

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310141

研究課題名(和文) ヒトにおける顕微授精の影響

研究課題名(英文) The effects of the intracytoplasmic sperm injection on the gene expression regulation in the human preimplantation embryo.

研究代表者

幸田 尚 (Kohda, Takashi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：60211893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,900,000円

研究成果の概要(和文)：我が国においても生殖補助医療における体外受精の件数は年々増加しており、またその約半数で顕微授精(ICSI)が適用されている。

本研究はヒトの初期発生胚に及ぼすICSIの影響を明らかにし、その技術の向上・改善を目指すものである。まずT7 RNA polymeraseを用いて単一胚からRNA-seqを行う実験系を確立した。これを用いて、生殖補助医療において移植に用いられず廃棄される胚の提供を受け、胚盤胞期のヒト胚においてICSIによって発現の影響を受ける遺伝子を複数同定することに成功した。これらの遺伝子は、ICSI技術の改善のための有用なマーカーとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The application of the in vitro fertilization (IVF) in assisted reproductive technology has been increased since its first introduction. Recently, the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique is used in about half of the IVF cases in Japan. The aim of this study is to evaluate the effects of ICSI on the transcription regulation in human early development and to improve the ICSI method. First, we successfully established the RNA amplification protocol for single embryo RNA-seq analysis using T7 RNA polymerase. Then we analyzed the gene expression profile of the human blastocysts that were not transferred in assisted reproductive technologies. As the results, we identified the genes that affected their expression by ICSI procedure. These genes expected to be the useful markers to improve the ICSI technique.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：顕微授精 体外受精 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における体外受精による出生数は本研究開始時にすでに累計で20万人を超え、年間およそ2万人、すなわち50人に一人の子供が体外受精によって生まれていた。この数はその後さらに増加を続けている。また国の少子化対策の一環として特定不妊治療費助成事業も推進されており、体外受精の基盤的な技術の向上と安全性の維持は重要な課題である。顕微受精(ICSJ)は受精に際し精子の頭部を顕微鏡下で直接卵に注入することによって受精を行う技術で、近年、ヒトの生殖医療においても急速にその利用が拡大している。我が国の体外受精のほぼ半数がICSJによるものになっており、その数は増加の傾向にある。一方、体外受精技術そのものが、初期胚の発生やその後の成長過程においてどのような影響を及ぼすかという問題については、必ずしも十分な検討が加えられないまま新技術の開発・応用が進められてきた側面もある。

われわれはマウスモデル系でのゲノムワイドな解析によりICSJ技術が個体発生、成長過程における遺伝子発現へ与える影響を初めて明らかにした。遺伝的背景や、実験条件を厳密に制御することにより、この技術によって作製された胚は発生の早い段階から遺伝子発現プロファイルの変化が引き起され、それが少なくとも出生仔の段階でも認められることが明らかになった。これはICSJ技術そのものに起因する問題が存在することを意味しており、ヒトにおいても同様の影響があることを強く予想させた。しかしながらヒトのICSJ技術については、体外受精の影響についての疫学的調査は行われてきたものの、胚そのものの遺伝子発現調節などへの影響を分子生物学的に調べる研究はこれまで行われてこなかった。そこで、影響を受ける(受けやすい)遺伝子と、その結果として生じる表現型を明らかにすること、さらにはICSJ技術の改良を進めこれを回避するための方法論を示すことは重要な課題である。

### 2. 研究の目的

ヒトの生殖補助医療において、ICSJおよび通常の体外受精(cIVF)によって受精したヒト胚における遺伝子発現プロファイルを解析し、ICSJによって発現制御に影響を受ける遺伝子を同定すること、またこれらの遺伝子を指標としてICSJ技術の安全性の確保や技術の向上を目指すことが本研究の目的である。

このため、移植に用いられず廃棄される胚を用いて、それぞれの胚の遺伝子発現プロファイルを比較し、ヒトにおいてICSJの操作によって影響を受ける遺伝子を同定することを計画した。このため、ヒト体外受精において胚を凍結保存する胚盤胞期までのサンプル一つずつから得られる極微量のRNAを用いて初期胚1つずつからRNA-seqによ

