

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06443

研究課題名（和文）マウス着床前胚時の細胞内攪乱が長期に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the long-term effects of intracellular disturbances during mouse preimplantation embryos

研究代表者

岸上 哲士（Kishigami, Satoshi）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10291064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の着床前胚の体外培養技術は、ヒトの不妊治療や発生工学技術に不可欠である。近年、胚の栄養環境がその後の発生率や産子率に影響するだけでなく、胎児や胎盤の発達、さらに成体において生活習慣病などの疾患リスクに結びつくことが示唆されているが、その全体像や詳細な機構は不明なままである。

本研究では、胚のグルコサミン経路、小胞体ストレス、alphaMEM培地による培養が胚および産子に及ぼす影響について明らかにした。特に、将来糖尿病を発症するalphaMEM培養液の培養では細胞小器官の一つである核小体の形態異常を見出し、胚の栄養環境等の攪乱により核小体の形成不全が長期に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の着床前胚の体外培養技術は、ヒトの不妊治療に加えて家畜および実験動物にも広く利用されている。しかし体内に比べて、体外培養により産子率が低下すること、産子や胎盤の発生に影響し、さらに成体においても糖代謝の異常など長期影響がみられるなど現在の体外培養技術の課題がある。本研究結果から、胚環境において糖などの栄養やストレスが発生率を低下させ、また核小体の攪乱を通じて長期影響のリスクに影響を及ぼす可能性が示唆された。今後これらの成果をもとに、発生低下および長期影響を克服した胚の発生に適した新規培養液の開発につながり、特にヒト不妊治療において大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In vitro culture technology of mammalian preimplantation embryos is essential for human infertility treatment and developmental engineering technology. In recent years, it has been suggested that the nutritional environment of the embryo not only affects the subsequent development rate and birth rate, but also the development of the fetus and placenta, as well as the risk of diseases such as lifestyle-related diseases in adults. The image and detailed mechanism remain unknown.

In this study, we clarified the effects of embryonic glucosamine pathway, endoplasmic reticulum stress, and culture in alphaMEM medium on embryos and offspring. In particular, malformation of the nucleolus, which is one of the organelles, was found in the culture of alphaMEM culture medium, which will develop diabetes in the future, suggested the possibility.

研究分野：発生工学分野

キーワード：発生工学 着床前胚の体外培養 着床前発生 長期影響 DOHaD

1. 研究開始当初の背景

現在日本では、生活習慣病が大きな問題になっており、日本国内の糖尿病が強く疑われる成人が推計で1千万人に上り、今後さらに生活習慣病の罹患者数は増大すると危惧されている。一方、最近の研究から、**生命の始まりである胚や胎児期の望ましくない栄養環境が出生児の体重およびその後成体における疾患の発症リスクと結びついている**ことが疫学調査や動物実験により明らかになり、その現象はDOHaD (Developmental Origins of Health and Disease)とよばれている。これは、悪い環境条件で胚や胎児が生き抜くために代謝等のプログラム変更を余儀なくされた結果、トレードオフとして疾患のリスクが高くなると理解されている。たとえば、低出生体重児と明確な関連がある疾患として高血圧、冠動脈疾患、II型糖尿病、脳梗塞、脂質代謝異常、血液凝固能の亢進が知られており、さらに関連が疑われる疾患はうつ病、統合失調症、がんなどのリスクが挙げられる。このように胎児の過栄養や栄養飢餓の経験は、将来にわたり神経内分泌システムや代謝に影響を与え続け、最終的に成人の高い疾病率を引き起こすと考えられている。しかし、**将来疾患を引き起こす胚や胎児期の栄養等の環境要因およびそれにより引き起こされる細胞生理学的変化やそのプログラム変更機構の詳細については知見が不十分であり、その解明は喫緊の課題である**。このような機構の理解が進めば、妊娠期の母体の食事の改良や不妊治療におけるより安全な培養液の開発により疾患リスクの低い産子を得ることができ、より健康で長寿命な社会への発展および医療費の大幅な削減が期待されるだけでなく、逆に疾患リスクを高めることで新規疾患モデル動物の作出が可能になるなど多くの波及効果が期待できる。

