

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06379

研究課題名（和文）凍結保存後のウシGV期卵子におけるアポトーシス機構の解明と凍結卵子の救助法の開発

研究課題名（英文）Apoptotic mechanism and development of rescue method in bovine GV-stage oocytes after cryopreservation

研究代表者

阿部 靖之（Abe, Yasuyuki）

県立広島大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80447086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マウスおよびウシ卵巣内卵子（GV期卵子）の凍結保存において、凍結時に卵子の品質を低下させる原因究明と、有効な凍結保存法の開発を行った。その結果、微細構造、特に小胞体へのダメージが大きい、その後の受精および発生能力に影響を与えることが示された。そこで、その影響を軽減するため、小胞体ストレス阻害剤を使用して凍結卵子の受精・発生能を向上することに成功した。また、凍結卵子に由来する胚盤胞において、エピジェネティック関連遺伝子およびタンパク質の発現が新鮮卵子の胚盤胞と比べ変化することが明らかとなり、関連する疾病が増加することが懸念され、さらなる調査および技術改良が必要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシ未受精卵の凍結保存は、掛け合わせる雄を凍結・融解後に選択できるため、既存の精子凍結技術と併用し、優良牛の増産や効率的な育種改良を可能にする。未受精卵の中で、排卵卵子は染色体分散などの凍結障害や、回復培養による過成熟などが懸念される一方で、卵巣内卵子（GV期卵子）は卵核胞で染色体が保護され、凍結に対する高い抵抗性を期待でき、卵子凍結の普及が期待できる。また本研究の成果は、凍結卵のみならず幅広く卵子の受精・発生能の向上が期待でき、優良牛生産の効率化を通じた畜産業振興に貢献するばかりでなく、ヒトや他の動物種への応用、小胞体ストレスに関する基礎研究など、多岐に渡る分野への発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the cryopreservation of mouse and bovine germinal vesicle (GV) stage oocytes, we investigated the cause of oocyte quality deterioration and developed an effective cryopreservation method. As a result, it was shown that the fine structure, especially the endoplasmic reticulum, was greatly damaged, and that it affected subsequent fertilization and developmental ability. Therefore, in order to reduce the damages, we succeeded in improving the fertilization and developmental potential of frozen oocytes using an endoplasmic reticulum stress inhibitor. In addition, in blastocysts derived from cryopreserved oocytes, it was revealed that the expression of epigenetic-related genes and proteins changed compared to those from fresh oocytes. Therefore, there is a concern that related diseases will increase, and it was indicated that further investigation and technical improvement are necessary.

研究分野：動物生殖科学

キーワード：未受精卵 凍結保存 マウス ウシ 小胞体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵子(未受精卵, 胚)の培養技術など生殖補助技術の発展に伴い, 優良遺伝子を有する胚を一度に多数作製することが可能となったが, 単胎動物では胚を1個ずつ適切な性周期の仮親へ移植する. そのため, 仮親(特にウシでは確保が困難)の準備が整うまで, 卵子を凍結保存することが必要であるが, 新鮮卵(凍結していない卵子)に比べ受胎率は低下する. 未受精卵は, 胚と比べて凍結保存がさらに困難であり, 対応策として凍結法の改良が進められているが, 凍結障害の解析が不十分で明確な改善策は見出されていない.

(2) ウシ新鮮卵は受精7~8日後に胚盤胞(卵割の最終段階)へと発生するが, 凍結卵では1日程度の発生遅延を生じることが確認されている. 受精卵として品質が低いこと, ひいては受胎率の低下を招くことが推測されるが, その原因は全くわかっていない.

(3) 申請者は, ウシGV期卵(卵巣内卵子, 未成熟)の凍結保存法を開発し, 凍結卵においても新鮮卵と同程度の体外成熟率を得ることに成功したが, その後の受精率および発生率(胚盤胞)は新鮮卵に比べ半減していた. 高い受精・発生能を有するためには, 核成熟のみならず細胞質成熟が重要であり, 凍結卵における細胞質の機能的変化が推測された. また, 体外成熟後のウシMII期卵(排卵卵子, 成熟)は活性型ミトコンドリアの分布形態から3タイプに分類でき, 分布形態によって受精率および発生率に違いがあること, 発生率が最も高いタイプの出現頻度が凍結卵で低いことを見出した. しかし, 活性型ミトコンドリアに対する明確な障害や, 卵子退行へ至るメカニズムは未だ不明であり, その知見を技術開発に活用できていない.

