

氏名・(本籍)	藤嶋 明子 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1055 号
学位授与の日付	令和 3 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Live visualisation of electrolytes during mouse embryonic development using electrolyte indicators(マウス胚発生における電解質の時間的空間的分布の解析)

論文審査委員	(主査) 尾野 恭一 教授	
	(副査) 渡邊 博之 教授	齋藤 康太 教授

学位論文内容要旨

論文題目 Live visualisation of electrolytes during mouse embryonic development using electrolyte indicators

(論文題目の和訳) マウス胚発生における電解質の時間的空間的分布の解析

申請者氏名 藤嶋明子

研究目的

胚発育のタイムラプス連続観察装置の普及により、初期胚分割から胞胚腔形成までの挙動がより詳細に把握できるようになった。それら挙動については様々な研究が重ねられ、様々な電解質が関わっていることが明らかとなっている。しかし既報では各チャンネルの阻害剤やロックアウトマウスを用い、間接的にその電解質の機能を予測したものにはすぎない。さらに電解質チャンネルは電解質の輸送だけでなく、メッセンジャー機能を持ち合わせていることも明らかになっており、阻害剤を使用するとそれら機能をも阻害してしまうため、電解質の濃度勾配のみがどこまで胚発育に関わっているのかは明らかにできていない。

本研究では電解質インジケータを使用し、胚発育における細胞内電解質濃度の推移を実際に観察する。また培養液等の培養環境を変えたうえでの電解質挙動を可視化することで、胚のダイナミックな発達挙動と電解質との直接的な関係を明らかにする。

それらの知見を得て、電解質の移動が引き起こす胚の発育における細胞生理学的な知見をまとめ、ヒト体外受精における培養環境向上に向けての情報を発信する。

研究方法

倫理委員会の承認((秋田大学動物実験倫理委員会(承認番号:第 a-1-3119 号)、秋田大学医学部倫理委員会(承認番号:1090-2))を得た。当施設の動物実験倫理委員会の規則に則って、9-14 週齢の B6D2F1 雌マウスに PMSG/hCG 刺激し採卵、ICR 雄マウスより精子を採取し、体外授精にて 2 細胞期胚を得た。それら胚を凍結保存した。融解後、目的の発達段階(桑実胚期、胚盤胞期、孵化期)まで培養し 0.5 μM の Na インジケータ(CoroNa Green AM (Thermo Fisher Scientific)または 5 μM の K インジケータ(ION Potassium Green-2 AM (Abcam))を培養液に添加し 37 度環境下で 30 分培養した後に共焦点顕微鏡(LSM780 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany))にて撮像した。全ての発達段階で control 群と Na⁺/K⁺ ATPase 阻害薬である Ouabain octahydrate 使用群に二分し観

察した。得られた画像より細胞内および胞胚腔内の蛍光強度の平均値を ZEN Software 2012 black edition にて算出した。

算出された蛍光強度を各群間で比較検討した。統計処理は The R Project for Statistical Computing (R Version 3.6.1, Vienna, Austria)を用いて行った。

研究成績

合計 180 個のマウス胚を観察した。Na⁺ imaging (計 96 個): control 群(計 55 個 [桑実胚期 (n = 20), 胚盤胞期 (n = 18), 孵化期 (n = 17)]), ouabain 群(計 41 個) [桑実胚期 (n = 17), 胚盤胞期 (n = 12), 孵化期 (n = 12)]. K⁺ imaging (計 84 個): control 群(計 50 個) [桑実胚期 (n = 22), 胚盤胞期 (n = 11), 孵化期 (n = 17)], ouabain 群(計 34 個) [桑実胚期 (n = 16), 胚盤胞期 (n = 9), 孵化期 (n = 9)]。

栄養外胚葉細胞内の Na⁺および K⁺の蛍光強度を各発達段階で比較を行った結果、桑実胚期が胚盤胞期に比し有意に Na⁺蛍光強度が高く(p = 0.0143)、桑実胚期が孵化期に比し優位に K⁺蛍光強度が低いことが示された(p = 0.0012)。このことは、胞胚腔形成過程において栄養外胚葉細胞内の Na⁺濃度は低下し K⁺濃度が上昇していることを示しており、既報による Na⁺/K⁺ ATPase の機能と矛盾せず、その細胞内電解質濃度の変化を示した初めての報告である。

また、胞胚腔形成後の栄養外胚葉細胞において、胞胚腔に直接接している細胞は内細胞塊を裏打ちしている細胞に比較し K⁺蛍光強度が有意に高く(p = 0.0042) 栄養外胚葉細胞の位置により Na⁺/K⁺ ATPase の活性が異なるという新たな知見を得た。

Ouabain 負荷により Na⁺/K⁺ ATPase 活性の高い胚盤胞期と孵化期で Na⁺蛍光強度が高くなったことから、Na⁺蛍光強度は細胞内 Na 濃度を反映しているとして矛盾しない結果となった。しかし K⁺蛍光強度は Ouabain 負荷で影響を受けなかった。これは ION Potassium Green-2 AM と Ouabain 併用群では胚発育障害が control 群と比し高かった(p=0.0040)ことから、細胞障害による電解質濃度変化が原因と考えられた。

結論

電解質インジケータを用い胚発育における電解質の時間的・空間的な分布をイメージングした報告は過去存在しない。今まで胚発生への電解質の挙動については多く報告されてきたが、本研究は胞胚腔形成で大きな役割を担う Na⁺と K⁺が胞胚腔形成を経て細胞内の電解質濃度が変化していることを示した。これら結果は既報で論じられてきた胚発生における電解質チャンネル・各ポンプの働きを裏付けるだけでなく、免疫染色のみでは示すことのできなかつた細胞の位置による活性の違いを可視化し明らかにした。本研究により Na⁺と K⁺の動態と胚発生との関連を明らかにされることで、生殖医学分野において胚発生の細胞生理学的な知見を深め、新しいヒト胚培養液の開発などに萌芽していくことが期待できる。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 尾野 恭一

申請者： 藤嶋 明子

論文題名： Live visualisation of electrolytes during mouse embryonic development using electrolyte indicators.

