

2017 年度 日本生殖工学会学術集会

プログラムおよび講演要旨集

2017 年 12 月 2 日(土)

明治大学 駿河台キャンパス

グローバルフロント 1 階 多目的ホール

# 2017 年日本生殖工学会学術集会

2017 年 12 月 2 日(土)

明治大学駿河台キャンパス

グローバルフロント 1 階 多目的ホール

13:00 ~ 13:05 開会の辞 柏崎 直巳 (麻布大学)

13:05 ~ 13:50 招待講演 (座長:菊地 和弘 (農業・食品産業技術総合研究機構))  
「ブタの卵細胞質内精子注入技術の確立と応用」  
中井 美智子 (農業・食品産業技術総合研究機構)

13:50 ~ 16:40 シンポジウム 「温故知新: 生殖工学の現状と将来」  
(座長:柏崎 直巳 (麻布大学)・牛島 仁 (日本獣医生命科学大学))

講演 I :「畜産業における生殖工学技術の研究成果と生産現場の利用」  
牛島 仁 (日本獣医生命科学大学)

講演 II:「幹細胞工学の温故知新: 生殖細胞の作製」  
林 克彦 (九州大学)

講演 III:「体外受精治療を支える体外培養法の温故知新: Microfluidic embryo culture system の誕生と展望」  
水野 仁二 (乾マタニティクリニック・乾フロンティア生殖医療不妊研究所)

講演 IV :「長鎖脂肪酸によるマウス精子の運動性調節メカニズム」  
森山 隆太郎 (近畿大学)

講演 V :「ラット凍結保存精子からの産子作出法の温故知新」  
柏崎 直巳 (麻布大学)

16:40 ~ 16:45 閉会の辞 牛島 仁 (日本獣医生命科学大学)

17:00 ~ 19:00 学術情報交換会 (リバティタワー 23F サロン燦)

## 招待講演

### ブタの卵細胞質内精子注入技術の確立と応用

中井美智子（農研機構 本部）

nakai3@affrc.go.jp

近年、ブタは、食用としてだけではなく、大型実験動物としての利用も期待され開発が進められてきた。しかし、他の畜種と同様にブタも家畜伝染病の脅威に曝されており、種や系統の保持、品種改良のための遺伝資源の保存、及びその効率的な利用技術の確立の重要性が高まっている。

家畜やヒトの生殖補助技術の一つとして、精子を卵細胞質内に直接注入することで受精卵を作出する卵細胞質内精子注入（intracytoplasmic sperm injection: ICSI）技術が発達してきた。ICSI 技術の主な利点としては、運動性の乏しい精子を用いた受精卵作出を可能とすることが挙げられる。有用な形質の家畜精液は、その効率的利用、遺伝資源保持のために凍結保存されているが、精子の耐凍性に個体差が大きいブタでは、凍結融解後の精子運動性の顕著な低下が認められることがある。そのような場合、ICSI 技術は遺伝資源保存、個体再生方法として非常に有用である。また、ブタのように体外受精時に多精子受精が頻発する動物種では、単精子受精卵の効率的な作出をも可能とする。しかし、ICSI を行ったブタ卵（ICSI 卵）では、受精および発生能の低さが問題となっている。そこで、ブタにおける ICSI 技術の確立を目的として、体外受精卵と ICSI 卵で生じる受精現象の違いに着目し、ブタ ICSI 卵の受精および発生効率の低下要因を究明した。さらに、受精成立に精子の運動性を必要としない ICSI の利点を活かした新たな精子保存法および作出法（凍結乾燥法、精巢片異種間移植法）の確立にも取り組んだ。

一連の研究で得られた成果は、ブタだけではなくウシやウマなど他の大型家畜へも応用可能なものであり、有用個体の雄性遺伝資源の保全やその効率的な利用という観点から、今後の日本における畜産業の発展や生物産業の創成に貢献しうるものと期待される。

## シンポジウム:「温故知新: 生殖工学の現状と将来」

### 講演 I

#### 畜産業における生殖工学技術の研究成果と生産現場の利用

牛島 仁 (日本獣医生命科学大学 動物科学科)

