

## 2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

|       |                                                                   |
|-------|-------------------------------------------------------------------|
| 研究課題  | <b>ガソトランスミッターを用いた受精卵分化促進培養液の開発ーウルトラファインバブルによる新たな細胞内輸送機構に着目してー</b> |
| キーワード | ①不妊症、②ガソトランスミッター、③ウルトラファインバブル                                     |

### 研究者の所属・氏名等

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| フリガナ<br>氏 名                 | ヒラカワ トヨフミ<br>平川 豊文                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 配付時の所属先・職位等<br>(令和5年4月1日現在) | 福岡大学病院・助教                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 現在の所属先・職位等                  | 福岡大学医学部・講師                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| プロフィール                      | 2013 年から福岡大学病院で産婦人科医師として臨床に従事しながら、再発卵巣癌や子宮内膜癌、また絨毛膜羊膜炎の診断バイオマーカーや、胎児感染の診断予測としての有用性の研究を行いました。2018 年からは福岡大学大学院医学研究科先端分子科学系専攻博士課程に進学し、子宮内膜症モデルマウスを用いて世界で初めて、脂肪組織由来間葉系幹細胞の抗子宮内膜症効果を Scientific report 誌で発表しました。その他の研究においても、脂肪組織由来間葉系幹細胞による胚細胞分化能促進効果や、老化マウスの性腺組織への抗加齢効果など、多くの分野で積極的な研究活動を行っています。 |

### 1. 研究の概要

体外培養された着床前胚は、多量の活性酸素を生成し、発生能に重大な影響を及ぼす。そこで申請者は、この活性酸素を除去する強力な抗酸化作用をもたらすガソトランスミッターに着目した。生体内で生理的な機能を持つガス状の生理活性物質（ガソトランスミッター）は抗酸化作用、抗アポトーシス作用、抗炎症作用を示し、細胞保護的に作用する。一方で、ガソトランスミッターは半減期が非常に短く不安定であり、培養液中に保持することは不可能と言われてきた。遊離分子（CORM など）を用いた研究がなされているが、試薬に金属分子が含まれており、その毒性により臨床応用が進んでいない。そこで申請者は、このガソトランスミッターを培養液中に保持する手段として、ウルトラファインバブルに着目した。ウルトラファインバブルは光学顕微鏡で見えないほど小さい直径 1 $\mu$ m 以下の超微小気泡のことで、気泡は極めて長期間、浮上することはなく液体中にいつまでも安定して存在できるという特徴がある。このウルトラファインバブル内にガソトランスミッターを封入し、培養液中に安定化させた状態で存在させ、胚細胞に取り込ませることで活性酸素を除去し、胚分化能を促進させることに成功した。

### 2. 研究の動機、目的

我が国では、晩婚化・晩産化により少子高齢化が加速度的に進行している。晩婚化による不妊症は急速に増加し、その原因は女性側の高齢による卵質の問題、主には受精卵の分化能異常である。不妊治療はある段階で妊娠に至らない場合に体外受精や顕微授精を含めた高度な医療へと移行するが、現状では 7 割以上の受精卵が胚盤胞まで分化できず、有効な胚移植が行えていない。そのため、体外培養環境を改善し、受精卵の分化能を亢進させる治療法の開発が

切望されている。申請者は、以前より不妊領域をテーマとした研究（子宮内膜症と再生医療）を行ってきた。再生医療を学ぶ中で、間葉系幹細胞の持つ抗酸化作用・抗老化作用が、ガソトランスミッターの作用と共通していることを見出し、ガソトランスミッターの胚分化能への効果という、本研究を発案した。

