

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19913

研究課題名(和文)体外受精が子孫のゲノム情報に与える影響を定量・評価する試み

研究課題名(英文)An attempt to quantify and evaluate the effect of in vitro fertilization on the genomic information of offspring

研究代表者

作見 邦彦(SAKUMI, KUNIHICO)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：50211933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：MTH1/OGG1/MUTYH三重欠損マウスは受精、発生の効率が野生型マウスと比較してかなり低かった。これは両親の生殖系列細胞における自然突然変異頻度の上昇によるものと考えられる。自然突然変異頻度の極端な上昇が実験系に影響を与えたため、よりマイルドな自然突然変異上昇を示す変異体を探す目的で、MTH1/OGG1/MUTYH三重欠損マウスと同じ家系からMTH1/OGG1, MTH1/MUTYH, OGG1/MUTYHの各二重欠損マウス及び、MTH1, OGG1, MUTYHの単独欠損マウスの系統を樹立し、そのうちMTH1/MUTYH二重欠損マウスに関してエクソーム解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2016年、我が国の全出生数に対する体外受精で生まれた子の割合は5.5%に達し、さらにその8割以上が凍結保存処置を経たものであった。これらの処置を経て生まれた体外受精児の約2%に何らかの異常の発生が報告されている。採卵、培養、凍結処置時に生じるゲノムへのダメージは一生涯、さらに子孫にまで引き継がれるものであり、その発生は極力抑制されなければならない。不妊治療に伴う次世代へのゲノムダメージの蓄積の実態解明を進め、その抑制方法を探することは重要な課題である。合わせて、ヒトの生殖・出産の適齢年齢は20歳～30歳であるという事実を広く知らしめ、不妊治療に頼らずにすむ社会環境構築の重要性を喚起したい。

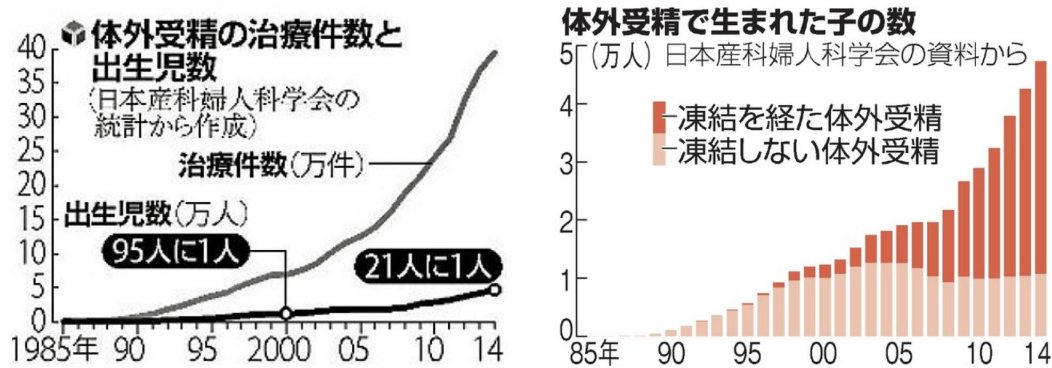
研究成果の概要(英文)：The efficiency of in vitro fertilization and early development was significantly lower in the MTH1/OGG1/MUTYH triple knockout (TOY-KO) mice compared with wild type. This is considered to be due to an increased spontaneous mutation frequency in the germ lineage cells of the TOY-KO parent mice. To search the mouse strain with milder mutator phenotype, we prepared MTH1/OGG1, OGG1/MUTYH and MTH1/MUTYH double knockout mice, and MTH1, OGG1 and MUTYH single knockout mice in addition to TOY-KO mouse. By germline mutation analysis using whole exome sequencing, MTH1/MUTYH double knockout mouse showed decreased (about 1/10) mutation frequency with different mutation spectrum from TOY-KO mouse.