良質な畜産物を供給するため、優れた雄と雌を交配させることによって育種改良を行ってきました。また、国内で生産される食品の質の向上、さらなる安定供給そして効率的な生産に向けて、人工授精・受精卵移植・体外受精技術が考案され、動物産業に利用されています。受精卵移植技術は食品生産にとどまらず、医学や薬学の発展、希少な動物の遺伝資源の保全、さらには新しい産業の基盤技術になるため、これまで多額な公費が投資されてまいりました。

酪農業界では TPP 参入に伴う農産物の自由化、EU 諸国とのチーズ協定合意、2020 年東京オリンピックに向けたアニマルウェルフェア対応の食材提供など、酪農業は変革の岐路に立たされ、これらの社会情勢に順応した経営戦略が求められています。こうした中、国内の酪農業は外国乳製品との差別化を図るため、新たな農産物の市場価値創出のためのブランド化が進める動きがあります。また、多様化した消費者ニーズに適応するため、酪農家自身が食品加工と流通販売までを手掛ける「6 次産業化」の導入を進めています。これらの利用に適う乳用品種の導入には受精卵移植技術が最も有用な選択肢であり、酪農家での活用が期待されています。

受精卵移植技術は新たな品種の増産や導入の有用なツールになり、例えば 1 個数万円の受精卵を購入して 50 万円以上の価格で取引される黒毛和種が年間に約 3 万頭生産されています。しかしながら、教科書には「未だ乳用牛から生産される子牛の 99%が人工授精によるもので、受精卵移植技術の利用実績は未だに希少」と書かれており、生産現場で日常的に利用される技術には至っていません。これは、人工授精技術に比べると技術コストが高いこと、採卵成績や受胎率などの成績が不安定で産子生産の期待値が低いなどの原因があげられ、特に搾乳によるエネルギー感作を強く受ける乳牛で顕著です。

本講演では、この技術が産業界で平準化されるよう、今なお技術開発と技術者養成が行われている概要についてご紹介します。

## シンポジウム:「温故知新: 生殖工学の現状と将来」

### 講演 II

#### 幹細胞工学の温故知新: 生殖細胞の作製

林 克彦 (九州大学大学院医学研究院ヒトゲノム幹細胞医学分野)

培養皿上で多能性幹細胞から精子や卵子を作り出すことができれば、配偶子形成のメカニズムの解明や、得られた配偶子を用いた個体の作製に貢献するであろう。我々はこれまでにマウスのES細胞およびiPS細胞から機能的な卵子を分化誘導する体外培養系を開発した。この培養系ではES/iPS細胞を始原生殖細胞(生殖細胞系列の起源)に一旦分化させたのちに、それらを胎仔卵巣の体細胞と再凝集して疑似卵巣を作製する。それらの疑似卵巣を培養膜上に保持することにより、ES/iPS細胞由来の始原生殖細胞は卵母細胞へ分化し、最終的には第二極体を放出した成熟卵子へと分化する。この培養系における卵母細胞系列の形態的变化や遺伝子発現変動は体内でのそれらをほぼ踏襲しており、実際に得られた卵子の一部は受精により個体にまで成長する。

体外培養系と比較することにより明るみになる体内での特異的な現象を解析することは、卵母細胞の分化メカニズムの解明のみならず体外培養系の改良にも貢献する。本シンポジウムでは、我々が開発した培養系の紹介に加えて、体外培養と体内との相違点から見えてきた卵母細胞の分化メカニズムについて議論したい。また、体外培養で得られる卵子の安全性や将来的な有効利用についての課題についても議論したい。

## シンポジウム:「温故知新: 生殖工学の現状と将来」

### 講演 III

#### 体外受精治療を支える体外培養法の温故知新: Microfluidic embryo culture system の誕生と展望

水野 仁二 (乾マタニティクリニック・乾フロンティア生殖医療不妊研究所)

本学会の前身の日本生殖医療エンジニアリング研究会の第1回学術集会は、1999年に開催された。そして設立中心メンバーの尾川昭三先生は「生殖工学に貢献した代表的な研究例について」と題する講演をしてくださった。尾川先生は1958年に東京大学大学院にて「ラットの人工授精並びに交配時における雌雄副生性器の運動に関する研究」で学位を授与された。そして数年後には黎明期の Embryology の領域にて世界に先駆けて“未開拓の哺乳動物の卵子と精子の In vitro での培養、受精、着床、凍結保存、顕微操作、遺伝子操作等の現在の生殖工学の礎となる要素技術に関する研究とシステムの開発”を開始し、それらの成果を Nature 4本(1969-1972年の4年間)を筆頭に立て続けに論文を発表した。

