

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506006

研究課題名(和文) 宇宙空間で利用可能な受精胚培養法の開発

研究課題名(英文) Develop a new mammalian embryo thaw and culture system for ISS.

研究代表者

若山 清香 (WAKAYAMA, Sayaka)

山梨大学・総合研究部・特任助教

研究者番号：10525918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：地球上の生物が宇宙で生殖可能かどうかは重要なテーマであり、これまでイモリやメダカを用いて研究が進められてきた。しかし哺乳類については、飼育の難しさから宇宙での生殖実験はほとんど行われていない。我々はJAXAと共同で凍結したマウス2細胞期胚をISSへ打ち上げ、宇宙ステーション内で解凍し4日間培養を試みる実験を計画しているが、宇宙空間で受精胚を解凍培養できる実験器具は存在しない。さらに哺乳動物受精胚の実験には高度な技術が必要とされることから、本研究代表者は操作をできるだけ簡略化して宇宙飛行士に負担をかけずに、確実に胚を解凍し培養できる装置の開発を行うことにした。

研究成果の概要(英文)：The main problem for mammalian reproduction experiments in space is the very small size of embryos (80-100 μm), which generally requires researchers to learn appropriate handling techniques. Presently, the thawing and culturing of embryos are difficult even on the ground, especially if the experimentalist has not had much practice. In addition, this project will be performed under μG conditions, which makes it difficult to predict how to handle the embryos. Therefore, it is not realistic to expect untrained astronauts to do this directly. For this reason, we have started to develop a very simple thawing and culture system of mouse embryos using commercially available products. Using this system, astronauts will not need to handle the embryos, and will not need prior training. To overcome the impracticality of handling and culturing mammalian embryos, we planned a simple embryo thawing and culture system, which will allow the astronauts to perform this project smoothly.

研究分野：繁殖生物

キーワード：繁殖生物 生殖細胞 初期発生 発生工学 宇宙生物学

1. 研究開始当初の背景

哺乳類が宇宙で繁殖できるかどうかは人類の将来にとって重要な研究項目だが、マウスなど小型哺乳類の宇宙飼育装置は不完全であり、現状では生きた動物を利用した宇宙繁殖実験はほぼ不可能である。代わりに初期胚で宇宙実験を行う場合、今度は80 μ mの受精胚を自在に操作できる高度な技術が必要となり、とても宇宙飛行士に依頼することはできない。そこで、胚の操作に不慣れな宇宙飛行士でも確実に操作できる簡略化された胚の培養装置を開発し、将来的にそれを用いて宇宙ステーション内で実験を行うことにより、微小重力および宇宙放射線が胚の初期発生にどのような影響を与えるかを明らかにする。胚操作は地上でも初心者には難しいため、今回開発する装置は不妊治療などで胚を扱う産婦人科病院の胚培養師たちにも利用されるようになるだろう。

2. 研究の目的

今までに宇宙空間での受精及び発生に関する研究は魚類や両生類で盛んに行われ、それらの動物種は微小重力環境でも問題なく繁殖可能なことが確かめられている。一方は哺乳類の生殖に関する研究は、マウスやラットを長期飼育宇宙で飼育する装置が開発されていないため短期間の実験のみ行われてきた。その結果、妊娠後期から出産までと、育児においては、宇宙で数日間滞在しても影響を受けないことがわかったが、受精および胚の初期発生についての研究はすべて失敗している。その原因はマウスやラットは環境の変化に敏感であり、環境が変わるだけで性周期が狂い交尾をしなくなってしまうからである。実際にラットを宇宙へ打ち上げ繁殖を試みたロシアの実験(コスモス 1192、1979年)では、宇宙どころか地上のコントロール実験でも繁殖行動をせず失敗している。NASAは生きたマウスを運ぶことは諦め、マウス初期胚をスペースシャトルに乗せ宇宙で培養を試みたが(STS-80:1996)、胚は全く発生しなかったと学会で発表されている。結果が論文として発表されていないため詳細は不明だが、おそらく初期胚の培養技術を甘く見ていたのだと思われる。それ以降、リスクファクターの高すぎる哺乳類の繁殖実験は一切報告されていない。

