

様式4（公表用）

氏名	菊池 康之
博士の専攻分野の名称	博士（生命工学）
学位記番号	医工農甲 第151号
学位授与年月日	令和6年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	マウス着床前胚の新規密閉培養法の開発と ライブセルイメージング技術への応用
論文審査委員	主査 教授 若山 照彦 教授 岸上 哲士 教授 幸田 尚 教授 永松 剛 助教 若山 清香 准教授 石内 崇士

学位論文内容の要旨

哺乳類は胎生であるため体内で受精卵の発生が進み、着床することで胎児と胎盤へ発育し、現在の技術では多くの動物種で体外受精、着床前の段階である胚盤胞までの体外培養を行うことができる。ほとんどの動物種での体外培養では胎内環境を模倣するために CO₂ インキュベーターを用いて気相を CO₂ : 5%、温度 : 37°C に整えている。培養培地のドロップを作製しオイルで覆ったディッシュを CO₂ インキュベーター内に入れる開放系での培養によりヒトや実験動物の胚培養を高効率に培養することができ、ライブセルイメージングなどの解析も可能となってきた。しかしながら CO₂ 供給によるランニングコストや機器自体の価格が高いこと、培養中に故障や停電が起きてしまうことで培養中の胚発生が停止してしまうことが懸念される。

第1章では CO₂ インキュベーターを用いず低コストで胚の培養が可能な培養系の開発を試みた。培地中の CO₂ 分圧を CO₂ インキュベーターで平衡化させることで胚の培養に最適な CO₂ 分圧に調整し、密閉容器内で胚とともに封入することで CO₂ の供給が不要な胚培養法の開発が可能と考えた。マウス着床前胚の培養で使用される CZB 培地の CO₂ インキュベーター内の CO₂ 分圧を測定したところ、24 h の静置により平衡化することを確認した。こ

様式 4 (公表用)

の培地を CO₂最適化培地 (Optimized CO₂ Containing; OptC 培地)とした。OptC 培地と ICR 系統体外受精一細胞期胚をアシストチューブ内に入れ密閉し 37°C の恒温槽内で培養を行ったところ CO₂ インキュベーターを用いた従来法での胚盤胞率と有意差がない高効率での培養が可能であることが確認できた。また、その胚盤胞を解析するために細胞数や胚移植した際の産仔率を確認したところ、それぞれ従来法での培養と同等のクオリティであることも確認した。さらにここまでの方法では OptC 培地の作製のために CO₂ インキュベーターを使用する必要があったため、炭酸ガス発生剤であるアネロパウチでの作製を試みたところ、3 h の処理で OptC 培地を作製することができ、同様に密閉系での培養も可能であることがわかった。本章では従来の胚培養法より必要な機器やランニングコストが低い新規胚培養法であり、これまで不可能だった国際宇宙ステーションでマウス初期胚を培養する世界初の研究にもこの技術が用いられた。そこで本培養法を Optimized CO₂ Pressure and Sealed tube culture method (Ops 培養法)と命名し密閉系であることを利用した応用を以下の章で試みた。

第 2 章では Ops 培養法の実用性の証明を試みた。実験動物の輸送は安全面や生体へのストレスから倦厭されるため受精卵の状態で輸送されることが多い。しかし胚輸送のためには液体窒素を用いた凍結保存した胚が使用される。それによりドライシッパーという特殊で高価な輸送機器を必要とする上、技術的に困難である凍結融解を伴う手段となっている。本章ではコストや技術を必要としない培養を伴う非凍結の胚輸送方法の確立を試みた。Ops 培養法は培養温度さえ保つことができれば培養が可能であるため、保温力の高い登山用水筒内での短期間の胚培養及び胚輸送が可能であると考えた。一細胞期胚を水筒内で培養したところ 24 h 培養で二細胞期胚を得られ、追加の従来法での培養により従来法と同率の胚盤胞を得ることができたが、48 h 培養では全ての胚は二細胞期で発生が停止しており、追加の培養では多くの胚が桑実胚で発生が停止した。しかし二細胞期胚を水筒内で培養したところ 48 h 培養するとほとんどの胚が桑実胚に発生し、追加の培養により胚盤胞へ発生した。さらに二細胞期から 48 h 培養を行って発生した胚盤胞を子宮に移植した際の産仔率は従来法での産仔率との有意差はなく実用可能であることが明らかになった。最後に実用性を検証するため山梨県甲府市から茨城県つくば市への輸送を行ったところ、同様に培養可能であることを確認した。これらの結果から登山用水筒を保温機器として 2 日間までの培養が可能であり、簡易で安価な胚輸送を確立することができた。

第 3 章では Ops 培養法を用いた簡易な受精卵のライブセルイメージング技術の確立を試みた。Ops 培養法ではプラスチックチューブを密閉し培養を行っていたため培養中の胚の観察が不可能であった。そこでガラスキャピラリー内に OptC 培地と胚を封入し両端を封す

様式 4 (公表用)

