

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25282150

研究課題名(和文) 生殖細胞品質診断を実現する超高精度ミトコンドリア呼吸機能解析システムの開発

研究課題名(英文) Development of a high performance system to assess the mitochondrial respiratory activity and embryo quality based on scanning electrochemical microscopy

研究代表者

阿部 宏之 (Abe, Hiroyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10375199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、電気化学計測技術を基盤とする医療応用可能な超高精度細胞呼吸測定システムの開発を目的とした。単一細胞非侵襲呼吸計測システムを開発するために、(1) 超高感度マイクロ電極と単一細胞呼吸測定技術の開発、(2) ミトコンドリア呼吸機能解析による生殖細胞品質評価法の開発を行った。その結果、単一卵子および胚の酸素消費量を安定的に測定できるマイクロ電極と非侵襲呼吸測定液の開発に成功した。また、ミトコンドリア呼吸機能解析により生殖細胞品質評価法の有効性を明らかにすることができた。本研究では、電気化学計測技術を応用した高精度生殖細胞品質診断のための基盤技術を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：Respiration is useful parameter for evaluating embryo quality as it provides important information about metabolic activity. In this study, we have developed a scanning electrochemical microscopy (SECM) technique that is a non-invasive and sensitive method for measuring oxygen consumption by individual oocytes and embryos. With this system, oxygen consumption of single, identical oocytes and embryos at different developmental stages has been monitored. This study showed that the mitochondrial respiratory activity in embryos increased in morula and peaked in hatched blastocyst and the development of mitochondrial function depends on the gene expression of COX subunit encoded by genomic DNA. This study shows that the SECM technique is able to non-invasively assess the mitochondrial respiration function of individual bovine embryos and the embryo quality. The SECM system may contribute to improvements in reproductive technologies.

研究分野：生殖生物学

キーワード：細胞呼吸 電気化学計測 細胞機能診断 ミトコンドリア 生殖医療

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、エネルギー産生やアポトーシスなど重要な生命現象に関わっている。高精度の呼吸計測技術は細胞の代謝活動やクオリティーの評価、アポトーシス解析やミトコンドリアの機能異常に関連した疾患の診断に極めて有効な方法となる。これまでに蛍光発色法や酸素センサーを用いた細胞呼吸測定法が考案されているが、測定感度や侵襲性の面で課題があり実用化されていない。そこで注目したのが、酸化反応で生じる酸素消費を高感度・非侵襲的に測定できる電気化学イメージング技術である。研究代表者は、マイクロ電極をプローブとする走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いた植物細胞の呼吸活性イメージングや球面拡散理論式を基盤とするウシ胚の呼吸量測定を確立してきた[1]。また、詳細な生物学的解析により、胚の品質とミトコンドリア機能が密接に関係していることを発見し、これを基にミトコンドリア呼吸を指標とする独自の受精卵クオリティー評価法を提唱している[2]。さらに、卵子や受精卵などの球状試料の呼吸測定に特化した「受精卵呼吸測定装置」を開発し、卵成熟から孵化胚盤膜までのミトコンドリア呼吸機能解析に成功している[2]。しかしながら、胚の品質評価に対する呼吸測定の有効性に関する検証は不十分である。単一細胞レベルでの精度の高いミトコンドリア呼吸機能の解析は、生命機能機序の新たな知の創出や細胞機能診断技術の開発のために不可欠の技術である。

2. 研究の目的

本研究では、電気化学イメージング技術を応用した超高感度単一細胞呼吸解析システムを開発する。また、遺伝子から細胞呼吸までミトコンドリア呼吸機能解析を階層的に解析できる単一細胞機能解析技術を確立し、この診断システムの有効性と安全性を評価する。本研究の最終目標は、呼吸活性を指標とする新しい生殖細胞品質診断システムを確立し、不妊治療など医療分野で実用化できる新しい細胞診断システムを開発することである。

3. 研究の方法

本研究では、単一細胞の呼吸活性を検出することができる超高感度細胞呼吸測定システムを開発し、呼吸活性を指標とする単一細胞機能診断システムの有効性と安全性を調べるために、以下の研究を行った。

(1) 単一細胞呼吸測定システムの開発：単一細胞の安定した呼吸測定を可能とする高精度マイクロ電極、計測感度に影響しない

非侵襲測定液を開発する。

(2) 単一細胞ミトコンドリア機能解析システムの開発：単一細胞のミトコンドリア呼吸機能の解析を可能とする高精度ミトコンドリア呼吸機能解析技術を開発する。

(3) 細胞機能診断システムの開発：ミトコンドリア呼吸機能を指標とする生殖細胞機能診断システムを開発する。ミトコンドリア呼吸機能の指標として、(a) ミトコンドリア膜電位活性、(b) 酵素複合体チトクローム c 酸化酵素 (COX) の遺伝子発現の解析を行い、胚品質診断システムの有効性と安全性 (非侵襲性) を調べる。

