

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14613

研究課題名(和文) アミノ酸代謝に着目したラット着床前胚の新たな体外培養法の開発

研究課題名(英文) Development of a new culture method for rat pre-implantation embryos relative to amino acid metabolism

研究代表者

中村 和臣 (NAKAMURA, Kazuomi)

鳥取大学・医学部・特命助教

研究者番号：90598137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物のラットの受精卵(着床前胚)は、体外に取り出して培養を行うと、その後、仮親の子宮に戻した際の出生効率が著しく低下する。そこで、アミノ酸代謝をはじめとして、胚の内部で起こる様々な代謝の異常に着目し、その出生率低下の要因を探った。本研究課題で、ラット体外培養胚は、体内発生胚と比較してDNA損傷や酸化ストレスに違いがあることがわかった。さらに、体外培養したラット着床前胚の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、アミノ酸代謝、糖代謝、アポトーシス等に関連する遺伝子発現に違いがあることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた成果は、ラットの着床前胚の体外培養における基礎的な知見の蓄積という学術的意義に加え、培養液中のアミノ酸組成の最適化、エネルギー源供給のタイミング最適化などにより、その正常発生能力を阻害することなく体外で培養できる新たな胚培養技術の発展に繋がる。疾患モデル実験動物としてのラットの重要性は高い。本研究の成果により、医学研究のためのラットの利用の発展に繋がれば、新薬開発などに多大に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Culturing of pre-implantation embryos from rats, a common laboratory animal, impedes full-term development of the embryos in utero. In the present study, evaluating oxidative stress and DNA damage, and comprehensive gene expression analysis were conducted to investigate the causes of this impediment by comparing embryos that were cultured both in vivo and in vitro. DNA from the rat embryos cultured in vitro was more damaged than that of the embryos cultured in vivo. Oxidative stress in vitro was different from that in vivo. The differentially expressed genes (e.g., those associated with amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, and apoptosis) were observed in vivo and in vitro.

研究分野：発生工学

キーワード：着床前胚 ラット 体外培養 網羅的遺伝子発現 酸化ストレス DNA損傷

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム編集技術の発展によって、遺伝子改変動物の作製が容易になり、実験動物のラットにおける遺伝子改変も身近なものになりつつある。ラットは、医学・生命科学研究において長年広く用いられ、知見の蓄積が豊富である。この豊富な知見の蓄積と相まって、遺伝子改変ラットの有用性は高い。一方で、遺伝子改変動物の作製には、受精卵(着床前胚)を体外へ取り出す必要がある。いわゆる「体外培養」が必要となる。しかし、ラットにおいては、着床前胚の体外培養が難しい。長年ラットの着床前胚の培養に用いられてきた培養液(培地)は、実質的に mR1ECM(Miyoshi *et al.*1995)の1種類であった。この培地は、ラットの着床前胚を 1cell から胚盤胞まで培養が可能な培地であるが、この培地で胚を体外培養した後、仮親の子宮に移植しても、その出生率は低い。これまでの研究代表者の研究から、マウス着床前胚の汎用培地である KSOM 培地を改良し、体外発生率が比較的良好な新たなラット着床前胚の培養法を開発した。ただし、その出生率はやはり低く、課題を残している。

### 2. 研究の目的

本研究では、アミノ酸代謝、エネルギー代謝、酸化ストレスに着目し、ラット体外培養胚の体外発生や着床後の発生を抑制している要因とメカニズムを解明することを目的とする。これを解明することにより、ラット着床前胚を体外培養した際、その体外発生や出生率が抑制されることのない新たな体外培養法開発の糸口とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 体外培養胚における DNA 損傷の解析

ラットを交配させ、着床前胚(1細胞期)を採取した。得られた胚をアミノ酸濃度の異なる KSOM-R 培地(Nakamura K *et al.* 2016)にて 96 時間培養(37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 水蒸気飽和)し、胚盤胞期まで培養した。比較対照として、ラットを交配させて 96 時間後に胚盤胞期胚を採取した。これらの胚を comet assay に供し、DNA 損傷を観察した。

#### (2) 体外培養胚におけるエネルギー代謝および活性酸素産生の解析

ラットを交配させ、着床前胚(1細胞期)を採取した。得られた胚をアミノ酸濃度の異なる KSOM-R 培地にて 96 時間培養(37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 水蒸気飽和)し、胚盤胞期まで培養した。比較対照として、ラットを交配させて 96 時間後に胚盤胞期胚を採取した。これらの検体について、次の実験を行った。①胚内部(核)の ROS(活性酸素種)を ROS 検出プローブ(DHE)で染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。②ミトコンドリア特異的に ROS を検出するプローブ(Cell Meter)で胚を染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。