(マウス胚発生における電解質の時間的空間的分布の解析)

要旨

近年、胚発育のタイムラプス連続観察装置の普及により、初期胚分割から胞胚腔形成までのプロセスがより詳細に把握できるようになり、これに種々のチャンネル阻害薬や遺伝子改変マウスを組み合わせた研究から、 Na^+ や K^+ 等の細胞内電解質が胚発育に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。しかしながら、細胞内の電解質濃度を直接測定した研究は殆どおこなわれていない。そこで、本研究は、胚発育における細胞内電解質濃度の推移を実際に観察することで、胚のダイナミックな発達挙動と電解質との直接的な関係を明らかにすることを目的としておこなった。実験には電解質インジケータを用い、桑実胚期、胚盤胞期、孵化期の細胞内 Na^+ 及び K^+ 濃度を可視化し、さらに Na^+/K^+ -ATPase 阻害剤の作用を検討した。その結果、1) 栄養外胚葉細胞内の Na^+ 濃度は桑実胚期が胚盤胞期に比し有意に高く、 K^+ 濃度は桑実胚期が孵化期に比し有意に高いことが示された。2) 胞胚腔形成後の栄養外胚葉細胞において、胞胚腔に直接接している細胞は内細胞塊を裏打ちしている細胞に比較して K^+ 濃度が有意に高く、栄養外胚葉細胞の位置により Na^+/K^+ -ATPase の活性が異なることが示された。3) Ouabain 負荷により、 Na^+/K^+ -ATPase 活性の高い胚盤胞期と孵化期で Na^+ 蛍光強度が高くなった。以上により、イオンチャンネルやイオンポンプの機能が胚発生の過程で時間的に変化するだけでなく、胞胚腔形成後は栄養外胚葉細胞の局在により空間的にも変化することが示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

電解質インジケータは比較的新しい研究ツールであり、単離した細胞や培養細胞での研究報告は比較的多く見られるものの、マウス胚のように比較的厚みのある標本への応用

は、本研究が初めての報告である。とりわけ、桑実胚期、胚盤胞期、孵化期の栄養外胚葉細胞内の電解質濃度の経時的変化を明らかにしたこと、及び、胞胚腔形成後の栄養外胚葉細胞における細胞内 Na^+ 及び K^+ 濃度が栄養外胚葉細胞の位置により異なることを、初めて可視化して示したことは本研究の斬新性を支持する。

2) 重要性

マウス胚の着床前発生は、受精卵が割球に順次分割することから始まる。8細胞期の後、割球は圧縮され、桑実胚が形成される。その後、桑実胚は細胞が頂端-基底軸に沿って分極し始め、やがて胚盤胞を形成する。胚盤胞は、両方とも栄養外胚葉 (TE) に囲まれた液体で満たされた空洞と、局在する内部細胞塊 (ICM) の存在を特徴としている。

多くの研究者が、胚発生における電解質の関与を報告している。例えば、受精時には、胚発生の開始には Ca^{2+} の振動が必要であり、 K^+ は細胞周期の調節に関与していると考えられている。特に、卵割腔の形成を調べる多くの研究では、水の動きが、 Na^+ 濃度勾配、 Na^+/H^+ 交換体、および Na^+ チャンネルとともに、頂端膜での Na^+ 流入に重要な役割を果たすこと等が報告されている。

本研究は、電解質インジケータを用いて、桑実胚期、胚盤胞期、孵化期の細胞内 Na^+ 、 K^+ 濃度を可視化し、これまで推測されてきたイオン輸送体の働きを実証するだけでなく、胞胚腔形成後の栄養外胚葉細胞の空間的分布の相違を示している。新たな手法の導入により、発生学的にも重要な研究結果を提供している。今後の研究の発展を期待したい。

3) 実験方法の正確性

胚発育過程に関する研究は、申請者の所属する研究室において継続的に行われており、*in vitro* 受精法によるマウス胚標本の作成は確立されている手法である。本研究で新たに導入した電解質インジケータによる細胞内 Na^+ 、 K^+ 濃度の測定については、桑実胚期～孵化期の胚のように厚みのある細胞塊に電解質インジケータを使用した報告がないことから、独自に試行錯誤を重ね、共焦点レーザー顕微鏡により一定の高さで撮影したスライス像を用いるなど、蛍光強度の測定方法について工夫している。また、インジケータの細胞毒性についての検討を行うなど、電解質インジケータを本研究に導入するにあたって注意深く実験が行われたことが示され、それらの手法については論文内に明記されている。正確性に何ら問題はない。

4) 表現の明瞭さ

研究の背景、研究方法・方法・結果および考察が明瞭に記載されている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。