

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05912

研究課題名(和文) ガラス化保存後のブタ卵子におけるDNA修復機能とゲノム編集に関する研究

研究課題名(英文) Study of DNA damage and repair mechanism in porcine embryos obtained from vitrified oocytes and zygotes, and its relevance to genome editing

研究代表者

ソムファイ タマス (Somfai, Tamas)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：90547720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ブタのガラス化卵子および受精卵(接合子)のDNA損傷と胚発生の結果を相関させ、その結果を反映させてガラス化卵子や受精卵からゲノム編集された胚を作製する技術を初めて確立することである。ガラス化により未成熟卵卵子のDNA二本鎖切断レベルが大幅に増加したが、受精卵では増加しなかった。ガラス化未熟卵子では胚の発生能が低下するが受精卵では影響を受けず、さらに、ガラス化受精卵へ電気穿孔によるCRISPRcas9を使いOCT4またはCD46遺伝子あるいはその両方をノックアウトしたところ、ガラス化受精卵の20%以上が胚盤胞に発生しゲノム編集の有効性はすべての実験区で90%以上であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、卵子の超低温保存がその後の胚発生に及ぼすDNA損傷と修復のレベルに関する新たな知見を提供し、今後の家畜やヒトにおける遺伝子バンク技術の向上に貢献するものである。さらに、このプロジェクトで確立されたガラス化技術とゲノム編集技術は、ヒトの生物医学研究に使用されるゲノム編集モデルブタの生産を強化する事が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to correlate the degree of DNA damage and repair in vitrified porcine oocytes and fertilized eggs (zygotes) with embryonic developmental outcomes and, as feedback to the findings, to establish the technology to produce genome edited embryos from vitrified oocytes or zygotes for the first time. Vitrification significantly increased the level of DNA double-strand breaks in immature oocytes, but not in zygotes. This was highlighted with reduced embryo development in vitrified immature oocytes whereas the developmental competence of vitrified zygotes was not affected. Therefore, for the next experiments we used vitrified zygotes for the production of genome-edited porcine embryos. Genome editing was applied by knocking out the OCT4 or CD46 genes or both using CRISPRcas9 via electroporation. Over 20% of vitrified zygotes could develop to blastocyst after genome editing and the efficacy of genome editing was over 90% in all groups.

研究分野：動物生産科学

キーワード：ブタ卵子 ブタ接合体 ガラス化保存 DNA二本鎖切断 ゲノム編集 OCT4 CD46 胚盤胞発生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブタ卵子では、ガラス化保存後の生存率と胚発生率が顕著に低下することから、他の動物種よりも困難とされてきた。しかし、本申請の代表研究者はブタ卵子・受精卵 200~300 個を数回にわけて短時間でガラス化保存する技術を世界に先駆けて開発し、産子を得ることに成功した。その手法で未成熟卵子、成熟卵子、前核期受精卵のガラス化保存を行った。発生能が最も良好に保たれるのは前核期受精卵で、次いで未成熟卵子であることが明らかとなったが、その理由は不明である。

本研究では、ガラス化保存後のブタ卵子・受精卵にどの程度の DNA 損傷が起こり、どの様に胚発生能が回復されるのか、またさらに検討を進め、それらの卵子を利用したゲノム編集が可能か否かという課題に対応する。これまで、ガラス化保存後の卵子・受精卵からゲノム編集された動物の誕生はマウスで報告されているのみである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ガラス化保存後のブタ卵子・受精卵における DNA 損傷と修復の程度を、胚発生成績と関連づけることと、その知見のフィードバックし、ゲノム編集を行うことが可能なレベルに到達した卵子を作出する技術へと高めることである。

卵子における DNA 損傷に対してその修復機能は胚発生に必要であり、その詳細については不明な点が多い。その機能の解明を通してゲノム編集に最適化された卵子を作出しようとするところに発想の独自性がある。保存された卵子でゲノム編集が可能となれば、様々な遺伝子で利用できると思われることから、創造性の高い内容が含まれていると思われる。また、代表研究者がこれまでに開発した、大量の卵子を短時間でガラス化保存することのできる技術を活用する点で、手法としての独自性がある。