申請者は哺乳類の宇宙繁殖に長年興味を持っており、2009年には疑似微小重力再現装置(3D-クリノスタット)を用いて、マウス初期胚が微小重力環境でも発生能することが可能かどうか調べてみた。その結果、驚いたことに疑似微小重力で培養した胚は发育速度が遅くなり、産仔の出産率は大きく低下してしまっ

調べた結果、微小重力環境下では将来胎児になる細胞(内部細胞塊)には影響がないが、胎盤になる細胞(栄養膜外胚葉)への分化が阻害されていることが明らかになった(Wakayama et al. 2009)。

魚類や両生類は宇宙で繁殖が可能なが、胎盤は哺乳類特有の臓器であり、もし胎盤が发育するためには重力が必須であるとしたら、哺乳類だけが宇宙で繁殖できないことになる。もし宇宙でもこの論文と同じ結果、すなわち哺乳類は宇宙で繁殖できないという結果が得られた場合、将来の宇宙開発に大きな影響を与えてしまう。そこで私は、本当の宇宙でも初期胚の発生が阻害されてしまうのか調べることを目標に、宇宙飛行士が確実に胚の解凍、洗浄および培養を行える装置の開発を行うことにした。

3. 研究の方法

初期胚は非常に小さいため、宇宙飛行士に限らず胚操作に不慣れなものが行えば解凍や洗浄の間に胚をすべてなくしてしまう。そこで研究代表者は宇宙ステーション内で宇宙飛行士が実験を行えるように、初期胚を直接扱う必要がなく、より簡便で再現性の高い全く新しい初期胚の培養方法および装置を開発することにした。

最初に、初期胚を紛失することなく溶液を入れ替え、交換できる方法を確立し、次にこの方法に最適な洗浄液や処理時間を確定する。そして胚の解凍後に、そのまま胚を培養しながら観察が可能な培養装置を開発する。最後に、遺伝子発現の解析を行うために胚の固定方法を確立することにした。

4. 研究成果

平成26年度

胚を直接扱わないで胚の融解、洗浄、培養を可能にする方法の開発を行った。

宇宙飛行士がマニュアルを読みながらゆっくり作業を行っても、確実に胚が生存し胚細胞まで发育可能な“受精胚凍結融解培養装置”を開発するためには2つの問題がある。

1つは胚の紛失であり、もう1つは溶液の毒性を避けるための厳密な処理時間である。

受精胚は約80 μ m

であり、微細なガラス管を用いた特殊なマウスピースで実験者が受精杯を直接移動させて溶液交換を行えば処理時間を厳密にコン



図1：今までに宇宙空間で実際に使用された細胞培養カセット CEU

トロールできるが、胚の扱いが難しいため十分練習した者でも紛失してしまうことがある。

JAXA が開発した細胞の宇宙培養装置(CEU) (図1)は、一方から新しい溶液を注入し反対側から廃液を排出して溶液を交換するようになっており、培養と観察が可能であるため、宇宙飛行士が宇宙で細胞の培養に成功している装置である。

しかし初期胚は培養細胞と違い、細胞数が少なく、円形をしており、さらに浮遊しているため、この容器では胚は廃液とともに一緒に流れ出てしまう。

そこで、研究代表は内部にメッシュフィルターを入れて壁を作り、胚の流出を防ぐ方式で実験を行ってみた。しかし、フィルターに胚がすべてくっつきその後の観察は出来なくなってしまう。