2. 研究の目的

本研究は, ウシGV期卵を対象として, 凍結処理によって引き起こされる障害が, 卵細胞質内の微細構造と関連性があるという新たな説を提唱・解析し, その得られた知見を基に, 卵子の品質を高レベルで維持し得る新たな凍結, 培養および凍結卵子の救助法を開発する.

3. 研究の方法

(1) 凍結保存の影響解析

免疫染色法を用いて, 凍結卵子の成熟過程における微細構造の変化を観察した. 特に, 小胞体へのダメージ(小胞体ストレス)は, マウス着床前胚にアポトーシスの原因となって, その後の胚発生に悪影響を及ぼすことが報告されていたため, カスパーゼ12の発現をマーカーとして小胞体ストレスを調べた.

(2) GV期卵の凍結・培養法の改良

凍結保存の影響として小胞体ストレスが強く疑われたことから, マウスおよびウシGV期卵母細胞の凍結保存液, および, その後の成熟培養液に種々の濃度の小胞体ストレス阻害剤を添加し, 受精・発生に及ぼす効果を調べた.

(3) エピジェネティック関連遺伝子およびタンパク質の発現解析

卵子は, 受精時にゲノムの初期化(脱メチル化)を経るが, 脱メチル化を受けない配列(刷り込み遺伝子)が存在し, この配列は成熟を開始する成長期卵子でメチル化が生じる. 正常なメチル化パターンを有しなければ発生できないことから, 凍結処理はDNA自身を保存するものの, メチル化異常を引き起こしている可能性が考えられる. そこで, 新鮮および凍結GV期卵, 凍結MII期卵に由来する胚盤胞を作製し, リアルタイムPCR法により遺伝子発現を解析した. 加えて, 影響を及ぼす凍結保存の工程を特定するため, 凍結保存液への暴露のみを行い, 液体窒素には浸漬させないGV期卵に由来する胚盤胞(毒性区)も作製し, 凍結GV期卵由来の胚盤胞と遺伝子およびタンパク質発現を比較した.

4. 研究成果

(1) 凍結保存の影響解析およびGV期卵の凍結・培養法

小胞体ストレスのマーカーであるカスパーゼ12は, 凍結卵では細胞質全体にクラスター状に点在していたが, 小胞体ストレス阻害剤で処理した凍結卵(阻害剤処理卵)ではその数が減少し, 発現量(蛍光強度)も有意に減少した(図1). また, 凍結卵と比較して, 阻害剤処理卵は, 成熟率(50 vs. 64%)および受精率(39 vs. 63%), 胚盤胞発生率(10 vs. 51%)がいずれも有意に高かった. この効果は新鮮卵でも確認され, 小胞体ストレス阻害剤処理によってカスパーゼ12発現量は減少, 胚盤胞発生率は増加した(40 vs. 71%). 以上の結果から, TUDCA処理は凍結処理のみならず体外成熟によって誘導されるアポトーシスを抑制し, 卵子の品質を向上できることを示した. ただし, マウスとウシではその効果にバラつきがあり, 処理濃度および処理法を慎重に検討する必要がある.

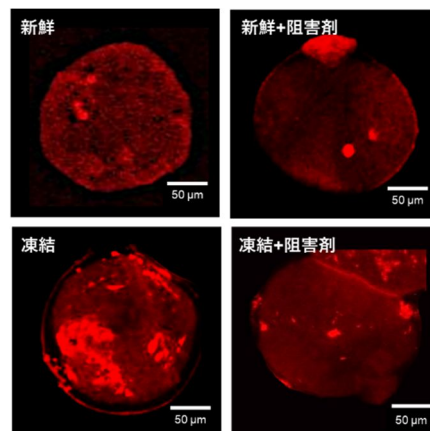


図1. 成熟培養後のマウス卵子におけるカスパーゼ12発現.

