

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22680036

研究課題名(和文)生殖細胞の機械的刺激応答機構および胚発育に及ぼす効果に関する研究

研究課題名(英文) Studies on mechanosensing mechanisms in reproductive cells and embryonic developments applied with mechanical stimuli

研究代表者

松浦 宏治 (Koji, Matsuura)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：70443223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,500,000円、(間接経費) 4,950,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類精子および受精卵の機械的刺激感知機構、細胞分裂阻害・促進機構を解明するために、卵管内の機械的刺激を制御可能なマイクロ流体デバイスを作製し、流路内生殖細胞の顕微観察を行った。ヒト精子においては固定された精子頭部の細胞内カルシウム濃度上昇が見られた。また、精子の運動方向はせん断応力分布に影響を受けることが判明した。マウス受精卵については胚発育におけるせん断応力に対する閾値の存在を見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate sensing mechanisms to mechanical stimuli in mammalian sperm and embryo, our group developed microfluidic devices to mimic mechanical stimuli in the oviduct and exhibited microscopic observation of human sperm and mouse embryos which were mechanically stimulated. Intracellular calcium concentration in the fixed sperm head increased after applying fluid shear stress of 10 dyn/cm². Furthermore, direction of the motile sperms is strongly affected by the shear stress distribution in the microfluids. We have found thresholds toward detrimental shear stress to mouse embryo for pre-implantation embryonic development.

研究分野：生殖医工学

科研費の分科・細目：2301A 生体医工学

キーワード：精子 受精卵 メカニカルストレス 細胞内カルシウム濃度 マイクロ流路 共焦点蛍光顕微鏡

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精子・卵子は卵管の蠕動による機械的刺激に常にさらされている。特に卵管狭部の内径は 0.1 mm 程度であり、受精卵とほぼ同じである。また、蠕動運動に伴う卵管液移動によるシェアストレス(SS)も精子選別と受精卵発育に関わっている可能性がある。その機械的刺激(MS)感知機構、細胞内シグナル伝達機構、細胞分裂阻害・促進機構を解明するために、卵管内の機械的刺激および化学物質刺激を定量的に制御できる(マイクロ)デバイスを作製し、その機構について細胞内分子レベルでの理解を試みる。

(1) **精子を用いた研究**: 卵管内精子移動に際し SS が重要であることを機械受容チャネルなどが関わる細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化および精子運動性変化で示すことを目標とする。

(2) **マウス受精卵を用いた研究**: 受精卵培養においては、シェアストレス(SS)負荷群ではアポトーシスの割合が低下していると推測され、機械的刺激負荷時における(体外)胚発育機構を解明する。SS を含む MS 負荷培養可能なシステムを構築し、その胚発育成績による有効性検証およびシグナル伝達機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

(1) 精子の機械的刺激感知機構およびその生殖生理的意義について研究する。この目的のため 2 つのアプローチで研究を進めた。精子をマイクロ流路内に固定して流体速度を変化させて SS を負荷した際の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を計測可能な実験系を構築した。また、阻害剤によって機械受容チャネルの活性を変化させた際の流体中精子の運動性を評価した。精子が卵管内を遡上するためには、温度、化学走査性以外の因子があると考えられる。マ

イクロ流路内の運動精子は流れに遡上する現象が時々観察される。その現象がどのような場合に起こるのか、断面構造の異なる種々のマイクロ流路(流路 A: 幅 3mm×高さ 3mm、流路 B: 幅 0.17mm×高さ 3mm)を作製して評価した。また、 のアプローチで進めているような細胞内シグナリングの影響があるか否かについても議論する。

(2) 受精卵の機械的刺激によるアポトーシス抑制機構、受精卵内の機械的刺激受容メカニズム解明を目指す。また、SS だけではなく、圧縮などの他の機械的刺激が負荷された際の胚培養成績よりその胚発育機構について議論する。最終的には、機械受容とその細胞発育・発育阻害についてシステムとしての理解を目指す。

上記目的に対して、各種培養システムを用いて研究を進めた。この研究を開始するまでには、Tilting Embryo Culture System (TECS) を用いた場合、2 細胞期で融解したマウス受精卵の胚盤胞到達率が有意に上昇したことを報告した。我々は受精卵発育を阻害する SS 値があると仮定し、 Mechanical Vibration System (MVS) を用いた際の胚移動と発育について同じ融解したマウス受精卵を用いて評価した。次に、受精卵を固定した際の $[Ca^{2+}]_i$ を計測するために、 Fluid Shear Applying Embryo Culture System (FSAECS)を自作し、オーダーの異なる FSS を負荷した際のマウス受精卵の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を計測した。SS 以外の MS を負荷でき、かつ $[Ca^{2+}]_i$ 変化計測が可能な培養系 Pneumatic Actuation Embryo Culture System (PAECS)を構築した。本研究全体の概念図を図 1 に示す。