中でも Nature.1972,238(5362):270-1.に掲載された“In vitro culture of rabbit ova fertilized by epididymal sperms in chemically defined media. (In vitro で化学的成分既知培養液でのウサギ精巣上体精子の体外受精成功)”は、1978年の英国での Edward らの世界初のヒト体外受精児誕生の6年前の快挙であった。この時に国内でヒト体外受精治療を行う施設とのコラボレーションがスタートしていれば、世界初のヒト体外受精児は日本から出ていたやも知れない。

また、特筆すべきは Nature.1972,238(5364):402-3.に掲載された“Culture of rabbit blastocyst in a medium with a convection current (In vitro でウサギ胚を着床させ18体節期へ発育)”で、何と1972年に斬新なアイデア“熱対流式の循環培養により人工子宮”開発コンセプト“の礎を提示している。この研究は Embryology の Static culture (静置溜置培養) のコンセプトに一石を投じ、後の Dynamic culture とりわけ Microfluidic embryo culture 誕生の先駆けとなった事は明らかである。

ヒト体外受精研究は1940年代より開始、臨床応用されたのは1971年からで、以降世界各国にて試行錯誤を経た後1978年に英国にて世界初のヒト体外受精児が誕生した。そして2010年にはノーベル医学生理学賞を受賞した。この成功は臨床医 Patrick Steptoe と基礎研究者 Robert Edwards のコラボレーションにより実現した。国内では1983年に東北大学で初めて健児が誕生して以来、2015年までに累計で48万2627人が生まれている。2015年の一年間だけでも5万1001人が誕生している(出典:日本産婦人科学会統計)。

当院では1995-2016年の22年間に1844人が体外受精治療で妊娠している。そして、2010年~2015年の6年間の40歳未満2,265周期の臨床的妊娠率及び健児生産率は、凍結融解胚移植周期で45.2%及び31.5%、そして新鮮胚移植周期で22.7%及び22.5%と日本産科婦人科学会の国内統計平均値と比較し高値であった。

現在のヒト体外受精治療の生産率は、世界平均で3割以下と低迷しており、画一的な不妊

治療を反復して行っても妊娠率の飛躍的向上は期待できない。また難治不妊患者に子供をお授けるためにも何らかのブレイクスルーが必須である。更に Epigenetic や DOHaD(成人病胎児期発症起源説)などの問題が懸念されている

我々は、卵子・精子・受精卵を体内環境に近い条件で体外培養するシステムの開発を目指し、この目標を達成すべく医工連携の道を探り、東京大学生産技術研究所を筆頭に先進研究機関と 2004 年より共同研究を開始した。本研究は院内、東京大学医学系研究科・医学部、日本産科婦人科学会の3つの倫理審査委員会の承認を取得し、倫理と安全性を最重要視し、研究開発に取り組んでいる。

本講演では、まず以下の2点につき概説する。

・既存の培養システム

・In vivo mimic の理想の培養システムとは？

そして、以下の6点につき Evidence を踏まえ Microfluidic embryo culture system のヒト体外受精治療への適用と展望を紹介する。

- 1、In vivo mimic の安全高性能な培養液開発の試み
- 2、伸縮刺激付加培養システム(受精卵と患者子宮内膜細胞との共培養)開発の試み
- 3、Microfluidic embryo co-culture system 開発の試み---マウスモデル
- 4、Microfluidic embryo co-culture system 開発の試み---ヒト臨床応用
- 5、受精と培養を Microfluidic embryo culture system の中で同時に行う試み
- 6、臨床利用するための、シンプルな Microfluidic dish 開発の試み