- (1) グルコースは一般に解糖系として代謝されるが、着床前胚においては主にヘキサミン合成経路を経てウリジン-2-リン酸-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)に代謝され、O-結合型-N-アセチルグルコサミン転移酵素転移酵素(OGT)を介して、転写因子を含むタンパク質にGlcNAc修飾と呼ばれる翻訳後修飾に利用される(図1)。マウス初期胚において、GlcNAc修飾が特に栄養外胚葉(TE)への発生・分化に重要であることが示唆されている。GlcNAc修飾は、環境のグルコース濃度に依存してこのGlcNAc修飾量が変化すが、その修飾の程度がどのような長期影響を及ぼすか不明である。

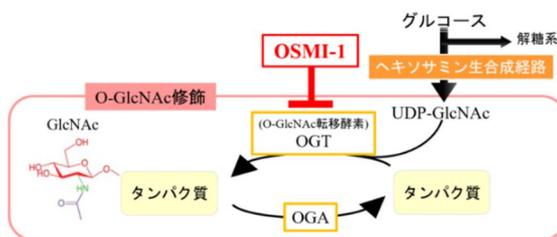


図1 グルコース代謝とGlcNAc修飾

- (2) 体外受精において受精胚の体外操作および培養は胚にさまざまな環境ストレス(温度変化、栄養成分、胚操作)を与えることが知られている(図2)。多くの環境ストレスは、細胞のタンパク質合成や折りたたみ、翻訳後修飾を行う能力に直接影響を与えるため、それらにより小胞体ストレスおよび小胞体ストレス応答(UPR)が誘導されることが明らかになりつつある。実際体外受精における体外での胚の操作および培養は胚に小胞体ストレスを誘導する一因と考えられており、小胞体ストレス緩和剤(化学シャペロン)として知られるタウロウルソデオキシコール酸(TUDCA)を培地に添加することで発生が向上することが報告されている。しかし着床前胚における個々のストレスがどのような長期影響の原因になっているのかはほとんど明らかになっていない。

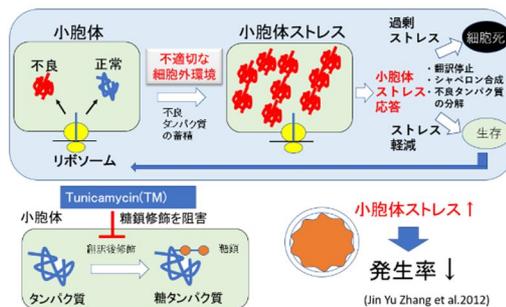


図2 TMによる小胞体ストレス誘導

- (3) 我々は、通常の胚の培養培地と比べてビタミンやアミノ酸などは栄養豊富だが低タンパク質であるMEM培地に体外で2細胞期から48時間暴露した胚は、出産後に肥満・糖尿病を呈することを明らかにし、これまでにない疾患モデルマウス(MEMマウス)の作成に成功している(特許第7169509号「糖尿病モデル動物の作出方法及び糖尿病モデル動物」)。さらに、MEMマウスは、炎症性サイトカインを高発現し、2型糖尿病合併症(脂肪肝炎、腎症)を発症することが明らかになっている。

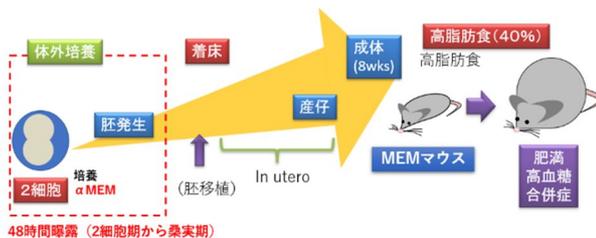


図3 胚環境操作による糖尿病モデルマウス(MEMマウス)

長期影響のメカニズムは不明のままである（図3）。

2. 研究の目的

哺乳類の着床前胚の体外培養技術は、ヒトの不妊治療や実験動物の発生工学技術に不可欠である。近年、体外および体内における胚の環境が発生率や産仔率に影響するだけでなく生活習慣病などの将来の疾患リスクに結びつくことが明らかになりつつあるが、その全体像や詳細な機構は不明なままである。胚環境が長期に及ぼす影響の仕組みが明らかになれば、ヒトにおける将来の疾患のリスクの低い健康な産子を得るための技術開発や逆に疾患リスクを極度に上げることによって疾患モデル動物の開発に発展することが期待される。そこで、本研究課題では特に着床前胚の代謝、エピジェネティクスおよび細胞内シグナルと生活習慣病との関連に着目し、着床前胚の細胞生理学的攪乱と将来個体の健康に及ぼす影響の関係について明らかにする。