4. 研究成果

(1) 超高感度マイクロ電極の開発

マイクロ電極の感度を向上させるために、白金電極の電解エッチング法、白金電極をガラスキャピラリーに封入するための熱封止及び封止後の電極研磨のそれぞれの工程を改良した。その結果、酸素還元条件下 (-0.6V 荷電下)において還元電流-1.0 nA以下の感度を有するディスク型マイクロ電極を作製することができた。電極サイズが酸素消費量計測に及ぼす影響について検討した結果、単一胚の呼吸量計測に適した電極サイズは、白金先端径が 2~5 μm であることがわかった。

(2) 非侵襲呼吸測定液の開発

電気化学計測では感度が向上するにつれて、溶液中の電解質組成やタンパク質が計測感度に影響を及ぼす可能性がある。そこで、成分組成が異なる数種類の培養液中での計測感度を解析した。その結果、TCM199、DMEM、RPMI1940 など一般に細胞培養に用いられている培養液を測定に用いた場合、測定開始直後に還元電流が急速に低下し、測定開始約 30 分後には測定が不可能になった。一方、受精卵の培養に用いられ、比較的単純な組成である HTF (human tubal fluid) 培地やヒト胚の培養に用いられている HFF99 培地を測定液として用いた場合、長時間にわたって安定した還元電流を計測することができた。これらの結果から、本研究では HTF 培地を基本とする呼吸測定液を受精卵の呼吸測定に用いることにした。

(3) 非侵襲呼吸測定液の安全性評価

HTF 培地を改変して作製した呼吸測定液を用いてウシ胚の呼吸量を測定し、受精卵に対する侵襲性の有無を調べた。呼吸測定後の受精卵を追加培養し発生率の変化を調べた結果、対照区 (呼吸測定を行わなかった受精卵) と比べて胚の発生率の低下は起こらず、電子顕微鏡観察によっても細胞膜や細胞小器官などに損傷は認められなかった。これらの結果から、HTF 培地をベー

スに製作した測定液は胚に対して非侵襲的であり、高感度の電気化学呼吸測定に有効であることが示された。

(4) 単一生殖細胞品質評価法の開発

新たに開発した高感度マイクロ電極と呼吸測定液を SECM に組み入れた細胞呼吸測定システムを用いた生殖細胞品質評価システムの開発を行った。

各発生ステージのウシ胚の呼吸量を測定した結果、桑実胚から胚盤胞のステージにおいて有意に呼吸量が上昇し、孵化胚盤胞において最大になった (図 1)。

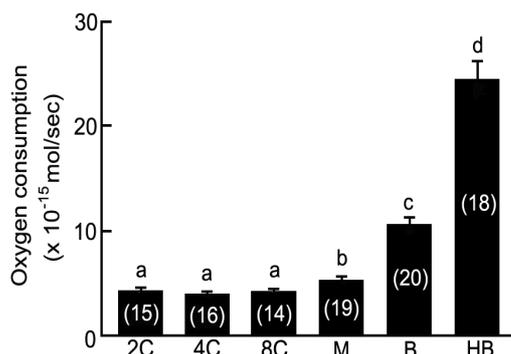


図 1. ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化。桑実胚期(M)から胚盤胞期(B)にかけて呼吸量が増加し、孵化胚盤胞(HB)において最大になった。括弧内の数字は、測定した胚数を示す。異符号間で有意差 ($P < 0.05$) がある。

呼吸量の変化とミトコンドリア呼吸機能との関係を調べるために、発生過程におけるミトコンドリア膜電位活性の変化を調べた。JC-10 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide derivative) で染色した結果、呼吸量が増加する桑実胚期から胚盤胞期にかけて、ミトコンドリア膜電位活性の顕著な上昇が観察された (図 2)。さらに、形態良好胚と形態不良胚でミトコンドリア膜電位活性を定量解析し比較したところ、形態不良胚では、ミトコンドリア膜電位の低下が認められた。

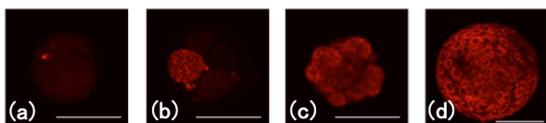


図 2. ウシ胚におけるミトコンドリア膜電位 (高膜電位 (High $\Delta\Psi_m$)) の赤色蛍光像の変化。(a) 2細胞期胚、(b) 8細胞期胚、(c) 桑実胚、(d) 胚盤胞。スケールバーは、100 μm を示す。