研究分野：遺伝学, 生化学, 実験動物学

キーワード：生殖細胞突然変異 遺伝 体外受精 ミューテーターマウス 8-オキシグアニン MTH1 OGG1 MUTYH

## 1. 研究開始当初の背景

不妊治療の普及に伴い、日本では体外受精を経た子供が全出産数に占める割合は2014年には21人に1人まで増加し、今後も更なる増加が予想されている。さらにその77%以上が凍結保存操作を経た胚によるものである。しかし体外受精や凍結保存に伴う処置が、誕生した子の生涯にわたって健康に与えるリスクに関しては十分に明らかにされているとは言い難い。これは追跡調査に伴う人権問題に加え、初期にこれらの操作を受けて誕生した子が現時点でまだ約30歳前後であるという状況下で、検証可能な健康問題として社会的に顕在化していない可能性にも起因する。海外では、体外受精に伴う知的障害の発生頻度の上昇が有為差をもって検出されている、という報告がある(Sandin *et al.* JAMA 310, 75-84, 2013)。



我々は、DNAの酸化が生殖細胞突然変異、体細胞突然変異の両方を増加させることを明らかにしてきた。その結果に基づいて体外受精に伴う影響を考えた場合、不妊治療の過程で受精卵が体外で子宮内に比べて高濃度の酸素にさらされる培養条件や、凍結保存のストレスに起因するDNAへの障害等によって、生まれてくる子のゲノム障害は避けられないのではないかと考えた。これは体外受精や凍結保存を経た出産が今後さらに増加することが予想される中、非常に重要な問題であるが、体外受精に伴う処置が生まれてくる子のゲノムに与える影響を調べた研究は、私が知る限り未だ報告がない。将来的にも、ヒトを対象とした体外受精や凍結処理がゲノムに与える影響の解析は倫理的な問題、あるいは比較すべき健康人サンプルの条件設定の難易度等を考えると実現は容易ではないと考えられる。

我々の生殖細胞自然突然変異の検出系は、遺伝的背景をC57BL/6Jに揃えたマウス群を使用し、かつ自然状態(薬剤処理等が無い条件)で高感度にゲノム酸化に起因する突然変異を検出することが可能なため、体外受精・凍結保存を経て生まれた個体のサンプルを自然交配で生まれた個体のものと比較することで、体外受精・凍結保存といった不妊治療に伴う処置に起因するゲノムの酸化障害を定量・評価することが可能であると考えた。

