

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14964

研究課題名（和文）卵母細胞系列における変異型ミトコンドリアDNAの排除機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of the elimination of mutant mitochondrial DNA during oogenesis

研究代表者

樋口 智香（HIGUCHI, Chika）

大阪大学・大学院医学系研究科・特別研究員（PD）

研究者番号：00866379

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：母性遺伝により次世代へと遺伝するミトコンドリアDNA（mtDNA）の集団では、その質を担保するために、変異をもつmtDNAは卵形成過程において排除されると考えられている。しかしながら、変異mtDNAの割合が世代・個体ごとに異なることや、卵形成の始まる胎仔期の解析が困難なことから、その排除機構は不明な点が多い。本研究では、変異型mtDNAをもつモデルマウス由来のiPS細胞を起点とした体外卵細胞分化誘導系をはじめて確立した。さらに、マウスiPS細胞から分化誘導された卵細胞の各発生ステージにおいて変異型mtDNAがいつ消失するかを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵子形成過程における変異型mtDNAの排除機構の解明は、種の永続性を担保するシステムを理解する上で、重要な課題である。また、その破綻はミトコンドリア疾患の原因となることから医学的にも重要である。しかし、その排除機構の理解は、変異型mtDNAの割合が世代・個体ごとに変化することから困難であった。本研究で確立した変異型mtDNAをもつモデルマウス由来のiPS細胞からの卵細胞分化誘導系は、変異型mtDNAの排除機構を体外で解析することが可能な手法である。これによる変異型mtDNAの排除機構の解明は、ミトコンドリア病の原因究明のみならず、卵子の質を改善する手法への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial DNA (mtDNA), which is passed on to the next generation through maternal inheritance, it is believed that mutant mtDNA is eliminated during the oogenesis to ensure its quality. However, the elimination mechanism remains unclear because the proportion of mutant mtDNA varies from intergeneration and between individual mice, and because it is difficult to analyze the embryonic stage, when oocyte formation begins. In this study, we established an in vitro culture system to induce oocytes from iPSCs derived from model mice, that have mutant mtDNA. Furthermore, we analyzed when the mutant mtDNA is eliminated at each developmental stage of oocytes induced to differentiate from mouse iPS cells.

研究分野：生殖細胞

キーワード：卵母細胞 ミトコンドリア mtDNA 体外培養

1．研究開始当初の背景

卵子形成は胎仔期の始原生殖細胞（PGC）から始まり、出生後、成熟の過程を経て排卵に至ることと完了する。しかしながら、実際に排卵に至る卵子へ分化するのはこの内わずか 0.1%程度である。このことは、機能的でない卵子を排除する「品質管理機構」の存在を示唆する。細胞内小器官の中でもミトコンドリアは卵細胞の質を決定する重要な因子の一つとして報告されている。ミトコンドリアのもつ独自の DNA（mtDNA）は通常、体細胞で 1,000～10,000 コピー存在しており、それらは母性遺伝により次世代に伝わる。これらの事実は核 DNA とは異なる遺伝様式と品質管理機構が存在することを示唆している。これまでの研究から、卵子の形成過程では、mtDNA のコピー数が減少することにより、次世代に伝わる mtDNA の集団に偏りが生じる「ミトコンドリアボトルネック効果」が生じ、結果的に変異 mtDNA が排除されると考えられている（Cao et al. 2007 Nat. Genet.; Cree et al. 2008 Nat. Genet.）。しかしながら、その正確な時期や変異 mtDNA が排除される仕組みについて実験的に解明された例はない。

研究代表者が所属するグループは、これまでにマウス ES・iPS 細胞から卵細胞を分化誘導する培養系を開発した（Hikabe et al. 2016 Nature; Nagamatsu et al. 2019 Sci, Adv; Shimamoto et al. 2019 PNAS）。これに加え、研究代表者はマウス ES 細胞から分化誘導された卵細胞の各発生ステージにおいて、mtDNA のコピー数を定量的に評価する実験系を確立した。本研究では変異型 mtDNA をもつモデルマウスから樹立した iPS 細胞を用いて、独自に開発した卵細胞の分化誘導系で変異をもつ mtDNA を追跡するシステムを構築することで、卵細胞形成過程における変異型 mtDNA の選択制御機構を明らかにする。

