

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22372

研究課題名(和文) 基質の性状とそれに制御されるmiRNAを用いた統合的な卵子胚培養システムの開発

研究課題名(英文) Development of polysaccharide gel culture system of in vitro embryo culture system.

研究代表者

岩田 尚孝 (Iwata, Hisataka)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：50385499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キサンタンガムとトーキャストビーンガムで作成した多糖ゲル上で、卵子の体外発育、体外成熟そして初期胚の培養を行い、プラスチック上の物と比較した。プラスチック上に比べて多糖ゲル上では卵子の体外発育、体外成熟および胚の体外発育胚全てが、プラスチック上に比べて改善された。ゲル上で発育した卵子や胚では、アクチンの重合が促進していた。顆粒層細胞を用いたRNAseqでは発現変動遺伝子がアクチン骨格制御やHippo signalingに関連付けられた。ゲル上の培養によって発現亢進するmiRNAが確認された。多糖ゲルは細胞骨格に働きかけ、卵子や胚の発育に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵子や胚の発育にはシャーレ上のドロップが用いられる。プラスチックの特性が細胞の形態や分化に影響することが明らかにされつつあるが、本研究では卵子も胚も多糖ゲルで作成した基質の特性に反応して、その発育率や質を大きく改善することが明らかになった。多糖ゲル上では細胞内のmiRNAのプロファイルも大きく変化することが明らかになった。現行の培養環境は、基質性状から改善の余地が大きいことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The present study examined the effect of soft polysaccharides gel made of Xanthan gum (XG) and locust bean gum (LBG) on development of bovine oocytes and embryos.

Oocytes-granulosa cells complexes (OGCs) derived from early antral follicles, oocytes derived from antral follicles and early developmental stage embryos were cultured on the XG-LBG gel. Using the XG-LBG gel as a culture substrate for in vitro oocyte growth, in vitro oocyte maturation, and in vitro development of embryos improved their developmental ability compared with those plastic plate-counterparts. RNA-Seq of the granulosa cells of OGCs showed that the differential expressed genes were associated with focal adhesion, phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt and Hippo signaling, and regulation of actin cytoskeleton. Oocytes and embryos developed on the XG-LBG gel had higher expression levels of F-actin compared with those developed on the plate. LBG-XG gel is useful substrate for in vitro development of oocytes and embryos.

研究分野：胚発生

キーワード：多糖ゲル 培養基質 体外受精 体外発育卵子 アクチン重合 胚盤胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚や卵子の培養はプラスチックシャーレ上で行われる。一方で体内環境では卵子は卵胞液や顆粒層細胞の上、胚は卵管上皮の粘液上で発育する。この基質の持つ特性は、現在の体外培養条件には考慮されていない。体外で発育した卵子や胚の質は体内のそれに比べ低い。そこで、体外の培養条件で欠けている因子を探索し補う必要がある。キサンタンガムやローカスとビーンガムは植物や発酵糖由来の増粘剤であり、食べ物にも用いられている安全な多糖である。この多糖ゲルを用いることで生体内に近い培養環境を構築することが可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

キサンタンガムとローカストビーンガムで作成した多糖ゲルがウシ胚や卵子の体外発育に及ぼす効果について検討する。体外発育した卵子や胚を用いて細胞骨格やそのシグナル関連タンパクの発現を比較する。体外発育卵子とその顆粒層細胞に着目し、変化の分子背景を RNA-Seq で比較する。またゲル上で培養した顆粒層細胞の miRNA のプロファイル変化を small RNA-Seq で比べる。

3. 研究の方法

キサンタンガムとローカストビーンガム(株式会社 三晶提供)で1%ゲルを作成する。ウシの卵巣から初期胞状卵胞(直径 0.5-0.7mm)に由来する卵子顆粒層細胞複合体(OGCs)と卵子を回収する。OGCs は体外でゲルもしくはプラスチックシャーレ上で16日間培養し体外発育した卵子を検討する。直径3-6mmの卵胞から回収した卵子はゲルもしくはプラスチックシャーレ上で体外成熟してその後の受精及び発育を検討する。また卵子を常法で体外成熟、体外受精後に初期胚(8細胞期胚)を得てこれをゲルもしくはプラスチック上で培養する。体外発育した卵子、体外成熟した卵子または発生した胚盤胞期胚はそれぞれ細胞骨格や接着関連のタンパク発現を検討する。16日培養したOGCsの顆粒層細胞を用いてRNA-seqとSmall RNA-Seqを行い、さらに使用した培地と卵胞液中のsmall RNA-Seqを行う。

4. 研究成果

ゲル上で体外発育した卵子では卵子の直径とその後の受精率やヒストンのアセチル化状態(H4K12)を向上させた。体外成熟を行った卵子は受精後から胚盤胞期までの発生率が有意に高かった。初期胚からの培養では胚盤胞期胚までの発生率を有意に改善した。体外成熟卵子や胚の重合アクチンを比べるとゲル上で有意に発現量が多くなっていた。胚ではカドヘリンの細胞膜直下の局在やYAPの核内以降が観察された。RNA-Seqではゲル上とプラスチックプレート上の間の発現変動遺伝子はFocal adhesion, phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt, Hippo signaling, そしてregulation of actin cytoskeletonに関連付けられた。OGCsの培地中にはmiRNAが多く観察され、顆粒層細胞が培養環境にmiRNAを分泌していることが推測された。ゲル上で培養した顆粒層細胞にはLet7, miR-25, miR-125a, およびmiR-92などの発現亢進が観察されこれらのmiRNAは卵胞液中にも高濃度で観察された。変動したmiRNAがターゲットにしている遺伝子は、actin cytoskeleton, Hippo signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathwayに関連付けられ遺伝子発現変動にリンクして変動していることが推測された。多糖ゲルで作成した培養基質は卵子においても胚の培養においても発育に有効であることが明らかにな

った。またゲル上での培養は細胞中での miRNA のプロファイルを変化させることが明らかになり、卵子の発育環境にあわせて miRNA プロファイルが変化すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hara S, Aoki S, Nagata M, Shirasuna K, Noguchi T, Iwata H.	4. 巻 55
2. 論文標題 Xanthan gum and locust bean gum substrate improves bovine embryo development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Domest Anim.	6. 最初と最後の頁 1124-1131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/rda.13750.	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 該当する

1. 著者名 Yasuhisa Munakata, Ayaka Sugimoto, Koumei Shirasuna, Takehito Kuwayama, Hisataka Iwata	4. 巻 65
2. 論文標題 Xanthan Gum and Locust Bean Gum Gel Supports in Vitro Development of Porcine Oocytes Derived From Early Antral Follicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 551-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-074.	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 該当する

1. 著者名 Sugimoto A, Inoue Y, Tanaka K, Sinozawa A, Shirasuna K, Iwata H.	4. 巻 88
2. 論文標題 Effects of a gel culture system made of polysaccharides (xanthan gum and locust bean gum) on in vitro bovine oocyte development and gene expression of the granulosa cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 516-524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23518.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田美樹, 岩田尚孝
2. 発表標題 キサントタンガムを基質に用いたウシ体外受精胚の培養
3. 学会等名 第64回 日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本 彩嘉, 岩田 尚孝
2. 発表標題 キサントタンガムを基質に用いたブタ未熟卵子の体外発育
3. 学会等名 第64回 日本生殖医学会学術講演会
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

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