今後これらの新たな治療システムの完成により、ヒト体外受精治療の安全性と健児生産率(Take home baby rate)が向上することを祈念する。

#### 【謝辞】

本研究開発にお力添えを賜りました先進研究機関の先生方に心より感謝申し上げます。

また、本学会開催の労をお取りくださいました柏崎先生をはじめ関係者の先生方に御礼申し上げます。

最後に、本学会を設立されご指導ご鞭撻を賜りました恩師尾川昭三先生のご冥福をお祈り申し上げます。



2008年、新聞掲載写真



1984年、師匠を囲んで

## シンポジウム:「温故知新: 生殖工学の現状と将来」

### 講演 IV

#### 長鎖脂肪酸によるマウス精子の運動性調節メカニズム

森山 隆太郎 (近畿大学生命科学科)

多くの動物において精巣内精子は運動能をもたない。精子は精巣より排精され、精巣上体頭部から尾部に移動する過程で運動能を獲得し、その後、精漿に含まれる成分によりその運動性は亢進する。この精子の運動能獲得や運動性調節には脂質が重要な役割を担っていると考えられている。しかし、脂質分子の多様性や代謝の複雑さから、そのメカニズムの詳細は未だ明らかとされていない。我々は脂質の中でも長鎖脂肪酸に着目し、研究を進めている。今回はマウス精子におけるこれまでの研究結果を報告する。

G-protein-coupled receptor 120 (GPR120) は長鎖脂肪酸をリガンドとする G タンパク共役型受容体である。網羅的 RT-PCR の結果、マウス精巣に GPR120 mRNA 発現が観察されたことから、そのタンパク質の局在を調べたところ、精子の頭部と尾部に局在していることを見出した。さらに精巣上体精子の頭部と尾部でも GPR120 タンパク質発現が観察された。GPR120 が精子尾部に局在していること、ならびに精巣上体精子でも GPR120 が発現していることから、GPR120 は精子において運動性調節に関与していると考え、次に、精巣上体より摘出した精子を長鎖脂肪酸に暴露する実験を行った。その結果、オレイン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、GPR120 アゴニストである GW9508 暴露により前進運動する精子の移動速度亢進と前進運動率の向上が誘起され、GPR120 アンタゴニストである AH7614 によりこの移動速度の亢進は阻害された。また、この精子の運動性調節に関与する GPR120 下流のシグナル伝達経路を調べたところ、GW9508 暴露により Akt の 308 番目の threonine と Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の 1 つである p38 でリン酸化が観察された。

さらに、凍結融解精子の運動性における長鎖脂肪酸の役割を検討するため、オレイン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、DHA、GW9508 を加えた凍結保存液で凍結した精子を融解して精子の前進運動率を測定した結果、オレイン酸と DHA 添加群において精子の前進運動率が向上した。しかし、移動速度の亢進は観察出来なかった。

これらのことから、不飽和脂肪酸は GPR120 を介して phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) /AKT ならびに p38 MAPK 経路を活性化し、精子の運動性を亢進すること、さらに一部の不飽和脂肪酸は細胞内に取り込まれ、精子の前進運動率を向上させることが示唆された。



## シンポジウム:「温故知新: 生殖工学の現状と将来」

### 講演 V

#### 「ラット凍結保存精子からの産子作出法の温故知新」

柏崎 直巳 (麻布大学獣医学部 動物繁殖学研究室)

ラット精子凍結保存は遺伝資源保存法として重要であるばかりでなく、比較生殖科学的にもたいへん興味深い。

ラット精巣上体尾部を細切して回収した精子を遠心分離処置せずに卵黄・ラクトース液でプラスチックストローに封入して、凍結保存すると、融解後に運動性を示す精子を得ることができる (Nakatsukasa *et al.*, 2001)。この融解精子を子宮角の中央部に注入(人工授精)することにより産子を作製することができる (Nakatsukasa *et al.*, 2003)。また、融解精子を IBMX にて前培養して受精能獲得を誘起し、体外受精・胚移植することにより、効率的に産子を作製できる (Seita *et al.*, 2009)。さらに、ラット凍結精子を超音波処理して精子の頭部と尾部を分離し、Triton-X や lysolecithin による精子先体除去処置を施してから、卵細胞質へこの精子頭部を顕微注入すると無処置の対照区よりも前核形成率が改善し、産子への生産効率も改善する (Seita *et al.*, 2009)。

ラット精巣上体尾部精子は、凍結融解処置により、その運動能・受精能獲得能などの性質が変わる。

Japan Society for Reproduction Engineering  
日本生殖工学会 **SRE**