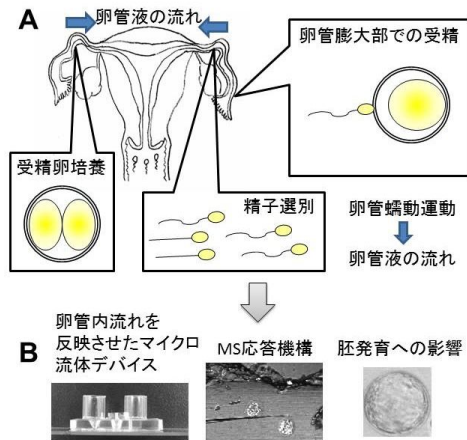


図1：本研究内容の概要 A: 卵管内の生殖細胞 B: 本研究の手法

3. 研究の方法

(1) 底面がガラスであり、Poly(dimethylsiloxane) (PDMS)製のマイクロ流路の底面にヒト精子(ボランティアより提供)を poly-L-lysine を底面に塗布して固定し、 $[Ca^{2+}]_i$ 指示薬である Fluo-4 AM を添加してヒト精子を染色し精子運動と蛍光強度を同時に、共焦点蛍光顕微鏡を用いて評価した。また、 Ca^{2+} イオンチャネル阻害剤等添加の影響は運動精子を固定しないで評価した。

正方形断面を持つ流路Aと長方形断面を持つ流路Bを用いて、流体方向と精子頭部方向のなす角度から遡上運動精子の評価を行った。流路Aでは中央と下から1/4の位置で顕微観察を行った。流路Aでは正立明視野顕微鏡を、流路Bでは倒立共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、流路B内精子の観察位置は底面から約0.1 mm程度の場所であった。それらの位置におけるチャンネル幅方向の最大SSはそれぞれ、0.003 (流路A中央)、0.05 (流路A壁側から1/4)、0.8 (流路B) dyn/mm^2 であった。(1)について用いた実験系を図2に示す。

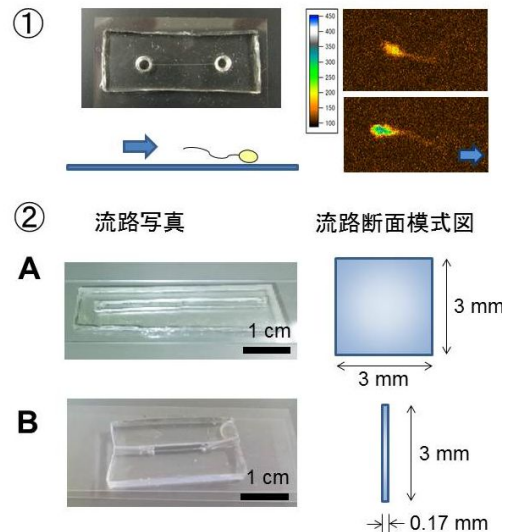


図2：精子運動に関する研究で用いた実験系

(2) 2種類の超音波照射条件が異なるMVS-1とMVS-2を用いて受精卵移動観察と受精卵培養を行った(図3参照)。MVS動作条件は、MVS-1では、周波数 74 Hz 振動時間 5 秒間 振動間隔15 分、MVS-2は、周波数 31Hz 振動時間 5 秒間 振動間隔60 分であった。受精卵移動観察から胚移動速度とSSを概算した。融解したマウス受精卵を2群に分けて、胚盤胞までの胚培養成績を比較した。

顕微授精用市販の保持ピペットをPDMS流路内に組み込んで、胚を流路内に固定可能なマイクロ流体システムFSAECSを作製した(図3)。その保持ピペット内を陰圧にすることにより流路内に桑実胚または胚盤胞を固定した。流路入口にシリンジポンプを接続し培地流量 20、200 $\mu\text{L}/\text{min}$ の定常流によるSS(それぞれ 13.3, 133.3 dyn/mm^2)を負荷した。マウス受精卵(桑実胚・胚盤胞)内の $[Ca^{2+}]_i$ 変化は共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察し、各画像の時間分解能は14秒で撮影した。