3. 研究の方法

本研究は次のような 2 つのフェーズから構成される。

1) ガラス化保存に適した卵子のステージの決定 (令和 3 ~ 4 年度)

ガラス化保存を未成熟卵子、成熟卵子、前核期受精卵で実施し、加温後の胚発生能を調べる中で、DNA 損傷とその修復機能との関係を明らかにする。

ブタ卵巣 (と畜場由来) から未成熟卵子を採取し、その一部は体外受精によって胚を作出する。未成熟卵子、成熟卵子、前核期受精卵のガラス化保存を行う。対照区としてガラス化保存を実施していない卵子に同じ処置を実施する。ブタ胚における胚性ゲノム活性化の時期である 4 細胞期から 8 細胞期で次の内容の比較を行う。

- ・ DNA 損傷の程度について、リン酸化ヒストン H2AX を指標として数値化。
- ・ DNA 修復遺伝子 UDG、MSH2、XRCC6、RAD51 の発現を数値化。

比較検討の際、一部の受精卵の 4 細胞期における DNA のインテグリティ (完全性) および胚盤胞への発生能の情報を加える。胚の品質については細胞数と TUNEL による DNA 断片化の程度を指標に判定し、4 細胞期における DNA 損傷の結果と比較する。

最終的に、DNA のインテグリティに基づくガラス化保存用の卵子のステージを決定する。

2) ガラス化保存後の卵子を利用したゲノム編集胚の作成 (令和 4 ~ 5 年度)

第一フェーズの最適条件でガラス化保存を行った卵子を加温し、前核期でゲノム編集を行う。対照はガラス化保存を実施していない卵子とする。

対象の遺伝子はブタ胚盤胞で発現される OCT4 と CD46 とし、前核期受精卵にエレクトロポレーション法で CRISPR-Cas9 を導入する。ゲノム編集の成否は、培養、免疫染色、ゲノムのシーケンズで判定する。

ゲノム編集でブタ胚の OCT4 をノックアウトした先行事例が存在することから、参考にしつつ進める。CD46 については機能に不明な点が多く学術的に興味深い、豚熱 (CSF) ウィルスの受容体としても働くことから実用的にも意義深い。

4. 研究成果

最初の実験では、未成熟段階 (卵細胞期) の卵子または前核期受精卵の段階でのガラス化後、正常な受精卵が得られるが、成熟段階では受精卵が得られないことが明らかになった。したがって、成熟卵子のガラス化はその後の研究から除外して、未成熟卵子と前核期受精卵の DNA のインテグリティに対するガラス化の影響を比較した。ガラス化は、未成熟卵子では DNA 二本鎖切断 (DSB) のレベルを有意に増加させたが、前核期卵子では増加されなかった。未成熟卵子を凍結保護剤で処理しても、DSB レベルへの影響は認められなかった。さらに、ガラス化した未成熟卵子から得ら

れた初期（卵割期）の胚も、非ガラス化対照と比較して割球数の減少に関連する DNA の DSB レベルが増加していた。このような異常は、前核期にガラス化した受精卵から発生する胚では観察されなかった。DNA 修復遺伝子 Rad51 は、ガラス化した未成熟卵子から得られた 4~8 個の細胞胚で発現上昇が認められたが、ガラス化した受精卵から得られた胚では認められなかった。卵子が未成熟段階でガラス化され、その後 IVM および IVF に使用された場合、胚盤胞期への胚の体外発生能力、ガラス化されていない対照区と比較して有意に低下した。しかし、ガラス化した受精卵の胚盤胞期までの発生能は、対照区と同様であった。卵核期または前核期でのガラス化は、胚盤胞への発生における総細胞数 およびアポトーシス細胞の割合に影響を及ぼさなかった。結論として、本結果は、DNA のインテグリティと発生能について、受精卵の段階でのガラス化が、未成熟または成熟卵子段階でのガラス化よりも有利であることを明らかにした。したがって、本研究課題において、2 年目と 3 年目における実験では、ゲノム編集されたブタ胚の生産については、ガラス化受精卵を使用することとした。