次に、我々は明治大学の長嶋教授らによって開発された、胚を液体の出入りは自由な中空系膜内へ入れて溶液交換をする方法を試みることにした

(図2)。中空系膜は溶液が内部へ浸透するた



図2：中空系内で胚盤胞にまで発生した受精胚

め胚を内部に閉じ込めたまま液交換が可能であり、しかも透明で観察ができる。この中空系膜に閉じ込めた状態なら長さが1mmを超えるため、CEUで迅速に溶液交換を行っても胚を紛失する可能性は非常に低くなる。この中空系を用い通常の受精胚凍結融解(ガラス化法)を行ったところ、胚の紛失はなく、発生にも影響はなかった。

そこで、中空系を用いた胚の融解を図1のデバイスを用い実験を行った。実験方法の模式図は図3のとおりである。

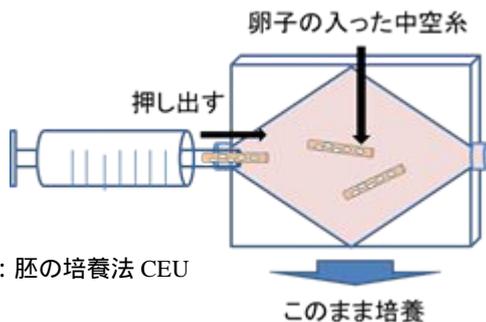


図3：胚の培養法 CEU

はじめに受精胚を中空系の中に入れ、中空系を注射機の中に培地とともに吸い込み、シリンジ(1.5ml)のなかでシリンジごと直接凍結させた。次に、解凍を行う際、図3のようにCEUデバイスの中に中空系に入った凍結胚を融解しながら押し出し、受精胚はき出した。融解後90秒以内に浸透圧の違う2段階目の融解液を素早く入れかえ、さらに

3回目の培養液に入れ替えた。その間、反対側の穴から注射針を差し込み吸引することで培地の吸引交換を行った。

結果として3個(n>100)の2細胞期の受精胚が胚盤胞期にまで発生したに過ぎず、解凍で80%以上が死に、さらに解凍できた胚もほとんどが発生を停止した。

コントロール実験としてCEU培養装置の中で受精胚を培養したところ、同じような結果(胚の発生停止)となり、デバイスの金属接合部分に毒性があることが明らかとなった。

平成27年度

平成27年度では凍結初期胚から胚盤胞へ発生可能なデバイスの開発を引きつづき行った。JAXAの協力のもと、千代田工業株式会社と共同で毒性のない安全なデバイスの開発を行った。

胚の凍結融解は中空系を用いた方法を採用し、デバイスの素材検討を行いシリコンまたは培養ディッシュなどに使用されるプラスチックを基礎素材として開発を行った。

開発したデバイスは図4となる。

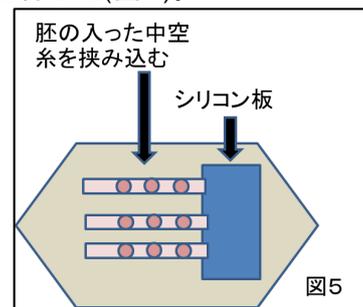


図4：今回新たに試作してもらったカセット。下部は顕微鏡観察可能なプラスチック素材、上部は表面に黒い両面テープでガス透過膜を張り付けた

平成26年度のデバイスと違い、金属を用いない設計となり、さらに宇宙ステーション内で顕微鏡観察をするために、倒立顕微鏡ステージに設置可能な大きさ、および対物レンズからの距離を邪魔しない薄いプラスチックが底面になるよう改良した。

また、宇宙ステーション内の顕微鏡のステージ位置は、地上から管制塔を介して制御するためタイムラグが生じる。そのため顕微鏡の視野から中空系が動かず観察できるように、デバイスの内部にシリコンフリップを設置し、受精胚の入った中空系を挟み込むことのできる設計を行った(図5)。

作成したデバイス内で受精胚の培養(容器毒性試験)を行ったところ、最終的にほとんど



の胚が胚盤胞にまで発生し、毒性はきわめて少ない素材を選ぶことができた。(表1)

