

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350501

研究課題名(和文) マウス受精卵培養時のメカニカルストレス応答解析

研究課題名(英文) Development of analytical systems for mouse embryos applied with mechanical stimuli

研究代表者

松浦 宏治 (Matsuura, Koji)

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：70443223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類受精卵の発育ステージとその内部の細胞を構成する分子・高分子の配置・発現によってメカニカルストレス(MS)に対する応答機構が異なると想定される。本研究では、その機構解明につながるような評価・解析系を構築する。マウス受精卵をマイクロ流路内に保持して、細胞内の変化観察と細胞内カルシウム濃度蛍光レゾイメージングが可能となった。倒立顕微鏡上で受精卵を観察できるためのマウス受精卵培養系の検討を行ったところ、受精卵は二細胞期から胚盤胞まで発育した。また、三次元培養系に適用できるようなマイクロ流体システム、およびハイドロゲルなどを用いた三次元培養系の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms for responses to mechanical stimuli (MS) in mammalian embryos are dependent on developmental stage of the embryos and/or the organization of macromolecules inside the embryo. In this study, we constructed an analytical system to evaluate the mechanism based on microscopic observations. By holding mouse embryos with a holding pipette inserted into the microchannel, we analyzed changes of cell shape and intracellular calcium concentration based on fluorescence ratio imaging. To record the images of the embryos during culture, we prepared an embryo culture system equipped with a CO₂ gas blender and a stage heater under an inverted microscope. Embryos in the two-cell stage developed to blastocysts using this system. Moreover, we developed a microfluidic system, a cell culture method using hydrogel and a method to engineer a cellular layer that can be applied to embryonic culture.

研究分野：生殖医工学

キーワード：マウス受精卵 メカニカルストレス マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の受精卵は卵管より圧縮・シヤーストレス(SS)などのメカニカルストレス(MS)を受けながら子宮腔内に達するものと考えられる。その効果を反映するための体外培養システムを開発した結果、優良胚盤胞数の有意な増加が見られた。マイクロ流体システムとアクチュエータ等を組み合わせることによって、受精卵にMS負荷した状態で受精卵内の各細胞の分子内応答を解析することができる。共焦点蛍光顕微鏡を用いた細胞内カルシウム濃度計測が可能な段階まで到達した。現在の研究データからは、受精卵の発育ステージとその内部の細胞を構成する分子・高分子の配置・発現によってその応答機構が異なるのではないかと想定しており、本研究では、その機構解明につながるような評価・解析系を構築する。特に、受精卵内部の細胞を観察できる実験系の構築に注力した。

2. 研究の目的

(1) MS負荷時における受精卵ステージ依存性の評価

マウス受精卵を用いた実験を繰り返し、数秒～1分程度のMS応答機構をより詳細に説明する計画である。最終的には、桑実胚～着床後受精卵の発育に関わるMS負荷時に引き起こされる作用機序の解明を目指す。本研究においては、次のセクションに記載する実験系を用いて受精卵内の細胞変化の観察を進めた。

(2) 卵管・子宮三次元培養モデルを組み込んだシステム構築

桑実胚や胚盤胞だけではなく、着床後の胚盤胞についても同様の解析を行えるように、三次元培養子宮モデルを作製し、そのモデルと前述のマイクロ流体システムを組み合わせる検討を行う。最終的には、長期培養しながらの計測に耐えうるシステムを目指す。

3. 研究の方法

(1) MS負荷時における受精卵ステージ依存性の評価

受精卵に流れによるSSを負荷した際の各細胞応答を調べるために、蛍光顕微鏡と図1に示すマイクロ流体システムを用いて、受精卵内の細胞挙動を観察できるように、流路内に保持したマウス受精卵変化の解析を行った。シリンジポンプにKSOM培地を導入してSSを受精卵に負荷した。SS負荷に伴い細胞の移動が観察され、蛍光を示す部分のピクセル数(細胞塊面積)変化を解析した。また、細胞内カルシウム濃度評価に適した蛍光色素の探索も行った。