卵管蠕動の受精卵培養における生理的な役割を理解することを目的として、この蠕動を

模したマイクロ流体システムを構築した。底面にガラスを貼ったPDMS製のマイクロ流路を作製した。電動アクチュエータに接続したシリンジを移動させ、その空気圧変化により厚さ0.1 mmのPDMS膜を上下させることによって、マイクロ流路内に流れを発生させた。流路内流速および受精卵に負荷されるせん断応力を変化可能なシステムである。このシステムを用いた受精卵培養については二細胞期で凍結された受精卵を融解して、胚盤胞まで培養した。また、 $[Ca^{2+}]_i$ の計測には、Fluo-4 AMを融解したマウス胚盤胞に添加し、マイクロ流路内に導入した。流路内で「圧縮」に伴うMSを負荷した状態の胚盤胞について共焦点蛍光顕微鏡観察を行った。用いたこれらの受精卵システム(2)の概要を図3に示す。

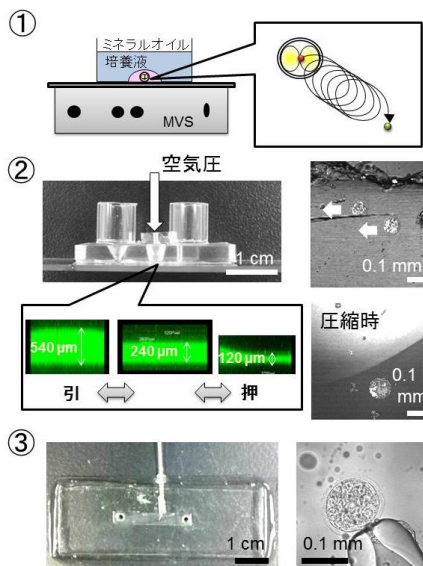


図3：受精卵培養システム

4. 研究成果

(1) 流速変化が無い場合は、頭部の $[Ca^{2+}]_i$ の変化は見られなかったが、頭部振幅が大きい時は $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。また、精子を固定して流速を変化させた場合、静止流体中では鞭毛のみが動く状態あったが、流体の流速が1 mm/s ($SS = 1000 \text{ dyn/mm}^2$)の場合は、精子頭部が上流を向き鞭毛振動が激しくなる現象が観

察された。また、流速の上昇に伴わずかな $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観測された。その際、頭部振幅、鞭毛振動速度、鞭毛移動距離が上昇した。精子近傍の流速が著しく大きくなった際に精子頭部が伸展され Ca^{2+} イオンがそのシグナルになっていると推測される。

阻害剤を添加した際の変化観察については、ベパラミル等、膜電位依存性 Ca^{2+} イオンチャネル阻害剤を添加しても変化は無かった。また、メカノセンサー阻害剤であるルテニウムレッドや $GdCl_3$ を培養液内に添加した際の変化も観察されなかった。実験系の再構築が必要と思われる。

流路Aを用いた際には遡上する精子割合は有意に上昇しなかったが、流路Bを用いた場合には有意に上昇した。これは、全長50 μm の運動精子に流体から負荷されるSSが精子の位置によって違いがあり、その影響が流路AとBを用いた際の結果の違いに反映されたものと考えられる。

まとめ(1)：固定された精子と運動精子に負荷されるSS値が著しく異なるために、固定された精子における細胞内シグナリングが働く。一方、流路内の運動精子に負荷されるSS値は固定された際の値と比較して1/1000以下と小さいために、細胞内のSS応答に関する分子メカニズムは働かないものと想定される。精子の遡上性においては、流体内のSSによって精子運動が摂動を受けて、精子内にSSに由来する回転モーメントが働くことが大事ではないかと考えている。しかし、運動精子は卵管内の繊毛に吸着することが知られており、蠕動運動に伴い、卵管内の流速が著しく上昇することも想定され、その際には精子運動が加速する可能性がある。

(2) MVSを使用した際の受精卵移動速度およびSSは MVS-1: 11.4 mm/min, 5.7 dyn/mm²、MVS-2: 174.1 mm/min, 87.1 dyn/mm²と計算された。MVS-2を使用した区において、培養2日目の胚発育は有意に低下した。一方、培養3日目の胚では両装置の胚盤胞到達率や胚盤胞内細胞数間に有意差は無かった。ブタ・ヒト受精卵を用いた際には、MVSを用いた際には有意に胚盤胞到達率は上昇した。この相違はマウス胚では透明帯の厚みがブタ・ヒト胚より薄いため物理・化学的刺激に対しより感受性が高いためと考えられる。これらの結果より、良好胚盤胞を得るためには、各生物種に応じた胚発育段階への適度なMS負荷環境が求められる。

FSAECS を用いたSS負荷時の胚体積変化は桑実胚と胚盤胞で共に認められたが、桑実胚は特に細胞が透明体に圧縮されるような状態にまで細胞体積が増加した。SS負荷時において、桑実胚では蛍光強度が上昇した細胞と体積増加に伴う蛍光強度が低下した細胞が観察された。桑実胚の体積変化はアポトーシスを誘発する原因の一つと推察される。一方、胚盤胞では全体的に若干の[Ca²⁺]_i上昇が観察された。この実験結果は以下の実験でも観察された。この上昇が次の分子イベントのトリガーになっている可能性がある。