- (1) 環境グルコース濃度に応答する GlcNAc 修飾に着目し、この GlcNAc 修飾量の変化が、どのような短期および長期影響を及ぼすかを明らかにするために、GlcNAc 修飾を触媒する OGT 酵素の阻害剤 OSMI-1 を様々な濃度で胚を処理し、初期胚発生や着床後の発生に与える影響を調べた。
- (2) 着床前胚における小胞体ストレスがどのような長期影響の原因になっているか明らかにするために、着床前胚発生において UPR を活性化させる小胞体ストレス誘導剤として広く使用されている Tunicamycin (TM) により一時的な小胞体ストレスを誘導して、胚の発生率およびその後の成長に及ぼす影響について明らかにする。
- (3) MEM 培地の暴露のタイミングとその長さが胚の発生にどのような影響を与えるかは不明である。着床前胚環境により誘導される糖尿病モデルマウス(MEM マウス)の誘導機構を解明するため、胚の MEM 培地への暴露時間の変更が胚の短期および長期に与える影響について明らかにする。さらに胚における細胞生理学的変化を調べ、MEM マウス誘導のメカニズムを調べる。

3. 研究の方法

- (1) ICR 系統マウスを用いて採卵、採精後、体外受精を行った。媒精後 5 時間後から OSMI-1 処理を開始し、体外培養を行った。OSMI-1 処理濃度として、1~30 μ M OSMI-1 を用いた。短期影響として胚盤胞への発生率、また得られた胚盤胞の免疫染色による栄養外胚葉 (TE) と内部細胞塊 (ICM) の細胞数を評価した。長期影響として OSMI-1 処理胚を桑実胚で仮親に移植し、産仔率、産仔体重、胎盤重量を解析し、OGT 阻害が与える影響について検討した。
- (2) 過排卵処理した ICR 系統マウスを用いて体内受精および体外受精胚を作成し、2 細胞期から TM (0~20 nM) を添加した培地で培養した。これらの胚において、発生率、細胞分化、XBP-1 の発現、また、産仔・胎盤形成およびその後の成長に及ぼす影響について解析を行った。
- (3) 交尾後体内受精した ICR 系マウス受精卵を 2 細胞期に回収し、MEM 培地の暴露時間を従来の 48 時間から 24 時間に分けて前半後半で培養し、暴露時間と暴露タイミングの変更の影響を調べた。短期影響として発生率、また免疫染色による栄養外胚葉・内部細胞塊の細胞数及び分布を検討した。中期影響として胚を移植することによる産仔の作成に伴う産仔体重、胎盤重量、胎盤の解析を行った。また、長期影響として離乳後から成体までの体重変化、さらに成体後 (8 週齢) に高脂肪食に切り替えた雄マウスの体重変化および糖負荷実験での糖代謝に与える影響について検討した (図 4)。比較対象群として標準培地 CZB で培養された胚および自然交配により回収した胚や産子を用いた。

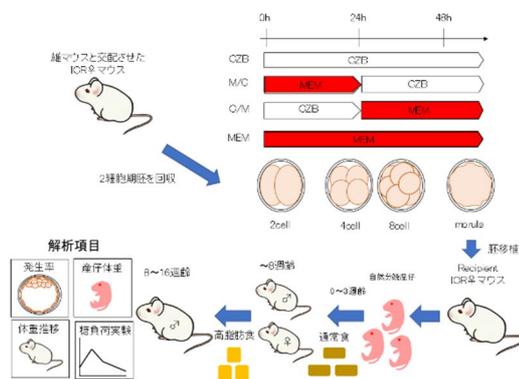


図 4 胚の MEM 培地への暴露時間の変更と与える影響

4. 研究成果

(1) 短期影響は、先行研究と一致して、高濃度 30 μM OSMI-1 処理において胚盤胞への発生率が低下し、特に桑実胚から胚盤胞において有意に減少した。一方、15 μM 以下の OSMI-1 処理においては、発生率に大きな違いは見られなかったが、2~15 μM においては TE 細胞数の減少傾向が認められた(図 5)。一方、産仔率は、2-10 μM OSMI-1 処理で、産仔率が 20%以下になる頻度が減少し、高濃度の 15 μM においては産仔率が低下した(図 6)。また胎盤重量には、顕著な影響がみられなかったが、産仔体重は 5 μM に近づくにつれ産仔体重が減少したが、さらに高濃度になるにつれ増加した(図 7)。以上の結果から、OGT 阻害剤 OSMI-1 処理による胚と着床後の発生への影響が示唆された。このことから、体内または体外に関係なく胚周囲のグルコース濃度による胚の GlcNAc 修飾量がその後の長期影響を及ぼす可能性があり、今後耐糖能など将来の疾患のリスクなどを明らかにする必要がある。