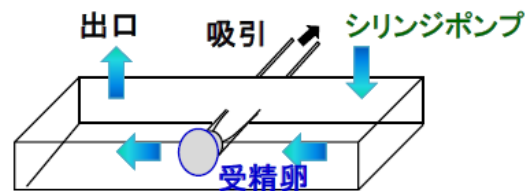


図1 受精卵内の細胞挙動を観察できるマイクロ流体システムの模式図 シリコン樹脂で作製した流路内にピペットを導入し、受精卵を保持して観察した。

(2) 卵管・子宮三次元培養モデルを組み込んだシステム構築

倒立顕微鏡上で受精卵を観察できる透明ヒーターとCO₂ガスブレンダを備えたマウス受精卵培養系の検討を行った。受精卵との共培養または受精卵培養環境の弾性率制御を目的として、フィーダーセルの三次元培養系の適用を試みた。三次元培養系に適用できるようなマイクロ流体システム設計・試作、およびハイドロゲルなどを用いた三次元培養系の検討を行った。

4. 研究成果

(1) MS負荷時における受精卵ステージ依存性の評価

< 受精卵内細胞の形状変化 >

シリンジポンプを駆動して SS 負荷を開始した数秒後以降に細胞体積の変化が観察された(図2)。その変化は全体的に等方的であり、外側の細胞は圧縮される傾向であった。透明体形状の変化は観察されなかった。これらの細胞には流れが発生した際に SS 以外の力、例えば浸透圧が受精卵内の細胞に負荷されている可能性がある。

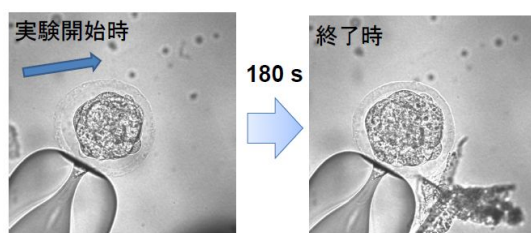


図2 観察された SS 負荷(A)前(B)後のマウス受精卵内細胞形状の変化 (A)の矢印は流体の移動方向を示す。

次に、細胞変化について定量化を行った。蛍光を示すピクセル数を細胞断面積とした場合、図3に示すように SS 負荷後のピクセル数の増加は単一の指数関数で近似可能であった。定常流の際には SS が一定と仮定して、この時定数はフォークトモデルを適用した際には粘性/弾性の比となり、時定数が小さいほど弾性応答への収束に時間を要すると言える。また、この指数関数の収束値は受精卵内細胞の弾性を示す。流路構造と流速から計算した SS が 13.3 dyne/cm^2 の場合、桑実胚内の細胞よりも胚盤胞内の細胞でこの時定数が 0.45 倍に、収束値は 0.90 倍に低下し、胚盤胞の細胞は桑実胚の細胞よりも弾性率が高く、粘性の寄与が小さいと言える。従って、受精卵のステージによる SS に対する応答に関する違いは細胞の構造に基づくものと想定される。

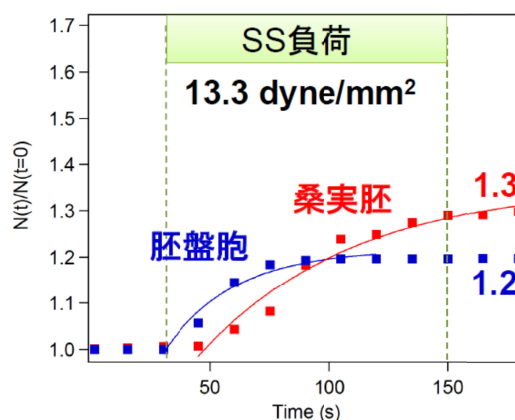


図3 桑実胚と胚盤胞内の細胞面積の変化 実線は単一の指数関数でフィットした結果である。

分子構成との関連について議論する。透明帯はムコ多糖で構成されており、水または小分子を透過する可能性がある。流れが生じた際には、受精卵近傍のイオン強度が変化した可能性もある。SS 負荷効果以外にも流体移動に伴うイオン強度低下に伴う浸透圧が細胞に負荷されることも起こり得る。

桑実胚では胚盤胞よりも細胞内構造や細胞間結合が未発達である。細胞内のオルガネラの弾性が大きい部分はアクチンと微小管であり、その弾性率は 1 GPa 程度と報告されている。胚盤胞において、桑実胚よりもアクチン繊維が密になっている可能性があり、桑実胚よりも細胞全体の弾性率が大きくなると想定している。

< 蛍光顕微観察とレシオイメージング >

流れ刺激を桑実胚と胚盤胞に負荷し、細胞内カルシウム濃度の変化を計測した。上記の実験結果から、SS 負荷時には細胞内体積が増加する現象が観察され、細胞内カルシウム濃度変化を議論するにあたり、二波長励起・発光で評価するレシオイメージングが必要であった。最終年度に、レシオイメージングが可能な蛍光色素の検討を行った。共焦点蛍光顕微鏡のレーザー波長に適し、かつ受精卵の細胞内に留まる蛍光色素は Fura-2, Fluo-4,