ることで培養かつ観察が可能となりライブセルイメージングに供することが可能であると考えた。一細胞期胚の入ったガラスキャピラリーを恒温槽またはサーモプレートで加温し培養することで、ほとんど胚が胚盤胞まで発生し、サーモプレート上で培養した胚盤胞を胚移植すると健康な産仔を得ることができた。次に、ガラスキャピラリーおよび一般的なカメラを備えた実体顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより、胚の発生を 5 日間まで観察することを試みた。その結果、本法は胚の胚盤胞までの発育速度や品質に影響を与えないことが確認された。さらに蛍光倒立顕微鏡を用いて同様にイメージングを行ったところ明視野と蛍光写真を両方撮影し、正常に培養可能であることも確認することができた。ライブセルイメージングを行うためには従来高額な機器を必要とし数少ない機器を用い週に 1 度しか行うことができなかったが、本法は複数の実体顕微鏡があれば同時に行うことも可能であるため多数の胚の解析が必要である発生速度の解析に非常に有効である。

本研究により CO₂ インキュベーターを用いない実用的な胚培養法を新たな選択肢として提供し胚輸送およびライブセルイメージングをより簡便に使用できることを明らかにした。これらの技術は発生工学という生物学の基盤となる技術を多くの研究者に使用可能であり生物学全体の発展に貢献可能な技術であると考えられるさらに発生学において未だ研究が後進している宇宙空間での基礎研究を究めるために必要不可欠な培養技術となり、人類の宇宙進出への足がかりとなることが期待できる。

論文審査結果の要旨

統合応用生命科学専攻及び同専攻生命工学コースの審査内規に基づき、最終試験を実施した。主査は若山照彦、委員は岸上哲士、幸田尚、永松剛、若山清香、石内崇士の合計6名である。審査委員からは、おもに本研究の意義、研究の問題点、および未解決問題の対策などを詳しく聞かれた。

研究内容は、マウスの受精卵を、通常はCO₂インキュベーターで培養しなければならないのだが、宇宙ステーションなどの特殊な環境下でも培養できる技術の開発を目指し、さらにその応用としていくつかの画期的な方法を開発した。本論文は3つの章からなる。第1章では、CO₂インキュベーターを使わないで培養するために、それを可能にする特殊な培養液を開発した。この培養液を使うことで、受精卵をどんなところでも培養することが可能になった。この章で開発した技術により、宇宙ステーションで受精卵を培養する装置の開発が可能になった。この宇宙ステーションでの実験により、哺乳類の受精卵は微小重力下でも発生が可能であることが初めて証明された。第2章では、1章で開発した培養技術を応用して、受精卵の輸送方法を劇的に改善した。通常、受精卵を輸送するためには、高度な技術を用いて受精卵を凍結し、液体窒素を用いた特殊容器で受精卵を凍結した状態で運ぶため、たとえ1個しか受精卵を運ばない場合でも数十万円もの運搬費がかかる。ところが彼の開発した技術を用いると、市販の水筒に入れて生きたまま運べるため、わずか数千円程度で受精卵の輸送が可能になる。実際に本人が筑波に出張した際に受精卵を水筒に入れ一緒に運んだ時の実験では、その後多数の産仔を作ることになった。第3章では1章の技術をさらに応用し、1台数千万円もするライブセルイメージングの機械を使わずに、どんな研究室でも簡単かつ低コストで受精卵のライブセルイメージを可能にした。これらの技術開発には彼の発想力と実行力が不可欠だったと思われる。

博士論文には、様々な試行錯誤や、結果として失敗しあきらめた方法などは載せていないが、それでもかなりのデータが記載されている。図表や論文の引用も多く、非常に有益な論文に仕上がっている。公聴会での発表では、本研究の背景や問題点を多数の論文を正しく引用しながら的確に説明することが出来た。委員が様々な質問しても、研究手法の原理や手順、結果の解釈方法など一般的な質問に対しては、すぐに正しい回答をできたことから、自分の博士論文の価値や今後の活用方法について十分勉強していることが明白だった。また彼は幅広い科学知識を有しており、研究者としての素質が感じら

様式4（公表用）

れた。彼は宇宙関係の研究支援部門に就職する予定だが、どの分野の研究でも確実に支援できると思われる。

博士論文に記載した第1章と2章で1つ目の論文を、第3章で2つ目の論文を第一著者として発表した。いずれも比較的レベルの高い雑誌に掲載されている。また、彼の技術力およびデータの正確性は他の研究者たちも認めるところであり、共同研究の依頼が多数あった。所属研究室で実施している大規模プロジェクトでは中心的な役割を果たし、多大な貢献をした。その一部は共著として一流誌などに合計6本の論文として発表されている（Wakayama S. et al., *iScience* 2023 (IF6.1); Ooga et al., *BBRC* 2023 (IF3.1); Sakamoto et al., *Development* 2022 (IF6.9); Wakayama S. et al., *Plos One* 2022 (IF3.7); Wakayama S. et al., *Science Advances* 2021 (IF15); Hirose et al., *Reproduction* 2020 (IF3.9)）。他の研究者に頼りにされる能力を有する点も、研究者になるための重要な要素である。

以上、博士論文の内容の検討および公聴会の質疑応答を通して、本論文提出者は、基礎的および専門的な知識を十分有し博士号取得の条件を見たいしていると判断し、最終試験は合格と判定した。