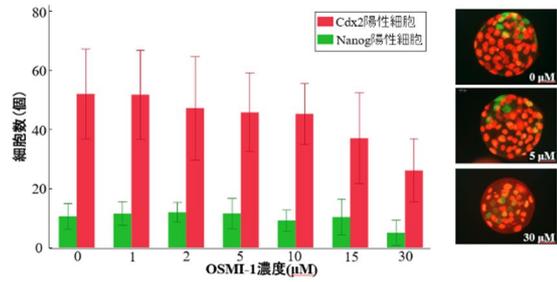


図 5 OSMI-1 処理した胚盤胞の TE 細胞数

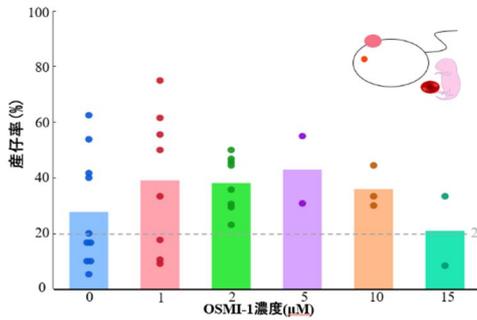


図 6 OSMI-1 処理胚由来産仔率

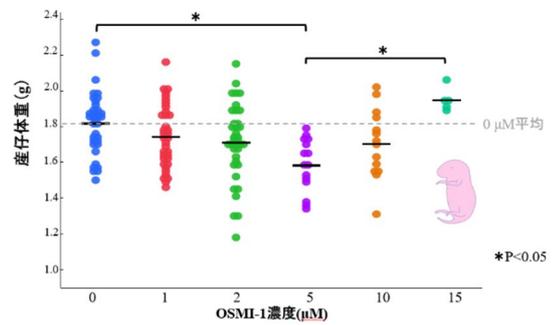


図 7 OSMI-1 処理胚由来産仔体重

(2) いずれの胚においても 10 nM TM で胚盤胞への発生が低下する傾向がみられ、20 nM で有意に低下した。20 nM 処理で得られた胚盤胞の栄養外胚葉 (TE) および内部細胞塊 (ICM) の細胞数の減少が認められた(図 8)。TM による小胞体ストレス応答を XBP-1 のスプライシングを指標に調べた結果、20 nM 処理した桑実期胚においてスプライシングが亢進しており、TM により小胞体ストレス誘導が起こっていることが示された(図 9)。次に、20 nM 処理した体内受精胚の桑実期胚を仮親に移植したところ、0 nM に比べ産仔率が低下し、産仔体重の増加傾向が認められた。さらに、出生後 16 週齢までの体重推移を調べたところ、この期間すべてで 0 nM に比べて雌雄ともに平均体重は重く推移した(図 10)。また、これらのマウスを 8 週齢と 16 週齢において耐糖能異常の有無を明らかにするため糖負荷試験を行ったところ、20 nM 処理した胚由来の雄において血糖値が高く耐糖能異常を引き起こすことが示唆された。このことから、胚における小胞体ストレスは将来肥満や糖尿病のリスク因子になる可能性があり、今後メカニズムを解明し予防を進めることが重要と考えられる。