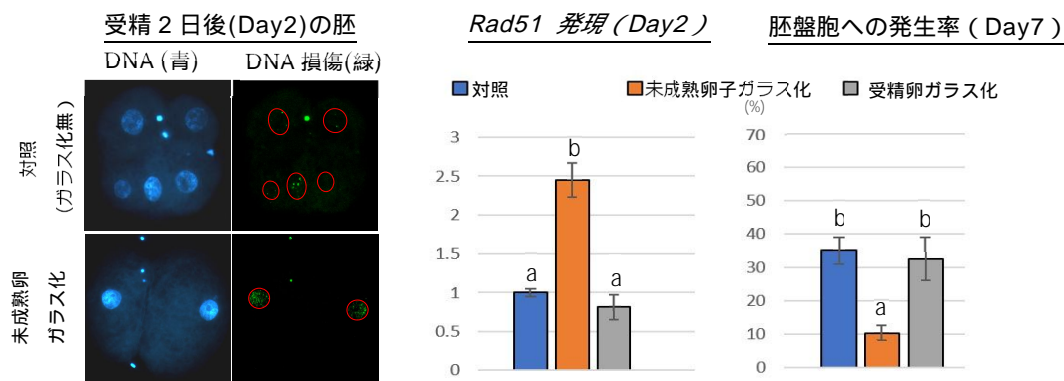


図 1. ブタ未成熟卵のガラス化は DNA 二本鎖切断を引き起こす。この二本鎖切断は受精後の卵割期胚に伝達され(左下図)、RAD51 DNA 損傷修復遺伝子発現の増加をもたらす(中下図)。その結果、胚盤胞期への発生率が低下する(右下図)。

その後、以下に示す研究プロジェクトの次の段階に移行した。エレクトロポレーションを介した CRISPRcas9 を使用して OCT4 または CD46 遺伝子またはその両方をノックアウトすることにより、体外成熟/受精によって作製し、ガラス化/加温したブタ受精卵にゲノム編集を適用した。各実験区で、ゲノム編集による胚盤胞への発生を確認した。さらに、ブタ受精卵のガラス化保存後、OCT4/CD46 ダブルノックアウトして、胚盤胞を作ることに成功した。この成果は、低温保存されたブタ受精卵からのゲノム編集胚の作製の初めての成功例である。ガラス化またはゲノム編集単独では、胚盤胞の生産率は低下しなかった。しかし、それらの組み合わせは胚盤胞への発生を低減させた。それでも、ゲノム編集後に胚盤胞まで発生したガラス化接合体の割合は 20% 以上でした。ゲノム編集された胚盤胞はそのサイズが小さく、また、遺伝子配列の確認により、受精卵のガラス化は、得られた胚盤胞におけるゲノム編集の効率を低下させないことが明らかとなった。

本研究は、ガラス化保存ブタ受精卵の効率的なゲノム編集を目的とした。加温後 2 時間の受精卵に対し、OCT4 または CD46 遺伝子 CRISPR/Cas9 RNP エレクトロポレーション (RNP-EP) を行った後、胚盤胞まで発生させた。胚盤胞ゲノムシーケンス解析の結果、OCT4 (非ガラス化: 91.0%、ガラス化: 95.1%) と CD46 (非ガラス化: 94.5%、ガラス化: 93.2%) のいずれも高効率でゲノム編集が確認され、非ガラス化とガラス化間で有意差は認められなかった。胚盤胞の免疫細胞染色では OCT4 および CD46 タンパク質は検出されず、それぞれの遺伝子がノックアウトされていることが示された。さらに、OCT4 および CD46 ノックアウト胚盤胞は対照区と比べてその体積が小さいことが分かった。そこで、RNP-EP によるストレス刺激が胚盤胞発生に及ぼす影響を調べるため、上述通り加温後の受精卵に RNP-EP を行い、培養開始後 6 日目の胚盤胞の総細胞数を比