次に、1細胞期から胚盤胞期までの各発生ステージの胚において、呼吸鎖複合体IV

(酵素複合体チトクローム c 酸化酵素: COX) を構成する 13 の COX サブユニットの mRNA を RT-PCR 法及び定量 PCR 法により解析した。ミトコンドリアゲノム由来であり COX の酵素活性部位を構成する Cox1、Cox2 及び Cox3 の mRNA は、1細胞から胚盤胞の全ての発生ステージにおいて検出された。一方、核ゲノム由来の COX サブユニットの mRNA は、ミトコンドリアゲノム由来の COX サブユニット mRNA と比べて発生過程で顕著な発現量の変化を示した。1細胞期及び2細胞期では 10種類全てのサブユニットの mRNA が検出されたが、4細胞期から8細胞期にかけて多くのサブユニットの mRNA 量は減少した。桑実胚から胚盤胞のステージでは、核ゲノム由来の全てのサブユニットにおいて mRNA の発現量は顕著に増加した。

定量 PCR 法により各 COX サブユニット mRNA の発現量を解析した結果、ミトコンドリアゲノム由来の Cox3 の mRNA は 1細胞期から胚盤胞期までは大きな変化はなかった (図 3a)。一方、核ゲノム由来の Cox6b の mRNA は 1細胞期から8細胞期まで発現量は非常に少なく、桑実胚と胚盤胞で急激に増加した (図 3b)。核ゲノム由来の Cox mRNA は、サブユニットによって若干異なる発現パターンを示しているが、桑実胚から発現量が増えることが明らかになった。

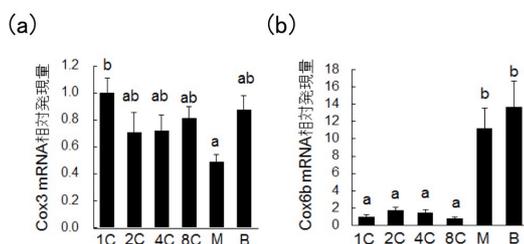


図 3. 定量 PCR によるウシ胚における Cox mRNA の検出。(a) Cox3、(b) Cox6b。1C: 1細胞期胚、2C: 2細胞期胚、4C: 4細胞期胚、8C: 8細胞期胚、M: 桑実胚、B: 胚盤胞。

本研究により、酸素消費量の増加はミトコンドリア膜電位の上昇と新たに開発した細胞呼吸測定システムは、ウシ胚のミトコンドリア呼吸機能を高精度で検出できることが示された。また、ミトコンドリア呼吸機能を指標に単一胚レベルでの品質診断が可能であることが示唆された。

本研究では、研究期間 (3年間) において最も重要な目的であった単一細胞 (卵子・胚) の非侵襲呼吸測定システムを開発することができた。

<引用文献>

① Shiku H., Shiraiishi T., Ohya H.,

Matsue T., Abe H., Hoshi H., Kobayashi M. (2001) Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. *Anal. Chem.*, 73: 3751-3758.

- ② Abe H. (2007) A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J. Mamm. Ova Res.*, 24:70-78.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Igarashi H., Takahashi T., Abe H., Nakano H., Nakajima O., Nagase S. (2016) Poor embryo development in post-ovulatory *in vivo*-aged mouse oocytes is associated with mitochondrial dysfunction, but mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation. *Hum. Reprod.*, 31 (10): 2331-2338.
DOI: 10.1093/humrep/dew203
- ② Kurosawa H., Tachibana M., Utsunomiya H., Shiga N., Takahashi A., Ishibashi M., Watanabe Z., Abe H., Terada Y., Takahashi T., Fukui A., Suganuma R., Yaegashi N. (2016) Development of a new clinically applicable device, chip-sensor mediated oxygen consumption measuring system, for embryo evaluation. *Hum. Reprod.*, 31 (10): 2321-2330.
DOI: 10.1093/humrep/dew187
- ③ Mori C., Yabuuchi A., Ezoe K., Murata N., Takayama Y., Okimura T., Uchiyama K., Takakura K., Abe H., Wada K., Okuno T., Kobayashi T., Kato K. (2015) Hydroxypropyl cellulose as an option for supplementation of cryoprotectant solutions for embryo vitrification in human assisted reproductive technologies. *Reprod. BioMed. Online*, 30: 613-621.
DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.02.004
- ④ Sakagami N., Nishida K., Akiyama K., Abe H., Hoshi H., Suzuki C., Yoshioka K. (2015) Relationships between oxygen consumption rate, viability and subsequent development of *in vivo*-derived porcine embryos.
DOI:10.1016/j.theriogenology.2014.06.027
- ⑤ Hoshino S., Kurotani R., Miyano Y., Sakahara S., Koike K., Maruyama M.,