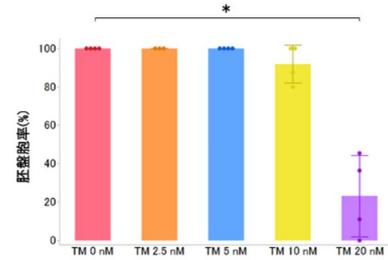


図 8 各濃度 TM 処理の発生率

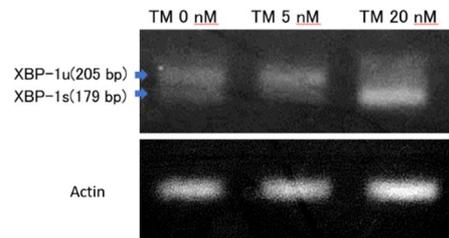


図 9 TM48 h 処理した桑実期胚における XBP-1 のスプライシング

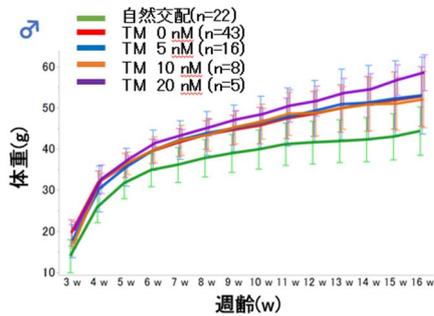


図 10 20 nM TM 処理胚由来マウスはどちらも 0~16 週齢まで体重は重く推移し続けた。

(3) 短期影響である胚の発生率を調べた結果、MEM 培地で培養した胚において発生率のわずかな低下がみられた。続いて、免疫染色において ICM 細胞数では、実験区における大幅な違いは確認されなかった。しかしながら、TE 細胞数では前半処理を行なった MEM24h/CZB において MEM48h よりも TE 細胞数が増加している傾向があった。次に、中期影響として培養後に偽妊娠マウスに移植して得られた胎盤重量は、各実験区間で大幅な違いは確認されなかった。一方興味深いことに MEM に暴露された胚由来の産仔体重は、いずれも 18.5 日目と 19.5 日目で大きく体重増加が認められた(図 11)。オスマウスにおける 3~16 週齢での体重推移については、常食を与えた 3~8 週齢各実験区では体重推移に大きな差は確認されなかった。しかし、高脂肪食を開始した 8 週齢以降は MEM 群においてのみ、体重が増加し肥満傾向が見られた(図 12)。

一方、前半処理した MEM24h/CZB 群においては、大幅に体重が減少し、13 週齢以降高頻度でマウスが死亡した。このように MEM マウスの表現型は、暴露時間およびタイミングで異なることが明らかになり、将来高血糖になるには、4/8 細胞期から桑実期にかけて暴露が、また肥満になるには 48 時間の暴露が必要であることが明らかになった。従って、着床前発生において各表現型固有の時期特異的なプログラム変更が起こることが考えられる。さらに、MEM 暴露が胚盤胞の核小体の形態異常を引き起こすことを見出した(図 13)。核小体は、リボソーム合成の重要な場であり、今後これらの異常がどのように長期影響に関与するかを解明することが重要である。

