

氏名	高島友弥
学位(専攻分野の名称)	博士(バイオサイエンス)
学位記番号	甲第841号
学位授与の日付	令和3年9月30日
学位論文題目	体外成長・体外成熟卵母細胞における発生支持能制御因子に関する研究
論文審査委員	主査 教授・博士(農学) 小川英彦 教 授・博士(畜産学) 尾畑やよい 教 授・博士(医学) 中澤敬信

論文内容の要旨

【背景・目的】

【背景および目的】

生殖細胞は、種の維持に不可欠な細胞である。雌の生殖細胞である卵子は、ゲノム情報、エピゲノム情報、ミトコンドリアなどの細胞小器官、および mRNA・タンパク質などの母性因子を次世代(胚)に継承する役目を担う。卵母細胞はその成長過程で、卵子として機能するための能力を獲得していく。卵母細胞/卵胞の体外成長培養 (*in vitro growth*; IVG) は卵母細胞成長過程を体外で再現し、発生能を持たない成長期卵母細胞から機能的な卵子の作出を可能とする。卵巣から成長途上の卵母細胞を含む二次卵胞を採取し、12-14 日間の IVG によって得られた卵母細胞は、*in vivo* で成長を完了させた卵核胞 (Germinal vesicle; GV) 期卵母細胞と同等に第二減数分裂中 (Metaphase in the second meiosis; MII) 期まで成熟する能力を有する。しかし、IVG 卵母細胞に由来する受精卵の個体発生率は 21-24% と *in vivo* 由来受精卵の発生率 59%と比較して低いのが現状である。このことから、現行の IVG 由来卵母細胞の多くは、生殖に寄与する能力を有する完全な卵子とは異質の不完全なものであることが示唆されている。これまでの研究で、培養時の酸素濃度が IVG 卵母細胞の成熟・受精後の発生能に影響しうるということが報告されてきたが、卵母細胞内のどのような変化が発生能向上に寄与したのかは不明である。IVG 卵母細胞の不完全性を理解することは、*in vivo* において機能的な卵子がどのように形成されるのか、その過程の理解につながる。また、卵巣内の卵母細胞を生殖資源として効率的に利用するためには、至適 IVG 条件の検討が必要と考えられる。

そこで当研究では、マウス二次卵胞の IVG における至適酸素濃度を検討すると共に、IVG 卵母細胞の発生能を説明しうる機構の理解を目的とし、ミトコンドリア動態の解析とシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) による遺伝子発現解析を実施した。

1. IVG 至適酸素濃度の決定とミトコンドリア異常

1-1. IVG における至適酸素濃度の決定

出生後 10 日齢のマウス卵巣より単離した二次卵胞をコラーゲンコートメンブレン上で、2%ポリビニルピロリドン、5%ウシ胎子血清および 0.1 IU/ml 卵胞刺激ホルモン添加 α MEM 中で 12 日間の IVG を実施し、IVG 卵母細胞を作出した。通常酸素条件 (20%) に加え 5, 7 および 10%酸素条件で IVG を実施した。IVG 卵母細胞の体外成熟培養および体外受精により得られた受精卵を KSOM+AA 中で 5 日間培養し、胚盤胞期胚までの発生能を比較した。20%群と比較し、5%群および 7%群では MII 期までの成熟能が低下した一方で ($p<0.01$)、5%群および 7%群では受精後の発生能が顕著に上昇した ($p<0.01$)。胚作出効率 (成熟率 \times 発生率) は酸素濃度 20%群で 56%であるのに対して酸素濃度 7%群で 70%と最も高く、今回の試験群において IVG の至適酸素濃度は 7%であることが示された。

1-2. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア動態の解析

至適酸素条件 7%群および通常条件 20%群、そして *in vivo* 群のミトコンドリア動態を卵母細胞成長が完了した GV 期卵母細胞および第二減数分裂中期まで成熟した MII 期卵子で解析した。まずはミトコンドリア特異的蛍光プローブ MitoTracker を用い、細胞内領域ごとの相対輝度値をもとにした局在パターンを解析した。その結果、GV 期卵母細胞において *in vivo* 群では卵胞核周辺にミトコンドリアが局在する一方で、20%IVG 群で卵核周縁部への異常な凝集、ならびに 7%IVG 群で細胞膜周縁部への脱局在を示す卵母細胞が顕著に多かった。正常なミトコンドリア局在を示した卵母細胞は *in vivo* 群の 62%と比較して 20%IVG 群で 36%および 7%IVG 群で 27%と低下した。MII 期卵子においてもこれらの異常局在は回復せず、IVG 群双方でミトコンドリアは核周辺部へ異常凝集した。

