

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19347

研究課題名(和文)高齢卵子における紡錘体の位置の異常と不妊の関連性

研究課題名(英文)Relationship between the position of the spindle in aged oocytes and infertility

研究代表者

佐藤 政充(Sato, Masamitsu)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：50447356

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)：不妊や先天性的染色体異常など、生殖医療および生殖補助医療の重要性が高く叫ばれる昨今、基礎医学・基礎研究からスタートして、その成果を不妊治療の現場に活かすアプローチの研究が必要とされる。そこで本研究は、基礎生物学の観点から不妊の原因を探ることを目指した。具体的には、卵子(卵母細胞)が何故経年劣化と呼ばれるような現象を引き起こすのか、その原因究を目指す。観察の結果、卵母細胞の経年劣化のひとつとして、卵母細胞が放出した第一極体に対する第二分裂紡錘体の相対的な位置の異常がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この紡錘体の位置の異常は、今後の生殖補助医療において、卵母細胞の劣化を示すひとつの指標となりうる。すなわち、不妊治療の現場において卵母細胞を採卵した際に、その中から劣化の兆候が見られず、出生の見込みがある卵母細胞を選択する際に、紡錘体の位置情報を劣化の指標として選別することで、妊娠の可能性を向上させることができるのではないかと想像される。このように、本研究の成果は、今後の臨床への応用の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：ART (assisted reproductive technology) is recently becoming very important to reduce risks of chromosome abnormalities and improve the infertility problems. It is therefore essential to understand the mechanisms of infertility and chromosome trisomy from the viewpoint of basic science and to develop such knowledge into technologies for improvement of infertility. Here we tried to understand reasons for infertility from the viewpoint cell biology. Particularly we focused on the spindle in oocytes, which is often displaced in aged oocytes. Our research highlighted that such displacement of the spindle in unfertilized oocytes could serve as a guide to choose promising oocytes that have no sign of aging in terms of spindle positioning.

研究分野：細胞生物学

キーワード：卵母細胞 不妊 微小管 減数分裂 染色体

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化や社会情勢が変化していく中で、妊娠・出産や子育てに医療面または日常生活面で問題を抱えるケース、それらに対して官民交えて支援体制を作る必要性などがクローズアップされている。その中のひとつとして、カップルが高齢になるほど妊娠・出産において不妊や先天性の染色体異常などが多発する問題があり、その医学的な原因究明および対策は急務とされてきた。

このように生殖医療および生殖補助医療の重要性が高く叫ばれるようになってきた昨今、基礎医学・基礎理学研究としての配偶子(卵子すなわち卵母細胞および精子)の細胞生物学からスタートして、その成果を不妊治療の現場に活かすアプローチの研究が必要となっている。特に一般的に「卵子の経年劣化」ということが言われるようになった。不妊の原因は卵子側・精子側の原因がともに同程度の頻度で見られるが、卵子はもともと一定数しか存在しないものを長い年月の間維持していくこともあり、特に経年とともに卵子がどのように変化するのかを明確にして、科学的に偏見のないかたちで社会にフィードバックする必要もある。

生殖補助医療の現場においては、採卵した卵母細胞に対して人工授精を施すが、卵母細胞を選別して人工授精および培養・着床に進むことができれば、妊娠率の上昇や母体への負担軽減、カップルへの心理負担の軽減に繋がる可能性が高い。しかしながら現状では、具体的に何を指標に卵母細胞を選別すべきかが明確ではないという課題がある。

## 2. 研究の目的

これらの背景をふまえて、本研究では、基礎生物学の観点から不妊の原因を探ることを目指している。具体的には、卵子がなぜ経年劣化と呼ばれるような現象を引き起こすのかに注目し、その原因究明さらには生殖医療への貢献を目指すものである。

さらに具体的には、本研究では卵母細胞の紡錘体構造に着目して観察をおこなった。既往研究では、マウス卵母細胞の紡錘体の位置が異常である場合、卵母細胞の減数分裂において染色体の分配異常が起きて、受精後に発生できないことが明らかにされている(Leader et al. Nature Cell Biology 2002; Yi et al. Phil Trans Roy Soc B 2013 など)。しかしこれらの研究では、紡錘体が卵母細胞の中央部に陥没してしまう場合に限定されており、これ以外の紡錘体の位置情報の異常については知られていない。

これらに対して、本研究では、卵母細胞が放出した第一極体に対する第二分裂紡錘体の相対的な位置の異常についてこれを「角度異常」と定義して観察することにした。上述のようにこれまで知られている紡錘体が細胞内部に陥没する「陥没異常」とは異なり、紡錘体が表層に留まっているものの位置が異常となるものを「角度異常」と定義して、これらのケースに着目して観察している。