表1 新しいデバイスに使われる素材の培養液への影響

培地中へデバイスの素材の浸出による毒性を見るために実験を行った。
チューブおよびシリコンを3時間および24時間浸したCZB培地で受精胚(灌流)を培養。

条件(CZB培地に浸した)	2cell	1cell	2cell	4-8cell	mol	Bla	ExpB	ET	Pups	%(Pup/ET)
コントロール	11	1	0	0	0	10		10	8	80
チューブ3時間	14	0	0	0	1	13		13	0	0
	12	0	0	1	1	10		11	6	54
シリコン3時間	14	0	0	0	2	12		14	0	0
	12	0	0	2	2	8		10	5	50
チューブ24時間	26	0	0	0	6	12	8	20	12	60
	30	0	0	0	1	19	10	20	10	50
シリコン24時間	21	0	1	0	7	8	6	20	4	20
	30	0	0	0	5	17	8	20	11	55

H28年度

これまで確立した各工程を合わせて、凍結した初期胚を胚盤胞まで発生させることが可能なデバイスを開発することを目標に実験を行った。同時に、宇宙での利用を想定し、水漏れや不測の事態があっても問題のないデバイスの開発を試みる実験を継続して行った。

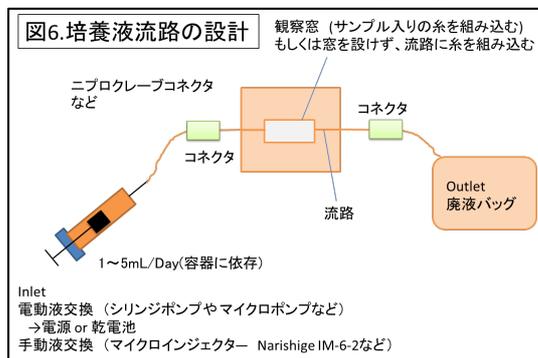
前年度では胚の発生は可能であったが、仕様が変わり、胚の入った中空系チューブをシリコンフリップに挟み込む形となった。そのためあらかじめ凍結胚を入れ容器ごと凍結した注射器で胚をデバイス内に送り込むことで解凍する方式はとれなくなった。

つまり開発したデバイスごとはじめから受精胚の凍結融解を行う必要があり、デバイスの耐性実験が必要となった。

デバイス自体が胚凍結の際の超低温(液体窒素)から、胚培養の温度37度までの温度変化に耐えなければならない。

そこで、今までに行ってきた受精胚凍結のガラス化法で、開発したデバイスごと凍結を行った。しかし、残念なことにガス透過膜フィルムの接着面が温度変化に耐えられず、凍結の第一段階である液体窒素に入れた瞬間に剥離してしまった。

また、同時進行でデバイス内の液交換を自動で行う装置の開発を千代田と行った。(現在進行中)さらに、高砂とも同様に同じようにデバイスの開発を行っている(図6)。



さらに平成28年度では、新たな胚凍結方法の開発も行った。実際の宇宙では、地上で凍結したマウス胚を、-95以上の比較的高い

温度でISSへ打ち上げ、同温度で数か月間ISSに保存後、実験が行われる。そのためこの温度帯でも生存可能なマウス胚の凍結方法の開発が必要とされている。

そこで-95以上の温度で胚を長期間凍結保存できる方法の検討を行った。同時に、胚操作に不慣れな宇宙飛行士が実施することを想定して、解凍処理に手間取っても胚が死滅しない方法の開発実験も行った。具体的には、様々な凍結保護剤(エチレングリコールやDMSOなど)を様々な割合で混合し、マウス2細胞期胚をプログラムフリーザーでゆっくり凍結する。そして融解後の生存性を指標に、最適な凍結保護剤の組成の検討を行った。また通常この解凍作業は、凍結保護剤の細胞毒性を減らすために1-2分以内に培地交換を終了しなければならないが、操作に手間取ると胚が生き残れる、細胞毒性の少ない凍結保護剤の開発も同時に試みた(組成は現在進行中の実験のため非公認)。