次に JC-1 プローブによるミトコンドリア膜電位を解析した。その結果、GV 期卵母細胞において *in vivo* 群と比べ 20%IVG 群 ($p<0.05$) および 7%IVG 群 ($p<0.05$) における膜電位の低下が見られ、また 20%IVG 群では 7%IVG 群と比較してさらに有意な低下が認められた ($p<0.05$)。また MII 期においても同様の傾向を示した。

ミトコンドリアの量的な動態を明らかにするため、qPCR によるミトコンドリア DNA コピー数の定量解析を実施した。IVG 前の成長期卵母細胞では 23.1×10^4 コピーのミトコンドリア DNA が含まれていた。このコピー数は、*in vivo* 群では GV 期までに 3.0 倍、さらに MII 期までに 1.2 倍増加し、最終的に成熟卵子あたり 82.4×10^4 コピーが含まれていた。一方で GV 期において 20%IVG 群は 49.0×10^4 コピー ($p<0.05$) ならびに 7%IVG 群は 44.1×10^4 コピー ($p<0.05$) と *in vivo* 群と比較し、ミトコンドリア DNA コピー数は顕著に低下した。また MII 期においても 20%IVG 群で 33.4×10^4 コピー ($p<0.05$) ならびに 7%IVG 群で 22.1×10^4 コピー ($p<0.05$) と *in vivo* 群と比較して有意に低く、双方で卵子成熟に伴って大幅にミトコンドリア DNA コピー数が減少した。

以上より 7%IVG 群では 20%IVG 群と比較して卵母細胞のミトコンドリア膜電位の低下が改善されることが明らかとなった。その一方で、IVG 卵母細胞では *in vivo* 由来卵母細胞と比較して、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア DNA コピー数の低下およびミトコンドリア局在の異常が共通して観察された。

1-3. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア機能の解析

IVG 卵母細胞、特に 20%IVG 群においては、ミトコンドリア膜電位の低下に伴った ATP 量低下や ROS 量増加が考えられた。そこでまず酸化ストレス感受性蛍光プローブ CellROX プローブを用いて ROS の相対定量解析を実施した。その結果、予想に反して 7%IVG 群における有意な ROS の増加が見られ ($p<0.05$)、その一方で、20%IVG 群は *in vivo* 群と同程度の ROS 量を示した。これは MII 期卵子においても同様だった。

次にルシフェラーゼを用いた ATP 定量解析を実施した。IVG 前の成長期卵母細胞では平均して 0.39 pmol の ATP が含まれたが、*in vivo* で成長を完了した GV 期卵母細胞では 0.46 pmol の ATP が含まれていた。しかし、成熟終了後の MII 期卵子において ATP 量は 0.30 pmol まで低下した。一方、IVG 卵母細胞では予想に反し、GV 期卵母細胞において 20%IVG 群で 0.57 pmol ($p<0.05$) ならびに 7%IVG 群で 0.65 pmol ($p<0.05$) と *in vivo* 群よりも顕著な ATP 量の増加が見られた。しかしながら MII 期卵子では IVG 群の ATP 量は *in vivo* 群と同程度まで低下し、有意な差も認められなくなった。

以上の結果より IVG 群におけるミトコンドリア膜電位の著しい低下は ROS 量の増加や ATP 量の低下を伴わないことが分かった。これは IVG 卵母細胞由来胚の発生能低下が、ROS や ATP に代表されるミトコンドリア異常の二次的な影響ではなく、異常な卵子ミトコンドリアが母性ミトコンドリアとして次世代に継承され、胚発生期間においてミトコンドリア機能低下が顕在化するという直接的な影響によるものと考えられた。一方、GV 期の IVG 卵母細胞は *in vivo* 由来の卵母細胞と比較して大量の ATP を含有するにも関わらず、成熟後、MII 期ではこの量的差が無くなった。これまでに卵母細胞の成熟過程では、卵母細胞内で ATP 生産および消費が起きることが報告されており、IVG 卵母細胞ではミトコンドリア機能低下によって卵子成熟における ATP 生産が消費に追い付かなかったものと考えられた。