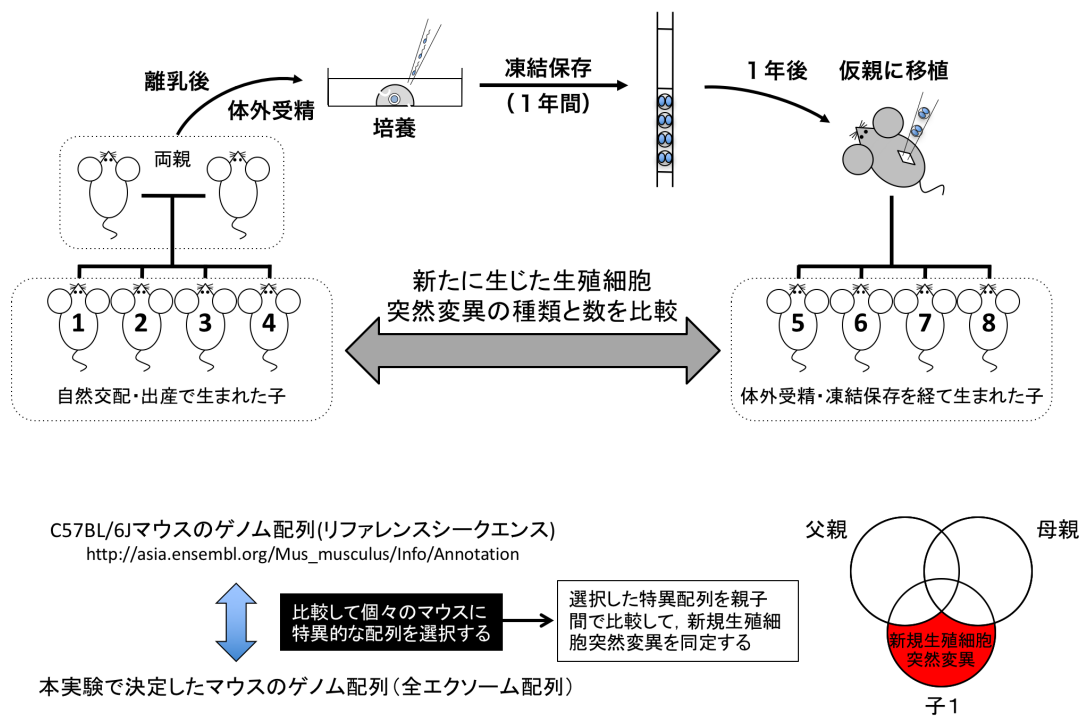
## 2. 研究の目的

本研究は「マウスを用いて直接的に突然変異頻度の変化を観察することで体外受精や凍結保存が健康に与えるリスクの予測・評価を行う」ことを目的とする。

## 3. 研究の方法

我々が作製したMTH1/OGG1/MUTYH三重欠損(TOY-KO)マウスは、生殖細胞自然突然変異率が $2.0 \times 10^{-7}$  mutations/ntd/generation(野生型の約17倍)であり、全エクソーム解析を用いることで子マウス1匹あたり約20個の8-オキソグアニンに起因する突然変異を検出することができる。このマウス1ペアを用いて自然交配で生まれた子と体外受精に伴う処置(排卵ホルモン処理 体外受精 培養 凍結保存 移植)を経て生まれた子を準備する。

それぞれの子のゲノム情報を親のものと比較することで、子に新たに生じた突然変異を同定し、さらにそれらを自然交配群と体外受精群で比較することで、体外受精に伴う処置に起因する遺伝的リスクが存在するか否か、評価を行う。当初の実験計画の概要を図に示す。



#### 4. 研究成果

計画調書作成時に【予想される問題点】で指摘した通り、採卵(母)マウスが1匹のため、十分な数の凍結胚を調整できない状況になったため、母マウスを複数(6匹)準備して独立した採卵、受精を行なった。実際にホルモンに応答し、排卵が確認できた4匹からそれぞれ15個、20個、11個、5個の卵を体外受精に用いて4個、6個、5個、2個の2細胞胚を得ることができた。これらは現在、液体窒素内で凍結保存中(1年間)であり、まもなく仮親に移植を開始する予定である。凍結胚由来の子マウスが得られたら順次エクソーム解析を行い生殖細胞突然変異頻度とそのスペクトラムの解析を行う予定である。これらのマウスにおいて受精、発生の効率が野生型マウスと比較してかなり低いのは、両親の自然突然変異頻度の上昇によるものではないかと考えられる。この結果は、自然交配においても世代を経るに連れて出産数の低下が見られることと矛盾しない。それぞれの凍結胚数が少ないため、毛色が異なるマウスの胚と合わせて移植する予定だが、胚細胞の自然突然変異頻度の上昇が着床、妊娠効率に影響を与える可能性がある。それぞれの親マウスに関しては tail を保存、一部はエクソーム解析を行い、自然突然変異頻度の上昇と突然変異スペクトラムの偏り(G to T transversion の特異的な上昇)を確認した。

自然突然変異頻度の極端な上昇が実験系に影響を与えたため、よりマイルドな自然突然変異上昇を示す変異体を探すため、MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスと同じ家系から MTH1/OGG1, MTH1/MUTYH, OGG1/MUTYH の各二重欠損マウス及び、MTH1, OGG1, MUTYH の単独欠損マウスの系統を樹立し、それぞれの自然突然変異頻度の発生を計測する準備を行なっている。現在までに全ての系統で両親と子供2匹の tail を採取、そのうち MTH1/MUTYH 二重欠損マウスに関してはエクソーム解析を行った。この MTH1/MUTYH 二重欠損マウスは本研究で初めて樹立、生存が確認された系統である。このマウス系統では自然突然変異の上昇は MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスの約 1/10 に抑えられていた。さらにその突然変異スペクトラムは予想に反して G to T transversion は観察されず、別経路の 8-オキシグアニンに起因する突然変異発生機構、あるいは未知の突然変異発生機構の存在が示唆された。今後、各二重欠損及び単独欠損マウスの自然突然変異頻度と変異スペクトラムの解析を行なっていく計画である。