本研究では、ほ乳類であるマウスの卵母細胞において観察をおこない、若齢と高齢のマウスに由来する卵母細胞において、紡錘体の表層における「角度異常」が見られるか、その頻度には週齢との相関があるかを主眼として研究をおこなった。

これらの研究は、麻布大学 伊藤潤哉博士ならびにみなとみらい夢クリニックとの共同研究としておこなっている。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、5週齢および58週齢のC57BL/6J近交系マウスから採卵をおこない、第一極体を放出して減数第二分裂中期に停止している卵母細胞について、第一極体の位置と第二分裂の紡錘体の位置関係を観察した。

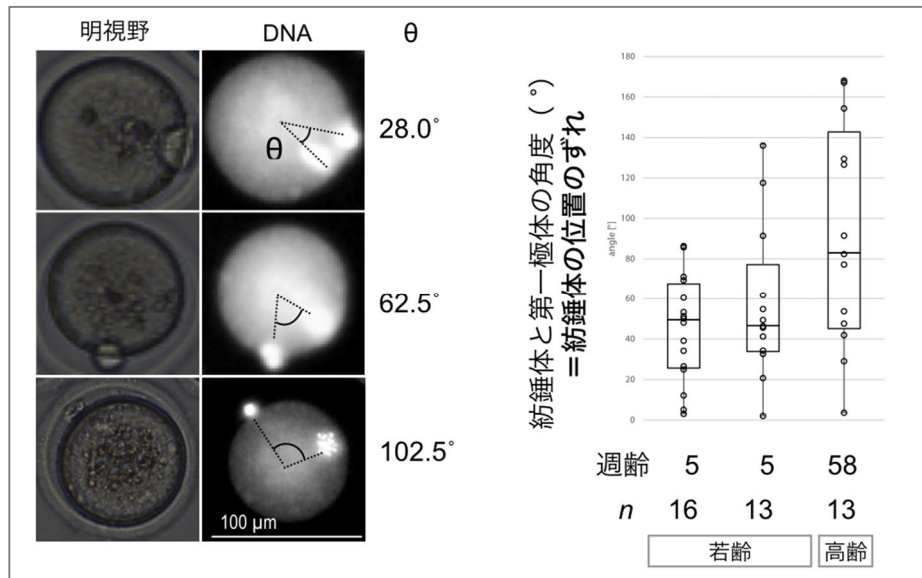
また、紡錘体を構成する微小管に結合するタンパク質 CAMSAP3などを例として、マウスにおいて微小管の異常が発生した場合にどのような組織ならびに器官の異常に繋がるのかを解析した。

## 4. 研究成果

5週齢のC57BL/6J近交系マウスより採卵した卵母細胞のうち、第一極体を放出した状態で減数第二分裂中期に停止している卵母細胞について、第一極体の位置と第二分裂の紡錘体の位置関係を測定した。その結果、大部分の卵母細胞では、両者がなす角度は $20^{\circ}$ ~ $50^{\circ}$ の範囲に分布することが分かった(平均 $45^{\circ}$ )(図)。これに対して58週齢マウスから単離した卵母細胞では角度が $40^{\circ}$ ~ $140^{\circ}$ の範囲で大きくばらつき、平均で約 $90^{\circ}$ となった。卵母細胞の個体において差

がみられるため、必ずしも一概にすべての卵母細胞でというわけではないが、母体マウスの週齢と、卵母細胞において極体と紡錘体がなす角度の値には一定の相関が見られる結果となった。

これらの結果は、卵子の経年による変化は、染色体を分配する紡錘体の位置すなわち「角度」としても現れていることを示唆する。これらの細胞においては、紡錘体は細胞内部に陥没していなかった。従来解析されていたような何らかの遺伝子ノックアウトマウスにおいては、紡錘体の異常が顕著にあらわれ、その結果として紡錘体が卵母細胞内に陥没するという視認しやすい表現型に出た。しかし、本研究に用いた、特に疾患と言えるような欠陥をもたない野生型マウスにおいては、そのような陥没異常ではなく、紡錘体は卵母細胞の表面に留まりながらも位置が異常になる、一見すると正常と判断してしまうようなマイナーな表現型として現れると予想される。



今後は、この角度のずれが受精から着床および胚盤胞期までの発生に至る過程に影響を及ぼすのかを調査することで、角度とこれらの因果関係を検証する必要がある。これらの基礎研究の成果は直接、生殖補助医療の現場にフィードバックすることができると考えられる。

