (11401)	
研究分担者	寺田 幸弘 (Terada Yukihiro) (10260431)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	
研究分担者	高橋 和政 (Takahashi Kazumasa) (60791910)	秋田大学・医学部附属病院・技術系スタッフ (11401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------