マウス個体を対象とした変異解析は、実際に世代を超えて遺伝する変異の解析を個体レベルで行えるという利点があるが、一方で時間と経費がかかり、ハイスループットの実験系を組むことが難しい。一方で突然変異の発生確認には親細胞と子細胞のゲノムの比較が必要であり、親細胞の情報を得ることができない分裂細胞を用いた系への応用は困難であった。今回、我々は次世代シーケンサーの特徴と生殖細胞突然変異の検出系の特徴を組み合わせることで、全ゲノムレベルで細胞の自然突然変異頻度を計測する方法を考案した(詳細は Sakumi K. Germline mutation: *de novo* mutation in reproductive lineage cells. *Genes Genet Syst.* 94(1):3-12, 2019 参照)。体外受精に伴う胚の培養だけでなく、再生医療に伴う幹細胞の培養もまた生体の外、高酸素濃度の環境下で行われており、これら *in vitro* における培養環境下での自然突然変異発生の計測と抑制方法の樹立は今後さらに重要性を増すと考えられる。各種ヒト細胞の種々の培養環境下における自然突然変異発生の計測を行ないたいと考えている。

2016年の時点で、全出生数における体外受精で生まれた子の割合は5.5%に達し、さらにその8割以上が凍結保存処置を経た上での体外受精によるものであると報告されている(引用元)。これらの凍結保存処置を経て生まれた体外受精児には約2%という少ない割合で何らかの異常の発生が報告されている。卵子の老化に起因するもの、採卵、凍結処置時のダメージに加えてゲノムへのダメージに起因する可能性も否定できない。また、ゲノムへのダメージは一生涯、さらに子孫にまで引き継がれるものであり、その発生は極力抑制されなければならないものである。引き続き、不妊治療に伴う次世代へのゲノムダメージの蓄積の実態解明を進め、その抑制方法を探することは重要な課題であると認識している。一方で、ヒトの生物学的な特徴として生殖・出産・育児の適齢年齢は20歳～30歳であるということを広く知らしめる教育と、それにより一般人が不妊治療に頼らずにすむ社会環境の構築が最も重要であるということをも最後に主張しておきたいと思う。

(引用元)

- ・内閣府出生数・出生率の推移：  
<https://www8.cao.go.jp/shoushi/shoushika/data/shusshou.html>
- ・2016年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2018年7月における登録施設名：  
<http://fa.kyorin.co.jp/jsog/readPDF.php?file=70/9/070091817.pdf>

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. Ohno M. Toward understanding *de novo* germline mutations in mammals. *Genes Genet Syst.* 94(1):1, 2019. doi: 10.1266/ggs.94.1.
2. Sakumi K. Germline mutation: *de novo* mutation in reproductive lineage cells. *Genes Genet Syst.* 94(1):3-12, 2019. doi: 10.1266/ggs.18-00055. Epub 2019 Mar 21.
3. Ohno M. Spontaneous *de novo* germline mutations in humans and mice: rates, spectra, causes and consequences. *Genes Genet Syst.* 94(1):13-22, 2019. doi: 10.1266/ggs.18-00015. Epub 2018 Nov 1.
4. Ohno M, Sakumi K, Takano T. Analysis of *de novo* germline genome mutations: Is genome mutation driving our continued evolution? *Impact: Connecting Global Research*, 63-65, 2018. doi: org/10.21820/23987073.2018.3.63
5. Castillo E, Leon J, Mazzei G, Abolhassani N, Haruyama N, Saito T, Saido T, Hokama M, Iwaki T, Ohara T, Ninomiya T, Kiyohara Y, Sakumi K, LaFerla FM, Nakabeppu Y. Comparative profiling of cortical gene expression in Alzheimer's disease patients and mouse models demonstrates a link between amyloidosis and neuroinflammation. *Sci Rep* 7, 17762, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-17999-3.
6. Li GH, Akatsuka S, Chew SH, Jiang L, Nishiyama T, Sakamoto A, Takahashi T, Futakuchi M, Suzuki H, Sakumi K, Nakabeppu Y, Toyokuni S. Fenton reaction-induced renal carcinogenesis in *Mut*h-deficient mice exhibits less chromosomal aberrations than the rat model. *Pathol Int* 67, 564-574, 2017. doi: 10.1111/pin.12598. Epub 2017 Oct 13.
7. 作見 邦彦. 生殖細胞突然変異. *BIO Clinica*, 32, 90-96, 2017.