(2) エピジェネティック関連遺伝子およびタンパク質の発現解析

マウス卵子を用いて、インプリント遺伝子(3遺伝子)やエピジェネティック修飾に関わる遺伝子(7遺伝子)の発現に対する凍結保存の影響を調査した結果、インプリント遺伝子では有意差がみられなかったが、1遺伝子が凍結卵子において新鮮卵子の約2倍の発現量を示した。エピジェネティック修飾関連遺伝子では、2遺伝子で凍結卵子の発現が有意に減少していた。またその影響は、M11期で凍結した場合よりも、GV期で凍結した場合の方が大きかった。そこで、GV期における凍結処理において影響が大きい工程を特定するため、新鮮区(非凍結)および凍結区(凍結保護剤に暴露後に液体窒素に浸漬)、毒性区(凍結保護剤への暴露のみ)を比較した結果、特に冷却操作が大きく影響を及ぼすことが示された(図2)。さらに、3つのタンパク質発現を解析したところ、新鮮区と比較して毒性区では1.4~2.4倍、凍結区では1.7~2.2倍に増加していた。これらの結果より、凍結保存は特定のエピジェネティック関連遺伝子およびタンパク質の発現に影響を及ぼすことが明らかとなり、関連する疾病が増加することが懸念され、さらなる調査および技術改良が必要である。

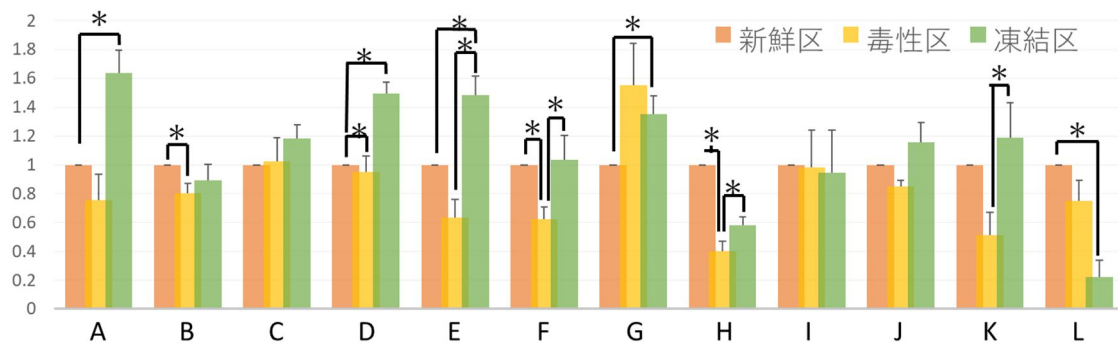


図2. マウス胚盤胞におけるエピジェネティック関連遺伝子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki Hiroshi, Watanabe Hiroyuki, ABE Yasuyuki	4. 巻 68
2. 論文標題 Assisted reproductive techniques for canines: preservation of genetic material in domestic dogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2021-111	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 Khoi Hoang Xuan, Shimizu Kenji, Yoneda Yoshitaka, Minagawa Itaru, Abe Yasuyuki, Kuwabara Yasushi, Sasanami Tomohiro, Kohsaka Tetsuya	4. 巻 53
2. 論文標題 Monitoring the reactive oxygen species in spermatozoa during liquid storage of boar semen and its correlation with sperm motility, free thiol content and seasonality	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Andrologia	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/and.14237	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 Abe Yasuyuki, Asano Tomoyoshi, Wakasa Ichiko, Kume Aiko, Yokozawa Sakimi, Umemiya Shirafuji Rika, Suzuki Hiroshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Cryopreservation of canine spermatozoa using a skim milk based extender and a short equilibration time	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction in Domestic Animals	6. 最初と最後の頁 1548~1553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/rda.13806	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 Pitia Ali Mohammed, Minagawa Itaru, Abe Yasuyuki, Kizaki Keiichiro, Hamano Koh-ichi, Sasada Hiroshi, Hashizume Kazuyoshi, Kohsaka Tetsuya	4. 巻 Feb 15
2. 論文標題 Evidence for existence of insulin-like factor 3 (INSL3) hormone-receptor system in the ovarian corpus luteum and extra-ovarian reproductive organs during pregnancy in goats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03410-1	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沖本成美, 岡田奈智, 井上慶子, 阿部靖之
2. 発表標題 マウスGV卵の凍結保存における小胞体ストレス阻害剤の効果
3. 学会等名 第62回日本卵子学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福本学ほか	4. 発行年 2023年
2. 出版社 三輪書店	5. 総ページ数 376
3. 書名 知ってるつもりの放射線読本 放射線の基礎知識から、福島第一原発事故による放射線影響、単位Svの理解まで	

〔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
---------	---------