### 3. 研究の結果

#### (1) ガソトランスミッター含有UFBの作成

まず、UFB発生装置にて経時的で安定性に極めて優れている微小バブルの特性を利用して、ガスを含む安定したバブル含有の培地の特性を確認した (Miyamoto S, Hirakawa T, et al. Physical properties of ultrafine bubbles generated using a generator system. in vivo, 37: 2555-2563. 2023)。同装置を用いて、ガソトランスミッターの一種である一酸化炭素(CO)を含有したウルトラファインバブル (CO-UFB) 培養液を作成した。培養液はSingle Step Culture Medium(マウス受精卵培養液)を使用した。UFB作成過程において、培養液が失活しないように冷却装置を用いて、温度上昇を防ぎながら実験を行った。ナノ粒子解析システム (NanoSight) での解析の結果、培養液中に径50-200nmを中心としたUFBの作成に成功し、経時的な消失はなかった。CO-UFBの効果は濃度依存的に増加することがわかった。

#### (2) CO-UFBがマウス受精卵に及ぼす効果

通常の培養液で培養したものをコントロール群、CO-UFB培養液で培養したものをCO-UFB群とした。CO-UFB群の濃度は高濃度 (30億/ml) から低濃度 (0.5億/ml) まで段階的に振り分けた。ICRマウスの凍結2細胞期胚(各群N=150)を各培養液で培養し、胚盤胞形成率および孵化率を算出した。その結果、最も分化率が亢進する濃度は約3x108個/mlであり、コントロール群と比較して、CO-UFB群の胚盤胞形成率 ( $78.7 \pm 6.6\%$  vs  $96.0 \pm 3.3\%$ ) および孵化率 ( $55.3 \pm 9.0\%$  vs  $74.0 \pm 5.9\%$ ) は有意に上昇した。また、各群の胚盤胞のRNAシーケンシングでは、CO-UFB群において97個の発現変動遺伝子が抽出され、Gene Ontology解析にてミトコンドリア関連遺伝子群の発現亢進を認めた。

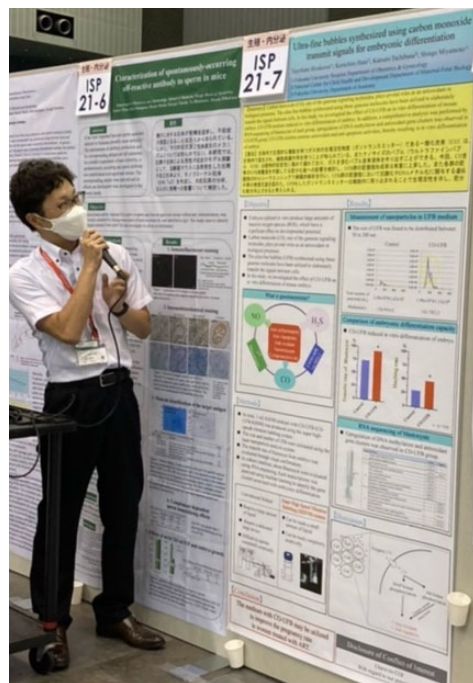
これらの結果から、UFB化したガソトランスミッターは、ミトコンドリア機能を活性化させることで、胚分化能を向上させる可能性を示した。

#### 【学会発表】

Search for the optimal production method of ultra-fine bubbles in culture medium for clinical applications. / Hirakawa T et al. / 第75回日本産科婦人科学会学術講演会

#### 【論文発表】

Physical Properties of Ultrafine Bubbles Generated Using a Generator System / Miyamoto S\*, Hirakawa T\* et al. (2023, 37: 2555-2563)  
\*Equally contributed.



### 4. 研究者としてのこれからの展望

本研究で明らかになったガソトランスミッターによる受精卵の分化誘導に関する新たな知見を、臨床現場への還元を目標に今後も精進してまいりたいと思います。

### 5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究実施にあたって、多大なるご支援を賜りました企業様、関係者の皆様に深く感謝を申し上げます。本研究は、少子高齢化という日本が直面している問題を、少しでも解決に導いていければという思いから計画した研究でしたが、ご支援のおかげで研究を遂行することができました。今後もこの研究をさらに発展させ、社会に貢献できるよう、精進してまいります。