[学会発表](計13件)

1. 大野みずき, 鷹野典子, 作見邦彦. 生殖細胞ゲノム変異の発生原因と遺伝情報維持を担う分子機構. 第41回日本分子生物学会年会, 2018.
2. Naoki Haruyama, Kunihiro Sakumi, Atsuhisa Katogi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu. Accumulation of 8-oxoguanine in nuclear genome of neural progenitors in aged mouse brain causes atrophy of major island of Calleja resulting in locomotor hyperactivity. The 41st Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, 2018.
3. Mizuki Ohno, Noriko Takano, Kunihiro Sakumi, Teruhisa Tsuzuki. The impact of DNA repair status on germline mutation rate and spectra in mice. SMBE2018 (Society for

Molecular Biology and Evolution), 2018.

4. Yusaku Nakabeppu, Nona Abolhassani, Eiko Ohta, Zijing Sheng, Mizuki Ohno, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi. Oxidative DNA damage and Repair in Cancer and Aging. The 14th Japan - Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2018.
5. Guianfranco Mazzei, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. Impaired hippocampal neurogenesis in APP mouse model of Alzheimer disease. Third International meeting in Bioscience (Young Peruvian Scientist Network), 2017.
6. 作見 邦彦, 大野 みずき, 中別府 雄作. 遺伝性疾患自然発症モデル動物としての mutator mouse. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.
7. 續 輝久, 大野 みずき, 鷹野 典子, 田口 健一, 中別府 雄作, 中津 可道. DNA 修復 遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発発がんに関する研究. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.
8. 春山 直樹, 作見 邦彦, 加藤木 敦央, 土本 大介, 中別府 雄作. 側坐核・カレハ島の 新生 GABA ニューロンへの 8-オキソグアニンの蓄積は加齢マウスの多動の原因となる. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.
9. Naoki Haruyama, Kunihiko Sakumi, Atsuhisa Katogi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu. Accumulation of 8-oxoguanine in the nuclei of newly-generated GABAergic neurons in the nucleus accumbens and islands of Calleja contributes to locomotor hyperactivity in aged mice. The 27th Hot Spring Harbor International Symposium, 2017.
10. 大野 みずき, 鷹野 典子, 佐々木 史子, 作見 邦彦, 中別府 雄作, 中津 可道, 續 輝久. 遺伝性大腸がんモデルマウスにおける酸化ストレス誘発発がんと体細胞突然変異の解析. 日本放射線影響学会 第 60 回大会, 2017.
11. 大野 みずき, 鷹野 典子, 高野 京子, 作見 邦彦, 中別府 雄作, 中津 可道, 續 輝久. Somatic mutation analysis of oxidative stress-induced colon cancer model. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.
12. 赤塚 慎也, 李 光華, 作見 邦彦, 中別府 雄作, 二口 充, 鈴木 拓, 豊國 伸哉. Ferric nitrilotriacetate induced renal tumorigenesis in MUTYH-deficient mice. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.
13. Naoki Haruyama, Atsuhisa Katogi, Kunihiko Sakumi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu. Nuclear accumulation of 8-oxoguanine in nucleus accumbens neurons contributes to age-related locomotor hyperactivity in Mth1/Ogg1-double knockout mice. 九州大学教育改革シンポジウム 2017, 2017.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大野 みずき

ローマ字氏名: (OHNO Mizuki)

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 医学研究院

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 70380524

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。