Ishikawa F., Sakata I., Abe H., Sakai T. (2014) Macrophage colony-stimulating factor induces prolactin expression in rat pituitary glands. *Zool. Sci.*, 31:390-397.
DOI: 10.2108/zs130226

[学会発表] (計 6 5 件)

- ① 黒澤大樹、宇都宮裕貴、志賀尚美、渡邊善、井原基公、石橋ますみ、高橋藍子、阿部宏之、寺田幸弘、熊谷 仁、高橋俊文、五十嵐秀樹、福井淳史、菅沼亮太、八重樫伸生 (2015) チップ型受精卵呼吸測定装置による受精後 2 日目凍結ヒト余剰胚の呼吸量と発育能の検討、第 33 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (東京、TFT ホール、2015 年 11 月 26-27 日)
- ② 黒谷玲子、遠藤駿介、高倉啓、坂原聖士、阿部宏之 (2015) ウシ卵子及び胚における呼吸鎖複合体 IV の遺伝子発現は培養環境によって変化する、第 33 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (東京、TFT ホール、2015 年 11 月 26-27 日)
- ③ 坂田昂弥、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2015) ウシ卵子及び胚のミトコンドリアは発生ステージと細胞内局在によって機能が変化する、第 33 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (東京、TFT ホール、2015 年 11 月 26-27 日)
- ④ 阿部宏之 (2015) 先端工学技術を応用した胚品質評価法の開発と生殖医療への応用、第 8 回日本動物超音波技術研究会大会 (盛岡市、岩手大学農学部、2015 年 11 月 6-7 日)
- ⑤ 遠藤駿介、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2015) ウシ胚における呼吸鎖複合体 IV の遺伝子発現は培養条件によって変化する、第 53 回東北生殖医学会総会・学術講演会 (山形市、ホテルキャッスル山形、2015 年 10 月 3 日)
- ⑥ 阿部宏之、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子 (2015) 異なる培地で発生したウシ胚における呼吸鎖複合体 IV の遺伝子発現解析、日本動物学会第 86 回大会 (新潟市、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、2015 年 9 月 17-19 日)
- ⑦ 阿部宏之 (2015) 単一卵子・受精卵の呼吸代謝解析技術の開発と不妊治療における臨床応用、シンポジウム：一細胞レベル計測の発展にみる新しい研究の可能性、日本動物細胞工学会 2015 年度大会 (仙台市、東北大学片平さくらホール、2015 年 7 月 9-10 日)
- ⑧ Kurotani R., Watanabe T., Ichikawa S., Sakahara S., Takakura K., Abe H. (2015) Multiple analyses of mitochondrial respiration activity in mouse embryos. IFFS/JSRM International Meeting 2015 (Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, April

26-29, 2015)

- ⑨ Abe H., Sakata K., Sakahara S., Takakura K., Kurotani R. (2015) Analysis of mitochondrial respiration activity in bovine pre-implantation embryos. IFFS/JSRM International Meeting 2015 (Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, April 26-29, 2015)
- ⑩ Kurosawa H., Utsunomiya H., Takahashi A., Ishibashi M., Nishimoto M., Shiga N., Watanabe Z., Abe H., Terada Y., Suganuma R., Yaegashi N. (2015) Investigation of oxygen consumption rate of bovine embryos measured by chip electrode. IFFS/JSRM International Meeting 2015 (Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, April 26-29, 2015)

[図書] (計2件)

- ① 阿部宏之:酸素消費測定による胚の品質評価ー超高感度細胞呼吸測定装置の開発と不妊治療における臨床応用ー、**医学のあゆみ**「生殖医療の最前線」、249(1)、19-24、2014.
- ② 阿部宏之:ARTにおける新技術・酸素消費と胚評価、臨床婦人科産科「生殖医療の進歩と課題ー安全性の検証から革新的知見まで」、68巻1号: 20-27、2014

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://abe-labo.yz.yamagata-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 宏之 (ABE, Hiroyuki)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 10375199

(2) 研究分担者

黒谷 玲子 (KUROTANI, Reiko)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 00453043

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

高倉 啓 (TAKAKURA, Kei)
坂原 聖士 (SAKAHARA, Satoshi)