現在のところマイナス85度の低温フリーザー内で、改良緩慢凍結した胚が5日までなら解凍後生存が50%以上を保つことができたが、一週間以上比較的高温な凍結状態での胚凍結の成功には至っていない。

以上のように、本基盤C施行期間内では宇宙にまで持って行けるデバイスの開発に成功したとまではいけなかったが、ある程度道筋を立てるところまでは終了したといえる。グラント終了後も引き続き開発をおこなう予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jun 6;114(23):5988-5993.

doi:10.1073/pnas.1701425114. Epub 2017 May 22.

Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months.

Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T.

2. Stem Cells. 2017 May;35(5):1189-1196.

doi: 10.1002/stem.2601. Epub 2017 Mar 27.

The Number of Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells and Nuclear Transfer Embryonic Stem Cells Depends on the Method and Somatic Cell Type Used

for Their Generation.

Araki R, Mizutani E, Hoki Y, Sunayama M, Wakayama S, Nagatomo H, Kasama Y, Nakamura M, Wakayama T, Abe M.

3. Cell Reprogram. 2016 Nov;18(6):382-389. Epub 2016 Sep 13.

doi: 10.1089/cell.2016.0026

Effect of Long-Term Exposure of Donor Nuclei to the Oocyte Cytoplasm on Production of Cloned Mice Using Serial Nuclear Transfer.

Wakayama S, Tanabe Y, Nagatomo H, Mizutani E, Kishigami S, Wakayama T.

4. Biol Reprod. 2016 Jun;94(6):128.

doi: 10.1095/biolreprod.116.138677. Epub 2016 Apr 20.

DNA Methylation Errors in Cloned Mouse Sperm by Germ Line Barrier Evasion.

Koike T, Wakai T, Jincho Y, Sakashita A, Kobayashi H, Mizutani E, Wakayama S, Miura F, Ito T, Kono T.

5. Sci Rep. 2016 Apr 1;6:23808.

doi: 10.1038/srep23808.

Generation of cloned mice and nuclear transfer embryonic stem cell lines from urine-derived cells.

Mizutani E, Torikai K, Wakayama S, Nagatomo H, Ohinata Y, Kishigami S, Wakayama T.

6. PLoS One. 2015 Sep 22;10(9):e0138854.

doi:10.1371/journal.pone.0138854.

eCollection 2015.

A Simple Method for Transportation of Mouse Embryos Using Microtubes and a Warm Box.

Tokoro M, Fukunaga N, Yamanaka K, Itoi F, Terashita Y, Kamada Y, Wakayama S, Asada Y, Wakayama T.

〔学会発表〕(計2件)

第108回 日本繁殖生物学会
宮崎県宮崎市 宮崎市民センター
2015年9月15日 公開市民講座
招待講演 「宇宙に飛び立ったマウス精子」
若山 清香

2016年10月15日
日本宇宙生物科学会第30回大会
愛知県名古屋市 愛知医科大学

「国際宇宙ステーションで長期保存したマウス精子からの産仔作出 (Space Pup)」
ポスター
若山清香、鎌田裕子、山中香織、鈴木ひろみ、嶋津徹、笠原春夫、長田郁子、水谷英二、矢野幸子、若山照彦

〔図書〕(計1件)

Methods Mol Biol. 2015;1222:101-11.

doi: 10.1007/978-1-4939-1594-1_8.

Treatment of donor cell/embryo with different approaches to improve development after nuclear transfer.

Mizutani E1, Wakayama S, Wakayama T.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yamanashi.ac.jp/1004>

6. 研究組織

(1)研究代表者

若山 清香 (WAKAYAMA Sayaka)

山梨大学 総合研究部・特任助教

研究者番号：10525918