2. 母性ミトコンドリアが発生能に与える影響

IVG 卵母細胞の異常なミトコンドリア特性が母性ミトコンドリアとして胚へ継承され、胚発生能低下を誘起することが考えられた。そこで IVG 卵母細胞に由来する 2 細胞期胚のミトコンドリア動態を解析した。*in vivo* 由来 MII 期卵子の体外受精により得られた *in vivo* 胚および 7%IVG に由来する *in vitro* 胚の 2 細胞期におけるミトコンドリア膜電位の解析およびミトコンドリア相対定量解析を実施した。その結果、GV 期卵母細胞や MII 期卵子同様に *in vivo* 胚と比較して、*in vitro* 胚でミトコンドリア膜電位 ($p<0.05$) およびミトコンド

リア量 ($p<0.05$) の有意な低下が認められた。これは IVG 卵母細胞における異常なミトコンドリア特性が受精を介して消去されず、初期胚へ継承されたことを示唆した。次に、ミトコンドリア量解析後の 2 細胞期胚の発生能を追跡し、母性ミトコンドリア量が胚発生に与える影響を解析した。その結果、胚盤胞期胚まで到達した胚はミトコンドリアを多く含有する傾向にあり、また 2 細胞期胚で発生停止を示した胚は胚盤胞期胚まで到達した胚に比べてミトコンドリア含有量が有意に少ないことが分かった ($p<0.01$)。さらに、胚盤胞期および桑実胚期まで到達した胚をミトコンドリア量の多寡から 2 群に分別し、胚の移植実験を通してミトコンドリア量が個体発生能に与える影響を解析した。その結果、個体発生能に差は見られなかったものの、ミトコンドリアを多く含有する群において着床率は有意に向上した ($p<0.05$)。以上の結果から、卵母細胞におけるミトコンドリアの正常性は、胚のミトコンドリア正常性に影響を与え、また母性ミトコンドリア量の発生能への影響しうることを示され、*in vitro* 胚の低発生能の一因が母性ミトコンドリア異常であることが示唆された。

3. 卵母細胞の発生能に寄与しうる分子経路の同定

3-1. 大規模遺伝子発現プロファイルの解析

各群の卵母細胞が有する遺伝子発現プロファイルを解析した。QIAseq を用いて 5, 7, 10 および 20%酸素濃度で培養した GV 期の IVG 卵母細胞、そして *in vivo* 由来卵母細胞の scRNA-seq を実施し、遺伝子発現プロファイルを取得した。主成分分析の結果、主集団から外れた位置にプロットされる亜集団を同定した。卵母細胞成長過程における高発現遺伝子の一部に PC1 (94.1%) への強い寄与が見られ、またこれらの遺伝子の亜集団内における遺伝子発現傾向が一様でなかったことから亜集団に属する卵母細胞は、正常な卵母細胞成長から外れた卵母細胞集団であることが考えられた。これらの亜集団を除去後、再度、主成分分析を行った結果、20%、10%、7%および 5%と培養酸素濃度の低下に伴って *in vivo* 群に近づいていくようにプロットされた。5%群は主集団において最も *in vivo* 群に近い遺伝子発現プロファイルを示したのにも関わらず、多くの 5%群卵母細胞 ($n=8/24$) が亜集団に属しており、成熟率は低い一方で、成熟を完了できた卵子が高い発生率を示す 5%群の卵子の特性と符合した。

3-2. 20%酸素条件で得られた IVG 卵母細胞に特異的な異常発現遺伝子の解析

20%酸素条件で得られた IVG 卵母細胞と比較し、7%群酸素条件で得られた IVG 卵母細胞がより高い発生能を有していたことから、この胚発生能改善に寄与する分子生物学的機序の解明を目的に、通常条件 20%群および至適酸素条件 7%群のそれぞれと *in vivo* 由来卵母細胞群における発現変動遺伝子を解析した。DESeq2 を用いた ward 検定により抽出した各群間の発現変動遺伝子のうち 20%群特異的に異常発現を示した 2,555 遺伝子を抽出した ($\text{padj}<0.05$)。これらの遺伝子は 20%群で発現異常を示し、7%群では発現改善することか