#### (3) 体外培養胚におけるアミノ酸代謝の解析

ラットを交配させ、着床前胚(1細胞期)を採取した。得られた胚を KSOM-R 培地にて 96 時間培養(37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 水蒸気飽和)し、胚盤胞期まで培養した。胚を培養した培地を回収し、高速液体クロマトグラフィーにより、培地中のアミノ酸濃度を測定した。

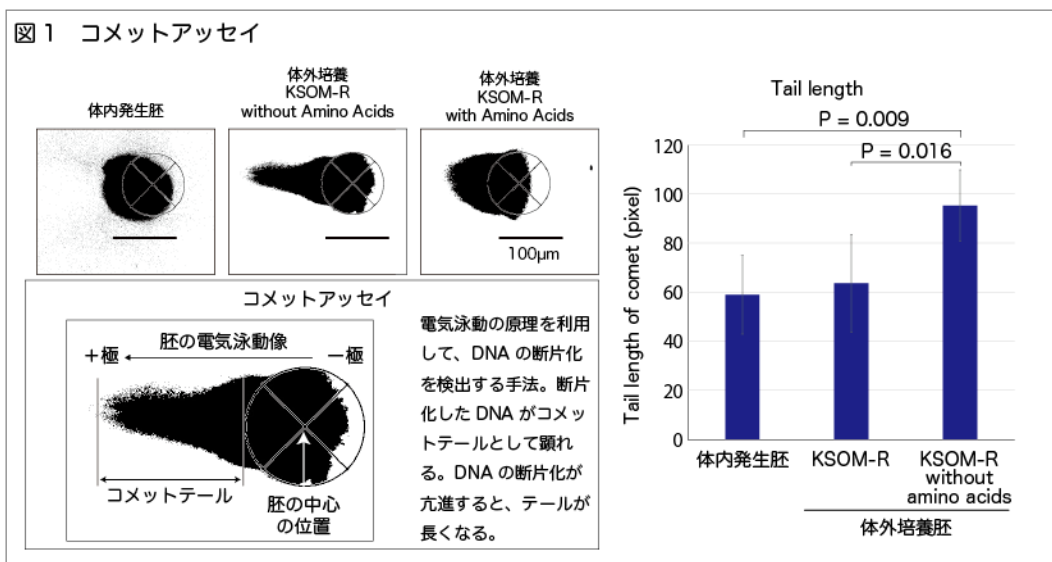
#### (4) 体外培養胚における遺伝子発現解析

ラットを交配させ、着床前胚(1細胞期)を採取した。得られた胚を KSOM-R 培地にて 96 時間培養(37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 水蒸気飽和)し、胚盤胞期まで培養した。比較対照として、ラットを交配させて 96 時間後に胚盤胞期胚を採取した。これらの胚の遺伝子発現を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 体外培養胚における DNA 損傷

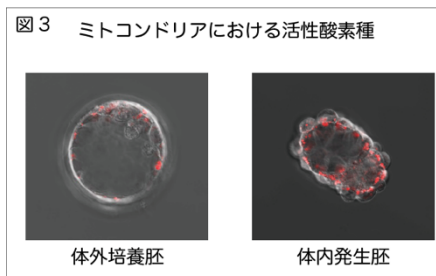
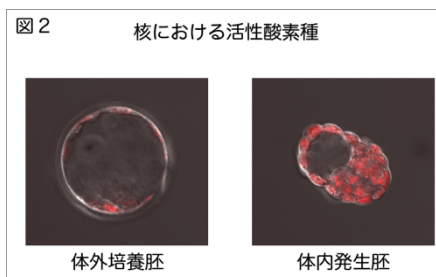
ラットの体外培養胚においては、DNA の断片化が亢進していることがわかった(図 1)。このことは、ラットの体外培養胚の着床後の発生を阻害している要因の一つではないかと考えられる。さらに、培地に加えるアミノ酸によって、その DNA の断片化が抑制されることがわかった(図 1)。このアミノ酸による DNA 断片化の軽減効果のメカニズムについて詳細は不明であるが、着床後の発生率を改善する方法として、