2．研究の目的

本研究では、卵細胞形成過程における変異型 mtDNA の排除機構の解明を目指し、変異型 mtDNA をもつモデルマウス・ミトマウス から樹立した iPS 細胞を起点とした卵細胞分化誘導系を構築する。さらに卵細胞すべての発生段階において変異型 mtDNA の割合を計測し、最もその割合が変化する時期において変異型 mtDNA の排除様式とそれを制御する因子を同定する。

3．研究の方法

（1）変異型 mtDNA を持つモデルマウス由来 iPS 細胞の樹立、及び変異型 mtDNA の割合の測定
卵細胞分化誘導系の確立には、まず変異型 mtDNA をもつモデルマウス由来 iPS 細胞の樹立と、その iPS 細胞が持つ変異型 mtDNA の割合を明らかにする必要がある。そこで、それぞれ異なる変異型 mtDNA の割合をもつモデルマウス 2 匹の尻尾から iPS 細胞を樹立した。次に、樹立後の iPS 細胞が持つ変異型 mtDNA の割合を定量的 PCR 法により野生型 mtDNA と変異型 mtDNA のコピー数を定量することで、変異型 mtDNA の割合を測定した。

（2）変異型 mtDNA をもつ iPS 細胞からの卵細胞分化誘導系の構築

まず、始原生殖細胞（PGC）様細胞、及び卵母細胞時期の細胞単離・採取のために、これらの時期特異的に発現する Stella の蛍光レポーター（Stella-tdTomato）iPS 細胞をノックインにより複数株作製した。同時に、対照区として野生型 mtDNA のみを持つ iPS 細胞株についても同様に作製を行った。次に、iPS 細胞を起点に、エピブラスト様細胞、PGC 様細胞を誘導した。さらに、所属グループで確立された方法に従い（Hikabe et al. 2016 Nature）、PGC 様細胞とマウス胎仔卵巣体細胞を凝集培養することで、PGC 様細胞から卵母細胞へ分化誘導した。これにより、iPS 細胞株からの卵細胞の分化過程において変異型 mtDNA を追跡できるシステムを構築した。

（3）卵細胞分化過程における変異型 mtDNA の割合の計測

次に、卵細胞系列における変異型 mtDNA の排除時期を決定するために、体外培養系で得られる各発生ステージの卵母細胞や原始卵卵において、定量的 PCR 法により野生型 mtDNA と変異型 mtDNA のコピー数を定量した。これらの解析により、総 mtDNA コピー数の算出と最も変異型 mtDNA の割合が変化するステージを特定した。

4. 研究成果

(1) 変異型 mtDNA を持つモデルマウス由来 iPS 細胞の樹立、及び変異型 mtDNA の割合の測定
低割合 (17.1%) と中割合 (63.8%) の変異型 mtDNA をもつモデルマウスから iPS 細胞の樹立に成功した。樹立直後の各 iPS 細胞の割合を調べた結果、どちらの由来においても、60~80% の変異型 mtDNA の割合をもっていることが明らかとなった。特に、低割合由来に関しては、変異型 mtDNA の割合が、樹立の過程でおよそ 40~60% 以上増えた結果となった。これは変異型 mtDNA の種類が大規模欠失型であるために、野生型 mtDNA と比較して、ゲノム長の短い欠失変異型 mtDNA の方が mtDNA の複製効率が高いことに起因するためと考えられる。このことから、iPS 細胞の樹立に伴う増殖過程で、変異型 mtDNA の細胞内の含有率が上昇したと考えている。
また、低割合のモデルマウス由来においては野生型 mtDNA のみをもつ iPS 細胞株を複数株得ることが出来た。これらの株については、対照区として今後の実験に使用した。