ら発生能改善に關与する分子生物学的経路の濃縮が期待された。エンリッチメント解析の結果、「Cell cycle」や「Regulation of translation」など卵子成長過程における生物学的イベントに符合する GO term, KEGG pathway が多く濃縮された他、「Apoptotic process」および「Sphingolipid signal pathway」も併せて濃縮された ($q < 0.05$)。スフィンゴ脂質代謝経路は、細胞膜成分であるスフィンゴミエリンを代謝し、また脂質メディエーターとして細胞死を誘起するセラミドならびに細胞生存を促すスフィンゴシンーリン酸を代謝する経路として知られる。また、スフィンゴ脂質代謝はスフィンゴ脂質を新規合成する *de novo* 経路とセラミド・スフィンゴシンーリン酸を相互変換し、細胞死を制御する *salvage* 経路の二つの経路からなりセラミド合成が亢進された場合、アポトーシスが誘起され、ミトコンドリア損傷が生じる。濃縮されたスフィンゴ脂質代謝遺伝子の発現傾向に着目したところ、*de novo* 経路、*salvage* 経路双方でセラミド合成の異常亢進が示唆された。LC-MS 解析により卵母細胞内のセラミド (d18:1/16:0) を定量した結果、*in vivo* 群に対し、20%群で 1.9 倍の顕著なセラミド量の増加が示された ($p < 0.05$) その一方で、7%群では 1.3 倍程度と有意な変化は見られず、スフィンゴ脂質代謝遺伝子の発現変動パターンに符合した。またこのセラミド含有量の変化は、GV 期卵母細胞におけるミトコンドリア膜電位の変化と強い逆相関を示し、20%群におけるセラミド蓄積量の増加に伴ったミトコンドリア損傷が強く示唆された。一方、ミトコンドリアゲノムの複製・転写を促進する *Tfam* やミトコンドリアの融合および分裂に働く *Mfn1* および *Drp1* など、ミトコンドリア制御遺伝子に着目すると、3 群間において発現変動は見られたが発生能改善やミトコンドリア機能を説明しうる分子経路は同定できなかった。

3-3. 正常な卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを導くマスター遺伝子の推定

次に、*in vivo* 由来卵母細胞と比較して 20%あるいは 7%の酸素濃度によらず IVG 由来卵母細胞で共通して発現変動する 1,831 遺伝子に着目した。これらのうち 714 遺伝子は IVG 卵母細胞で共通して発現上昇し、489 遺伝子が発現低下を示した。エンリッチメント解析の結果、発現低下遺伝子中に「Regulation of transcription, DNA-templated」の濃縮が見られた。このことから IVG 群における遺伝子発現プロファイルの不完全性は、転写関連遺伝子に起因すると考え、発現低下を示した転写関連遺伝子 56 遺伝子を正常な卵母細胞遺伝子発現プロファイル導くマスター遺伝子の候補として抽出した。一方、20%群、7%群および *in vivo* 群の遺伝子発現プロファイルの階層的クラスタリング解析の結果、大部分の卵母細胞はそれぞれの群に従ったクラスタに属した。しかし一部の 7%群卵母細胞は *in vivo* 群クラスタに属していた。7%群におけるこれらの集団を *in vivo*-like (IVL) 群とし、通常の 7% (canonical) 群と区別した。これらと *in vivo* 群の遺伝子発現プロファイルを発現変動遺伝子解析に供試した。その結果、IVL 群 – canonical 群間で有意に発現が変動し、かつ、IVL 群 – *in vivo* 群間で変動を示さなかった 1,623 遺伝子に着目した ($\text{padj} < 0.05$)。ここで、IVG