また、CAMSAP3の変異マウスにおいては既に知られていた小腸上皮のみならず腎臓上皮においても強い表現型を示すことがわかった。今後は、このマウスの卵母細胞に注目して、微小管の位置と微小管の関係について解析を継続していく。

さらに、真核生物の減数分裂における微小管の挙動のモデル系として、分子機構の追究には分裂酵母も用いて研究をおこなっており、そこでは通常の体細胞分裂とは異なり、減数分裂特有の細胞分裂のシステムが働いていることを明らかにしている。これらの減数分裂ならではの現象とその背景にある分子メカニズムを追及し続けることで、不妊の原因が明らかになっていくものと期待している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hayato Tsuyuzaki, Masahito Hosokawa, Koji Arikawa, Takuya Yoda, Naoyuki Okada, Haruko Takeyama, Masamitsu Sato	4. 巻 11
2. 論文標題 Time-lapse single-cell transcriptomics reveals modulation of histone H3 for dormancy breaking in fission yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15060-y	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 Hirohisa Ebina, Liang Ji, Masamitsu Sato	4. 巻 -
2. 論文標題 CLASP promotes microtubule bundling in metaphase spindle independently of Ase1/PRC1 in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio.045716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.045716	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 Yutaka Shirasugi and Masamitsu Sato	4. 巻 30
2. 論文標題 Kinetochore-mediated outward force promotes spindle pole separation in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E19-07-0366	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 Mitsuhata Yuto, Abe Takaya, Misaki Kazuyo, Nakajima Yuna, Kiriya Keita, Kawasaki Miwa, Kiyonari Hiroshi, Takeichi Masatoshi, Toya Mika, Sato Masamitsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Cyst formation in proximal renal tubules caused by dysfunction of the microtubule minus-end regulator CAMSAP3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85416-x	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 Li Seibun, Toya Mika, Sato Masamitsu	4. 巻 784
2. 論文標題 Simplification of nutritional conditions in transformation procedures for genome editing with the CRISPR/Cas9 system for fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145595 ~ 145595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145595	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 Tsuyuzaki Hayato, Ujiie Ryosuke, Sato Masamitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Wake-up alarm: virtual time-lapse gene expression landscape illuminates mechanisms underlying dormancy breaking of germinating spores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-021-01177-0	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 Sato Masamitsu, Kakui Yasutaka, Toya Mika	4. 巻 9
2. 論文標題 Tell the Difference Between Mitosis and Meiosis: Interplay Between Chromosomes, Cytoskeleton, and Cell Cycle Regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 660322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.660322	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8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 白杉豊、工藤大和、並木貴文、影山敦子、寺川純平、大黒多希子、前澤創、長谷川嘉則、小原収、佐藤政充、伊藤潤哉、柏崎直巳
2. 発表標題 子宮上皮におけるシグナル伝達兼転写活性化因子 3 (Stat3) はプロジェステロンシグナルを介して胚着床を制御する
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤政充、戸谷美夏
2. 発表標題 微小管が形成される場所・時間を運動して制御する分子メカニズム
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤政充、露崎隼、岡田直幸
2. 発表標題 分裂酵母1細胞RNA-seq導入による孢子発芽時のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masamitsu Sato
2. 発表標題 Temporal Change of Single-Cell Transcriptome Reveals a “Wake-Up” Signal of Yeast Cells upon Nutrition Change
3. 学会等名 2018 Core-to-core symposium Biotechnology Towards Next Generation Single Cell Analysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yutaka Shirasugi, Masamitsu Sato
2. 発表標題 CDK-dependent nuclear accumulation of Alp7/TACC promotes the assembly of the radial array of microtubules in meiosis I.
3. 学会等名 第70回細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirohisa Ebina, Liang Ji, Masamitsu Sato
2. 発表標題 Functional analysis of fission yeast CLASP in assembling pre-anaphase spindle
3. 学会等名 第70回細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mana Katsuyama, Tomonari Sunaga, Masamitsu Sato
2. 発表標題 Functional linkage between the $\gamma$ -tubulin ring complex and Alp7/TACC in microtubule nucleation
3. 学会等名 第70回細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuto Mitsuhashi, Mika Toya, Masatoshi Takeichi, Masamitsu Sato
2. 発表標題 Organization of microtubules in small intestinal crypt cells
3. 学会等名 第70回細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

早稲田大学生命医科学科 佐藤研究室 <a href="http://www.sato.biomed.sci.waseda.ac.jp/">http://www.sato.biomed.sci.waseda.ac.jp/</a>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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