(2) 変異型 mtDNA をもつ iPS 細胞からの卵細胞分化誘導系の構築

始生殖細胞 (PGC) 様細胞、及び卵母細胞時期の細胞単離・採取のために、Stella-tdTomato-iPS 細胞をノックインにより複数株作製した。変異型 mtDNA の割合を確認した結果、作製した Stella-tdTomato-iPS 細胞株は 50~80% の変異型 mtDNA を有していることが明らかになった。次に、上記で作製した iPS 細胞を起点に、エピプラスト様細胞、PGC 様細胞への分化誘導を行った。分化誘導 6 日後の FACS 解析により、Stella-tdTomato 陽性細胞が PGC 細胞表面マーカーである CD61 両陽性であることを確認した。さらに遺伝子発現解析の結果、PGC 時期に発現する遺伝子 (Stella, Blimp1, Prdm14, Tfap2c, Nanos3) を発現していることを確認した。続いて、PGC 様細胞と胎仔卵巣体細胞との凝集培養により、PGC 様細胞を卵細胞へと分化誘導した。21 日間の卵細胞分化培養を行なったところ、卵細胞時期において Stella-tdTomato の蛍光が確認され、また変異型 mtDNA を持つ卵細胞を 80~100 個得ることができた (図 1)。これらから、変異型 mtDNA をもつ iPS 細胞からの卵細胞分化誘導系を構築することができた。

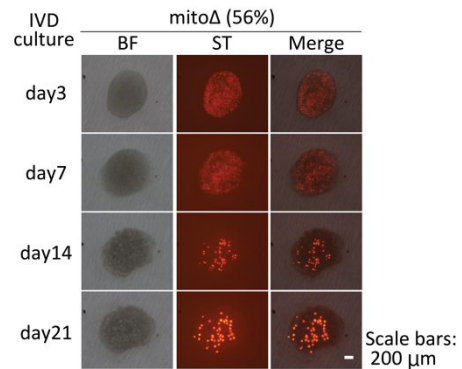


図 1. 56% の変異型 mtDNA をもつ iPS 細胞から分化誘導した卵細胞
Bright field (BF), Stella-tdTomato (ST).

(3) 卵細胞の分化過程における変異型 mtDNA の割合の計測

体外培養系における卵母細胞系列の各発生ステージの卵母細胞において、定量的 PCR 法により野生型 mtDNA と変異型 mtDNA のコピー数を定量した。具体的には、iPS 細胞、エピプラスト様細胞、PGC 様細胞、さらに卵母細胞における単一細胞を回収し、変異型 mtDNA の割合の変動を調べた。その結果、特異的に変異型 mtDNA の割合が変動する時期は見られなかった。
そこで、次に静止状態を模した原始卵胞の誘導を試みた。通常の卵細胞分化誘導系では、成体での静止状態期の原始卵胞を経ることなく、卵母細胞が成熟する。そこで、研究代表者が所属するグループで確立した方法に従い、酸素濃度 (5% O₂) と培養環境の外圧を調整することで、成体での静止状態を模した原始卵胞の誘導を試みた。まず野生型 mtDNA のみを有する ES 細胞から誘導した卵細胞分化誘導系において原始卵胞の誘導を検討した。通常の卵細胞分化誘導系では二次卵胞卵にまで成熟する培養期間 21 日時点では原始卵胞状態であるが、それより長期の培養では、活性化・成熟し二次卵胞卵まで成長することが明らかとなった。今後は、より静止状態を維持した原始卵胞の培養条件の検討を行う必要があると考えている。これにより、成体での各卵細胞発生ステージに近い卵細胞を対象に変異型 mtDNA の割合の解析を行うことが可能となる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Chika Higuchi, Go Nagamatsu, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Katsuhiko Hayashi
2 . 発表標題 Establishment of in vitro differentiation system from mito-mice that harbor a deletion-mutated mitochondrial DNA
3 . 学会等名 国際シンポジウム「Totipotency and Germ Cell Development」（国際学会）
4 . 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------