卵母細胞で共通して発現低下を示した転写関連遺伝子、すなわち、正常な卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを導くマスター遺伝子の候補として抽出した 56 遺伝子が、この 1,623 遺伝子に含まれるか否かを調べた。その結果、IVL 群では 56 遺伝子中 10 遺伝子が *in vivo* 群の発現レベルにまで回復し、この 10 遺伝子には、卵母細胞成長期移行に必須な *Nobox* が含まれた。さらに、各卵母細胞間における遺伝子発現動態が *Nobox* に相関 ($r \geq 0.7$, $\log_2(\text{CPM}+1) > 6$) を示した 87 遺伝子を *Nobox* 下流候補遺伝子として抽出したところ、NOBOX による転写制御が報告されている *Gdf9* が含まれた。さらに、卵母細胞の成長、受精およびエピジェネティック修飾の確立にそれぞれ不可欠な *Kit*, *Zp2* および *Nlrp5* なども *Nobox* 下流候補遺伝子として抽出され、卵母細胞成長における *Nobox* の新しい機能的側面が示唆された。

【総合考察・総括】

本研究において、マウス二次卵胞の IVG には 7%酸素条件が至適であり、従来の 20%酸素条件よりも胚盤胞期への発生率が大幅に改善することが明らかになった。この 20%酸素条件における IVG 由来胚の発生能低下は、ミトコンドリア膜電位の顕著な低下が一因していると考えられた。また、このミトコンドリア膜電位の低下を伴う発生能の低下は、GV 期卵母細胞におけるスフィンゴ脂質代謝関連遺伝子の異常発現に起因する過剰なセラミドの蓄積が一因すると考えられた。卵母細胞の体外成熟培地にセラミドやセラミド合成の前駆物質となるパルミチン酸を添加すると得られた卵子の発生能が低下することが報告されている。また、*in vivo* では卵胞成長に伴い卵胞内の酸素分圧低下すること、暑熱ストレス下では卵子の発生能が低下する他、卵胞内の酸素分圧の低下が鈍化することが報告されている。そのため、卵母細胞成長過程では、ミトコンドリアインテグリティを維持するための機構として酸素濃度を能動的に制御している可能性が考えられた。一方、至適な 7%酸素条件で作出された IVG 由来胚においても、その発生能は *in vivo* 由来胚より顕著に低かった。IVG 卵母細胞の損傷した母性ミトコンドリアは初期胚に継承され、2 細胞期以降の発生能および着床までの発生能を低下させることが分かった。一方、*in vivo* 由来卵母細胞の遺伝子発現プロファイルと同様のプロファイルを獲得するためのマスター遺伝子として複数の転写関連因子を抽出し、中でも *Nobox* が、卵母細胞の成長期への移行のみならず発生能獲得に機能する遺伝子の発現を制御している可能性が新たに示唆された。本研究成果が、体外配偶子生産における高効率化、ならびに卵母細胞成長過程における胚発生能獲得機構の理解につながるものと期待したい。

審査報告概要

受精卵の全能性は、卵成長過程で卵内に蓄積される母性因子によってもたらされる。しかし、全能性の獲得機構の全容はいまだに明らかにされていない。卵成長過程を達成する培養系は、全能性獲得機構を解明するツールとして、あるいは有用動物の卵資源の増産に貢献しうる。しかし、体外培養で成長した卵の個体発生能は体内で成長した卵と比較して著しく低いのが現状である。本研究では、マウス成長期卵（二次卵胞）の至適培養条件を酸素分圧に着目して探査すると共に、酸素濃度に伴い変化する受精卵の発生能および母性因子を解析することで、卵の全能性獲得に影響しうる分子経路の解明を目指した。その結果、マウス二次卵胞を7%酸素条件で培養して得られる卵の発生能は、従来法の20%酸素条件より有意に改善されることが示された。また、20%から7%まで酸素条件を低下させることで、セラミド合成経路遺伝子群の過剰発現、過剰なセラミド蓄積、そしてそれに伴うミトコンドリア膜電位の低下という一連の異常が有意に軽減されることが示され、発生能改善を説明しうる一経路が明らかとなった。さらに、7%酸素条件で培養して得られる卵の一部は、体内の卵と同様の mRNA プロファイルを有することが示され、全能性獲得の遺伝子ネットワークのマスター遺伝子として、転写因子 *Nobox* が推定された。本研究では、体外成長卵の不完全性を通して、卵の全能性を理解するための情報が集約され、これらの知見は当該領域に資することが期待された。発表会では、研究意義、研究結果とそれに対する考察が十分に説明されており、審査員一同は高島友弥氏に博士（バイオサイエンス）の学位を授与するに相応しいと判断した。