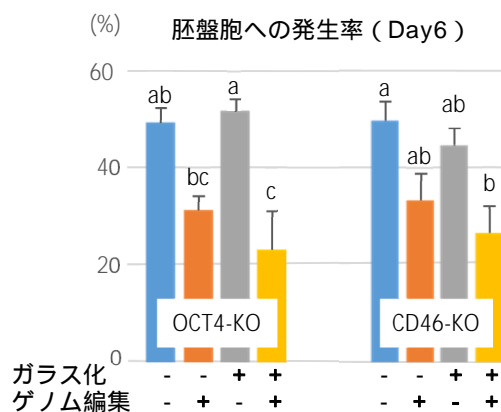


図 2. 前核期受精卵をガラス化保存した結果、胚発生率は高く維持され、ゲノム編集を実施した時の胚発生率は新鮮胚と同様であった(2つの遺伝子ノックアウトで確認)

較した。内在性遺伝子の対照として EGFP-RNP を用いた。その結果、総細胞数は OCT4-RNP-EP (35.4 ± 3.6)、 CD46-RNP-EP (28.7 ± 4.8)、 EGFP-RNP-EP (57.5 ± 4.1)、 Non-RNP-EP (66.4 ± 7.8) であった。すなわち、OCT4-RNP-EP および CD46-RNP-EP 由来胚盤胞の総細胞数は、EGFP-RNP-EP および Non-RNP-EP と比べて有意に減少したが、EGFP-RNP-EP および Non-RNP-EP 間において有意差は認められなかった。これらの結果は、RNP-EP によるストレス刺激は胚盤胞発生に影響を及ぼさないことを示しており、OCT4-RNP-EP、CD46-RNP-EP 由来胚盤胞の体積と細胞数減少は、それぞれの遺伝子ノックアウトによる表現型を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haraguchi Seiki, Dang Nguyen Thanh Q., Kikuchi Kazuhiro, Somfai Tam?s	4. 巻 91
2. 論文標題 Electroporation mediated genome editing in vitrified/warmed porcine zygotes obtained in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 e23712 (1-11)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23712	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 該当する

1. 著者名 Somfai Tam?s	4. 巻 95
2. 論文標題 Vitrification of immature oocytes in pigs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13943 (1-16)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13943	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 該当する

1. 著者名 Somfai Tam?s, Haraguchi Seiki, Dang-Nguyen Thanh Quang, Kaneko Hiroyuki, Kikuchi Kazuhiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Vitrification of porcine immature oocytes and zygotes results in different levels of DNA damage which reflects developmental competence to the blastocyst stage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0282959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0282959	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 該当する

1. 著者名 Nguyen Hiep Thi, Somfai Tam?s, Hirao Yuji, Dang Nguyen Thanh Quang, Linh Nguyen Viet, Nguyen Bui Xuan, Nguyen Nhung Thi, Nguyen Hong Thi, Nguyen Van Hanh, Kaneko Hiroyuki, Takagi Mitsuhiro, Kikuchi Kazuhiro	4. 巻 93
2. 論文標題 Dibutyryl cAMP and roscovitine differently affect premature meiotic resumption and embryo development of vitrified immature porcine oocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13795	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 該当する

1. 著者名 Somfai T, Dang-Nguyen TQ, Kikuchi K.	4. 巻 93
2. 論文標題 Altered microfilament dynamics contribute to the formation of diploid metaphase spindles in porcine oocytes which fail to reach the metaphase-II stage during in vitro maturation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13690	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Somfai T, Haraguchi S, Dang-Nguyen T.Q., Kikuchi K.
2. 発表標題 Vitrification of porcine immature oocytes and zygotes results in different levels of DNA damage in subsequently developing embryos.
3. 学会等名 International Congress on Animal Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Somfai T, Haraguchi H, Dang-Nguyen T, Kikuchi K.
2. 発表標題 Application of Assisted Reproductive Techniques for the Preservation of Indigenous Pigs.
3. 学会等名 The 6th Fatty Pig International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 ソムファイ タマス, 原口 清輝, Dang-Nguyen TQ, 金子 浩之, 菊地 和弘
2. 発表標題 Vitrification of porcine immature oocytes causes DNA double-strand breaks in subsequently developing embryos
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2021 (Online)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ソムファイタマスは、「ブタ卵のガラス化保存の効率の向上と利用に関する研究」で、2023年度日本畜産学会賞（第117号）を受賞した。

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
研究分担者	原口 清輝 (Haraguchi Seiki) (10324576)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	菊地 和弘 (Kikuchi Kazuhiro) (20360456)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長補佐 (82111)	

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
---------	---------