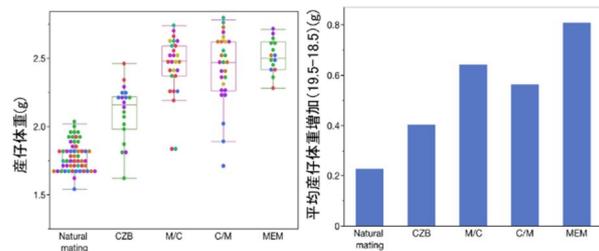


図 11 各処理による産仔体重 (E19.5、左上) および (E18.5 E19.5) における体重増加差 (右上) 比較

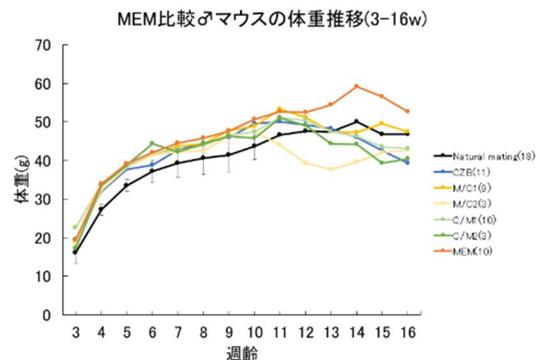


図 12 各処理が産仔体重 (左上) および (E18.5 E19.5) における体重増加比較

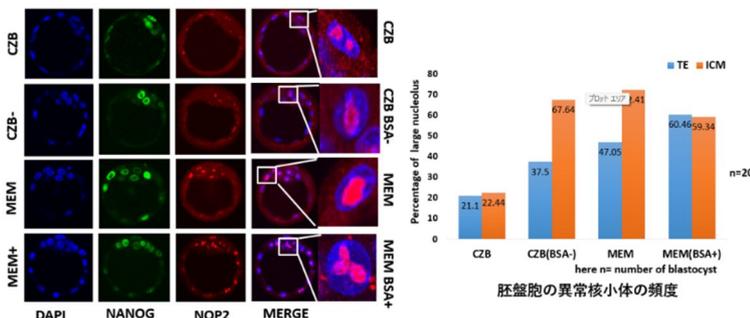


図 14 各処理が胚盤胞における核小体の形態 (左上) と異常 (一つの大きな) 核小体の頻度 (右上) の比較

以上、本研究を通じて得られた主な結果を (1) ~ (3) に示した。これらの結果から、胚の発生率向上および長期影響の解明に向けて、糖などの栄養環境、小胞体ストレス、さらに核小体の機能の可能性が明らかとなった。今後、これらを考慮した長期影響の少ない安全で安心な体外受精および体外培養技術の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishiyama Shiori, Kimura Mayu, Umihira Nodoka, Matsumoto Sachi, Takahashi Atsushi, Nakagawa Takao, Wakayama Teruhiko, Kishigami Satoshi, Mochizuki Kazuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Mice derived from in vitro MEM-cultured preimplantation embryos exhibit postprandial hyperglycemia and higher inflammatory gene expression in peripheral leukocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1215-1226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 海平のどか、中川隆生、岸上哲士	4. 巻 65
2. 論文標題 胚環境操作による遺伝子変異を伴わない疾患モデルマウスの開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 399-404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishiyama Shiori, Kimura Mayu, Nakagawa Takao, Fujimoto Yuka, Uchimura Kohei, Kishigami Satoshi, Mochizuki Kazuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of the Diabetic Kidney Disease Mouse Model Culturing Embryos in -Minimum Essential Medium In Vitro, and Feeding Barley Diet Attenuated the Pathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 746838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2021.746838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Bari Md Wasim, Ishiyama Shiori, Matsumoto Sachi, Mochizuki Kazuki, Kishigami Satoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 From lessons on the long term effects of the preimplantation environment on later health to a “modified ART DOHaD” animal model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishiyama Shiori, Kimura Mayu, Umihira Nodoka, Matsumoto Sachi, Takahashi Atsushi, Nakagawa Takao, Wakayama Teruhiko, Kishigami Satoshi, Mochizuki Kazuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Consumption of barley ameliorates the diabetic steatohepatitis and reduces the high transforming growth factor expression in mice grown in -minimum essential medium in vitro as embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101029 ~ 101029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101029	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋 篤史, 松本 沙知, 望月 和樹, 岸上 哲士
2. 発表標題 培地の保存期間が 型糖尿病モデルMEMマウスの表現型に与える影響について
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萱沼 太雅, 岸上 哲士
2. 発表標題 Tunicamycinによる小胞体ストレス誘導が体内および体外受精したマウス着床前胚の発生に与える影響の違いについて
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部 慎二, 宮城 昂大, 岸上 哲士
2. 発表標題 マウス着床前胚におけるミトコンドリア機能不全に伴うミトコンドリアの動態解析
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 荘, 若山 照彦, 岸上 哲士
2. 発表標題 クロロキンはストロンチウムによるマウス卵子活性化を特異的に阻害する
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚 健太, 岡地 洗翔, 真柄 和典, 渡辺 連, 貝塚 拓, 富澤 一仁, 岸上 哲士
2. 発表標題 細胞膜透過性ペプチド (CPP) を用いた生殖細胞へのタンパク質導入法の検討
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 沙知, 渡辺 連, 望月 和樹, 岸上 哲士
2. 発表標題 Brd4阻害による極TE欠損胚盤胞の機構解明に向けた細胞極性およびYAPの動態解析
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蟹江 沙耶, 渡辺 連, 岸上 哲士
2. 発表標題 オートファジー活性を指標にしたマウス体外受精胚の発生率向上の試み
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺 連, 若山 照彦, 岸上 哲士
2. 発表標題 マウス受精- 初期胚発生過程でのTat-beclin1 D11添加が胚発生とオートファジー動態に及ぼす影響
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saya Kanie, Ren Watanabe, Satoshi Kishigami
2. 発表標題 Distinct Activity Profiles Of Autophagy Between In Vitro And In Vivo Fertilized Embryos
3. 学会等名 53rd SSR Annual Meeting(SSR Virtual)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sachi Matsumoto, Ren Watanabe, Kazuki Mochizuki, Satoshi Kishigami
2. 発表標題 Effect Of Brd4 Inhibitor (+)-JQ1 Treatment Timing On Preimplantation Development In Mice.
3. 学会等名 55th SSR Annual Meeting(SSR Virtual)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiho Naruto, Kazunori Magara, Ren Watanabe, Teruhiko Wakayama, Satoshi Kishigami
2. 発表標題 Roles of MEK and SRC Signaling in Pronuclear Formation and Epigenetic Regulation After Fertilization in Mice
3. 学会等名 56th SSR Annual Meeting(SSR Virtual)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松本沙知, 石山詩織, 望月和樹, 岸上哲士	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 272
3. 書名 動物細胞の培養システム	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------