Fluo-8, Rhod-4 であった。励起・発光波長の組み合わせおよび感度から、Fluo-8(Fluo-4), Rhod-4 の組み合わせが好適であることを見出した。その後、SS 負荷実験を行った際に、受精卵内細胞が圧縮された場合に細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。この傾向は我々が過去に空気圧アクチュエータを用いて受精卵を圧縮した際の研究結果と対応していた。

SS 負荷の影響だけではなく、流れが発生した際の細胞近傍における局所的なイオン強度変化に伴う浸透圧が等方的な細胞の体積増加を引き起こし、細胞が圧縮される現象が観察された。マウス桑実胚と胚盤胞で SS 負荷時に胚発育阻害を示す閾値が異なるのは、ステージに応じ細胞内分子システムや細胞間構造の差異に由来する可能性があり、今後その点を検証する。細胞質、細胞膜変化に伴う分子動態によって、胚発育の低下や遅延・細胞のアポトーシスなどに影響を及ぼすと考えられ、その因果関係を MS 負荷応答の観点から検証を続ける。

(2) 卵管・子宮三次元培養モデルを組み込んだシステム構築

< 観察培養システムについての検討 >

顕微観察が可能な状態での受精卵培養系を構築し、受精卵は二細胞期から胚盤胞まで発育した。今後は、数日間の胚発育時の蛍光顕微観察に本システムを適用し、受精卵内の物質動態について評価する。

< 三次元培養系の検討 >

三次元培養系に適用できるようなマイクロ流体システムに関しては、上記の観察培養システムに組み込んだ状態で細胞処理または細胞培養に使用できるように改善している段階である。三次元培養については、細胞外マトリクスの交互積層法を用いた系やペプチドハイドロゲルを用いたフィーダーセ

ルの培養系などを、受精卵培養に適用できるよう検討している段階である。

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)

Koji Matsuura, Han-Wei Huang, Ming-Cheng Chen, Yu Chen, and Chao-Min Cheng, Relationship between Porcine Sperm Motility and Sperm Enzymatic Activity using Paper-based Devices, *Scientific Reports*, 7(2017) 46213.

Koji Matsuura, Ikuyo Sugimoto, Yuka Kuroda, Koji Kadowaki, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Development of microfluidic systems for fabricating cellular multilayers, *Analytical Sciences*, 32(2016) 1171-1176.

松浦宏治、成瀬恵治、生殖医療・育種デバイス、生物工学会誌 (2014) 92-4 号特集 8, 30-33

[学会発表] (計 10 件)

松浦宏治、浅野友香、成瀬恵治、流路内に保持したマウス受精卵内細胞の顕微観察、第 55 回日本生体医工学会大会、2016/4/28

浅野友香、松浦宏治、成瀬恵治、マウス桑実胚および胚盤胞のせん断応力に対する細胞変化観察、第 66 回日本生理学会中国四国地方会、2014/11/2

松浦宏治 人工卵管・子宮周辺技術からのナノカーボン科学への展開 第一回ナノカーボンバイオシンポジウム、2014/9/2

浅野友香、松浦宏治、成瀬恵治、傾斜培養がマウス着床前体外受精胚の発育に及ぼす影響 第 6 回生物物理学会中国四国支部大会、2014/5/17

[図書] (計 3 件)

Koji Matsuura, Saori Nishina, Yuka Asano, Recent Advances in Microfluidic Diagnostic

and Treatment Systems for Assisted Reproductive Technologies in Developing Countries, Point-of-Care Diagnostics - New Progresses and Perspectives, IAPC-OBP, Croatia (2017) 93-112

成瀬恵治、松浦宏治、原鐵晃：メカノバイオロジー、第21章：生殖工学のバイオメカニクス：生理学・メカニクス・治療，化学同人，(2015)

〔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://www.bme.ous.ac.jp/study/physiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 宏治 (Koji Matsuura)

岡山理科大学工学部・生命医療工学科・准教授

研究者番号：70443223

(3) 連携研究者

浅野 友香 (Yuka Asano)

岡山理科大学工学部・生命医療工学科・研究補助員

研究者番号：40726741

成瀬 恵治 (Keiji Naruse)

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233