凍結二細胞期から胚盤胞へ発育した受精卵の割合を、当システムを駆動して流路内の培地を動かした際(dynamic)と静置培養時(static)とで比較した。マウス受精卵の最大移動速度が0.2 mm/sとなる条件において、胚盤胞到達率は駆動した培養区で有意に上昇した(dynamic, 74% (n = 126); static, 62% (n = 118); P < 0.05)。この結果から、卵管蠕動には受精卵発育を促進させる効果があると考えられる。

アクチュエータ駆動時の[Ca²⁺]_i変化とその受精卵形状の変化について評価が可能であった。「圧縮」時の歪は約20%程度であり、応力—歪関係は25%程度までは線形に近似できることから、圧縮に伴う力は0.5-2.0 μNと見積もられ、受精卵内の[Ca²⁺]_iは蛍光強度で10%程度増加した。従って、「圧縮」が起こる際に受精卵内細胞の[Ca²⁺]_i変化が観察された。

まとめ(2): これら — の結果から、マウス受精卵におけるMS負荷に伴う応答について以下に議論する。流体または受精卵移動に伴うSSおよび蠕動運動に伴う圧縮を受けた際の受精卵について、マイクロ流路を用いた蛍光強度変化観察が可能となった。しかし、受精卵発育は数日間に及ぶために、今後は数日間定量的に評価できるシステムの構築が必要となる。受精卵のステージで受精卵のMSに対する応答性が異なる可能性があり、培養時におけるMSと分子動態の同時観察を計画している。

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16件)

Yuka Asano, Koji Matsuura, Mouse embryo motion and embryonic development from the 2-cell to blastocyst stage using mechanical vibration systems, *Reproduction, Fertility and Development*, 査読有、2013, pp.RD13039(1)-RD13039(9), 10.1071/RD13039

Koji Matsuura, Numerical calculations for diffusion effects in the well-of-the-well culture system for mammalian embryos, *Reproduction, Fertility and Development*, 査読有、2013, pp.RD13025(1)-RD13025(10),

10.1071/RD13025

Tetsuaki Hara, Koji Matsuura, Takashi Kodama, Keiko Sato, Yuko Kikkawa, Tomomi Muneto, Junko Tanaka, Keiji Naruse, A tilting embryo culture system increases the number of high-grade human blastocysts with high-implantation competence, Reproductive Biomedicine Online, 査読有、Vol.26, No.3, 2013, pp.260-268, 10.1016/j.rbmo.2012.11.014

Koyo Watanabe, Koji Matsuura, Fukukazu Kawata, Kotaro Nagata, Jun Ning, Hiroshi Kano, Scanning and Non-scanning Surface Plasmon Microscopy to Observe Cell Adhesion Sites, Biomedical Optics Express, 査読有、Vol.3, No.2, 2012, pp.354-359, 10.1364/BOE.3.000354

松浦宏治、成瀬恵治、Dynamic Culture System による受精卵発育促進とその機構解明、JOURNAL OF MAMMALIAN OVA RESEARCH、査読有、Vol.28、No.4、2011、pp.174-179、10.1274/jmor.28.174

〔学会発表〕(計 4 2 件)

Koji Matsuura, Application of Mechanical Stimuli using a Microfluidic Air Actuating System to Cultured Mammalian Embryos, 2010 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2010), 2010/11/08, Nagoya

Koji Matsuura, Development of observation system to investigate both intracellular calcium concentration and mechanical stimuli to mammalian embryos, 2011 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2011), 2011/11/08, Nagoya

Koji Matsuura, Comparison between

static and dynamic culture results using a novel air actuation system, International Embryo Transfer Society 38th Annual Conference (IETS38), 2012/1/9, Arizona

松浦宏治、不妊治療とメカノバイオロジ－～運動良好精子分離とメカニカル受精卵培養システムの医療現場への適用～, 第 51 回 日本生体医工学会大会、2012/5/10、福岡

〔図書〕(計 3 件)

Koji Matsuura, Keiji Naruse, InTech, Rijeka, Croatia, Advanced Elastomers: Technology, properties and applications, 2012, 243-262

〔産業財産権〕
出願状況(計 3 件)

名称: 被覆細胞の製造方法、及び細胞の三次元構造体の製造方法
発明者: 松浦宏治、松崎典弥、明石満
権利者: 大阪大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-180627、PCT/JP2013/072024
出願年月日: 2012 年 8 月 16 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ
<http://kojimatsu.ccsv.okayama-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 宏治 (Koji Matsuura)
岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・システム生理学・講師
研究者番号: 70443223