

平成28年9月

中村和臣 学位論文審査要旨

主査 竹内 隆
副主査 難波 栄二
同 久郷 裕之

主論文

The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development

(修正KSOM培養培地へのアミノ酸およびタウリンの補給がラット胚の発生に及ぼす効果)

(著者：中村和臣、森本佳世子、島かおる、吉村祐貴、香月康宏、鈴木治、松田潤一郎、大林徹也)

平成28年 Theriogenology 86巻 2083頁～2090頁

参考論文

1. Mouse embryonic stem cells with a multi-integrase mouse artificial chromosome for transchromosomal mouse generation

(トランスクロモソミックマウス作製に向けたマルチインテグレースマウス人工染色体を保持するマウスES細胞)

(著者：吉村祐貴、中村和臣、遠藤猛、梶谷尚世、香月加奈子、香月康宏、久郷裕之、押村光雄、大林徹也)

平成27年 Transgenic Research 24巻 717頁～727頁

2. Exploring new gene integration sites for gene knock-in by gene-trapping strategy

(遺伝子トラップ法による遺伝子ノックインのための新規遺伝子導入領域の探索)

(著者：南地勇、吉村祐貴、中村和臣、真砂有作、大林徹也、奥田智彦)

平成27年 Transgenic Research 24巻 549頁～559頁

3. Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages

(胎生および生後期間のマウス心臓における細胞周期制御)

(著者：池西愛子、岡山仁美、岩本典子、吉留賢、田根将志、中村和臣、大林徹也、林利憲、竹内隆)

平成24年 Development, Growth & Differentiation 54巻 731頁～738頁

学 位 論 文 要 旨

The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development

(修正KSOM培養培地へのアミノ酸およびタウリンの補給がラット胚の発生に及ぼす効果)

実験動物としてのラットは、様々な疾患の研究などに広く利用されている。特に近年、遺伝子改変ラットの作製が増えている。遺伝子改変ラットの作製には発生工学的な技術が必須であるが、ラットの発生工学技術はマウスほど完成されていない。理由の一つとして、ラットにおいては、初期胚の体外培養技術が乏しいことが挙げられる。そこで、ラットの初期胚を効率的に培養するための培養システムを構築することを目的として、既存の培地であるKSOMの組成を改変し、さらにアミノ酸を添加することにより、新たなラット初期胚の培養法を開発した。

方 法

ラットの卵管液を採取し、液体クロマトグラフィーにより、卵管内のアミノ酸濃度を測定した。この卵管内アミノ酸濃度をもとに既存培地であるKSOMにアミノ酸を添加し、ラットの着床前胚の体外発生を観察した。同時に、胚の発生阻害を及ぼすと考えられるリン酸、およびフェノールレッドのラット初期胚発生への影響を観察した。また、アミノ酸の代謝産物であるアンモニウム等の除去効果を目的に、培地交換操作が胚発生に及ぼす影響を観察した。さらに、これらの体外発生したラット着床前胚を子宮に戻し、出生率を観察した。

結 果

ラットの卵管液では、タウリン、グリシン、グルタミン酸、アラニンが高濃度であった。最も高濃度であったのは、タウリンであった。フェノールレッドおよびリン酸をKSOM培地から除去することにより、ラット胚の体外発生阻害は解除され、ラットの受精卵は1細胞期から胚盤胞期まで体外発生した。加えて、24時間毎の培地交換を行うことにより、胚の発生は促進された。卵管内で高濃度であった3つのアミノ酸とタウリンを培地に添加することにより、濃度依存的にラットの着床前胚は発生が促進された。これらの体外発生したラット着床前胚を子宮に戻し、健康な産仔が得られることを確認した。

考 察

ラットの卵管内のアミノ酸濃度プロファイルは、他の多くの哺乳類と類似していた。また、ラットの血液におけるアミノ酸濃度プロファイルとは異なり、単に血液中のアミノ酸濃度を反映しているわけではなく、卵管の特徴的なアミノ酸濃度プロファイルであると考えられる。リン酸がラット初期胚の発生を阻害するということはすでに報告されており、本研究結果はこれと一致する。フェノールレッドの発生阻害効果については、フェノールレッドの持つエストロゲン様作用が関与しているという報告があり、このことが本研究結果に関連している可能性が考えられるが、詳しい機序は本研究結果からはわからない。アンモニウムは、マウスの着床前胚において有害効果を持つことが知られている。定期的な培地交換により着床前胚の発生が改善されたことは、培地交換により培地中のアミノ酸が分解されて生じたアンモニウム等の老廃物が除去されたことによるものではないかと考えられる。卵管内で高濃度であるタウリンと3つのアミノ酸によって、ラットの着床前胚の体外発生が促進されたことについては、その詳しい機序は本研究結果からはわからないが、アミノ酸が胚の浸透圧調整やpH調節、胚のエネルギー源となることなどが報告されており、これらのことが本研究結果に関連していることが考えられる。本研究で開発した新たなラット胚培養法では、健康な新生児が得られることを確認しており、疾患モデルラットの開発だけでなく、妊娠初期の母体の低酸素症や低体温症が新生児に及ぼす影響などといった生理学的研究分野への応用も期待できる。

結 論

ラットの卵管液におけるアミノ酸とタウリンの濃度プロファイルを明らかにした。KSOM培地から、リン酸およびフェノールレッドを除去することにより、ラットの着床前胚の体外発生阻害を解除することが可能である。さらに、この修正KSOM培地に卵管内で高濃度であるタウリンと3つのアミノ酸を添加することにより、ラットの着床前胚の発生効率を向上させることが可能である。ただし、この効果を得るためには定期的な培地交換が必要であり、このことは、ラット胚の培地を開発する上で、栄養という点だけでなく、老廃物の排除という点も考慮する必要があることを示唆している。