培地中のアミノ酸組成の改変が有効である可能性がある。なお、この成果は、第 66 回日本実験動物学会、および日本実験動物技術者協会関東支部 REG 部会第 20 回特別講演会（招待講演）にて発表した。

## (2) 体外培養胚におけるエネルギー代謝および活性酸素産生

①胚内部(核)を ROS 検出プローブで蛍光染色し、ラット着床前胚における ROS を検出することに成功した(図 2)。その蛍光強度を数値化して比較すると、核内の ROS は、アミノ酸の添加によって変化することがわかった。②次に、ミトコンドリア特異的に ROS を検出するプローブで胚を蛍光染色し、ラット着床前胚のミトコンドリアにおける ROS を検出することに成功した(図 3)。蛍光強度を数値化して体内発生胚と体外培養胚を比較すると、両者に有意な差があった。ミトコンドリアの ROS の増減は、ミトコンドリアの活性と捉えることもできる。したがって、体内発生胚と体外培養胚において、ミトコンドリアのエネルギー産生に何らかの違いがある可能性があることが示唆される。この成果の一部は、日本実験動物技術者協会関東支部 REG 部会第 20 回特別講演会にて発表した。



## (3) 体外培養胚におけるアミノ酸代謝

ラット着床前胚の体外培養に使用した培地中のアミノ酸濃度は、20 種類中 17 種で、使用前と比較して減少していた。一方で、3 種類(トリプトファン、ヒスチジン、プロリン)は増加していた。この結果は、培地開発において胚のアミノ酸要求性の評価に有用である。ただし、検体が微量であるということもあり、検体間のばらつきが大きい。本実験では 30 個の胚をプールして培養して得られた検体であったため、供試胚の数を増やす等の検討が必要である。

## (4) 体外培養胚における遺伝子発現解析

ラット着床前胚における遺伝子発現を次世代シーケンサーにて網羅的に探索することに成功した。その結果、体外培養胚と体内発生胚においては、遺伝子発現に大きな差がみられ(図 4-1, 4-2)、統計的に有意な差がみられた遺伝子は約 3,900 であった。さらに Gene ontology 解析、およびパスウェイ解析の結果、アミノ酸代謝やエネルギー代謝、アポトーシスに関連する遺伝子群に有意な差がみられた。これらの遺伝子解析結果は、前述の ROS 解析の結果や DNA 損傷解析の結果に矛盾がなく、関連が示唆される。今後は、これらの関連性について深く掘り下げたい。なお、これらの成果は、論文投稿準備中である。

図 4-1 階層クラスタリング

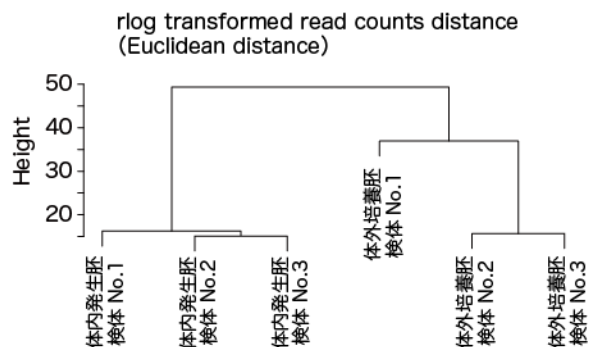
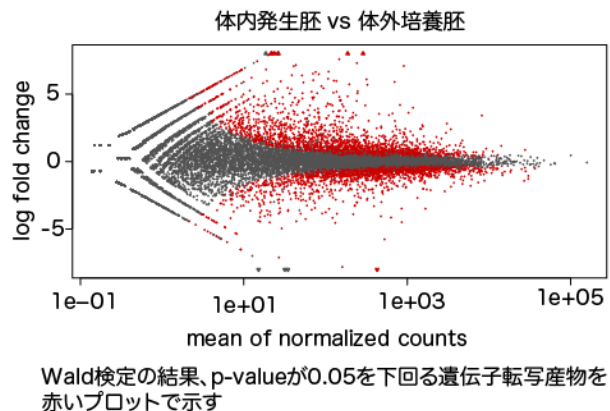


図4-2 MAplot



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村和臣, 妹尾美砂子, 小泉藍, 森本佳世子, 大林徹也
2. 発表標題 体外培養したラット受精卵のDNA損傷
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 中村和臣
2. 発表標題 ラット着床前胚の新たな体外培養法
3. 学会等名 日本実験動物技術者協会関東支部REG部会第20回特別講演会（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----