って遺伝子発現プロファイルを再現性良く取得する実験系の確立も本研究の重要な目的の一つである。

また、遺伝的背景が均一な実験動物を用いて厳密にICSJの影響を検定できるマウス初期胚を用いて、本研究で確立する実験手法を用いて単一胚から初期胚の遺伝子発現プロファイルを取得するとともに、zygotic activationによって受精後新たに発現を開始する遺伝子を同定するとともに、cIVFとICSJによって受精した胚の間で発現量が優位に異なる遺伝子の同定を行う。

更に、同様の手法を用いてヒトの初期胚の解析を行い、cIVFとICSJによって受精した胚の遺伝子発現プロファイルを比較し、ヒトの初期胚においてもICSJによって遺伝子発現調節が影響を受ける遺伝子を同定することにより、ヒトの体外受精においてICSJ技術の安全性の確保や技術の向上を目指すための指標とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 微量サンプルからのRNA-seq法の確立

マウスの着床前胚を用いて、胚一つからRNAを単離し、RNA-seq用のライブラリを作成する系の検討を行った。2細胞期胚1つからtotal RNAを抽出し、T7 RNA polymerase promoterの配列を付加したoligo dTをプライマーとしてcDNAを合成、これをtemplateとして用いてT7 RNA polymeraseによって転写することによってcRNAを合成する。このcRNAを用いてRNA-seq用のライブラリを作成し、Illumina社のシーケンサーを用いてRNA-seqを行う系を検討した。初期胚1つからライブラリを作成した場合、10個の胚のRNAをまとめてRNA抽出を行いそのうちの1/10を2回独立に増幅してライブラリを作成するなどして、十分な再現性と解析精度が得られるか検討を行った。

(2) マウス初期胚における遺伝子発現解析  
純系のマウス間での多型を用いて、アレルの違いも含めた発現解析を行うため、C57BL/6とDBA2の2系統のマウスを用いて2細胞期及び桑実胚期の胚を作成(1)で検討した手法を用いてRNA-seqにより遺伝子の発現解析を行った。

#### (3) ヒト体外受精胚の解析

連携研究者の所属する施設を含め多施設共同研究として5施設から、体外受精に用いるために作成、凍結保存されたヒト胚で、移植に用いられることなく廃棄することが決まった胚について、十分なインフォームドコンセントを得た上で検体として胚の提供を受けた。解析のために検体提供の依頼を開始するにあたり、事前に日本産科婦人科学会の研究登録を行った上で東京医科歯科大学難治疾患研究所、同医学部付属病院の倫理審査委員会の承認を受けた。ヒト胚についてもマ

ウスと同様(1)で検討した手法を用いて RNA-seq により遺伝子の発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 微量サンプルからの RNA-seq 法の確立

マウスの2細胞期胚から total RNA を抽出し、「方法」で述べたように胚1つ相当分から T7 RNA polymerase を用いて aRNA を増幅し、これを用いて RNA-seq を行う系を確立した。シーケンスリードをマウスゲノムにマッピング後、refseq gene に対して rpkm を計算して遺伝子発現プロフィールとし、2回の独立した増幅の結果を比較した結果、 $R=0.986$  と高い相関性を示した(それぞれの rpkm 値から作成したスキャッタープロットを図1に示す)。

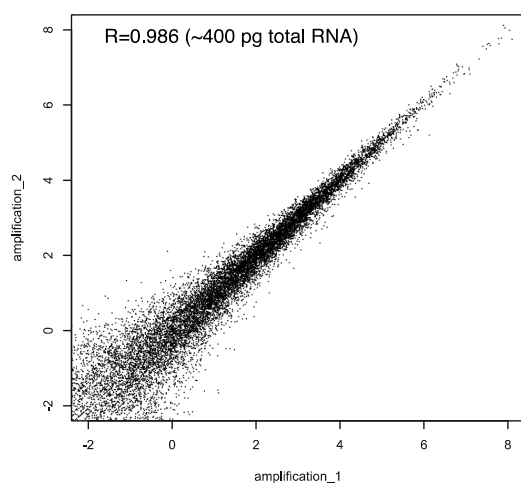


図1 単一胚からの遺伝子発現解析系の再現性

この結果から、本研究で検討したプロトコルは 400 pg 程度の total RNA から高い再現性をもって発現量にして5桁のダイナミックレンジをで発現解析が可能であることを示している。

##### (2) マウス初期胚における遺伝子発現解析

C57BL/6 の卵と DBA2 の精子を用いて作成したマウス初期胚の RNA-seq 解析を行った。受精において cIVF と ICSI でそれぞれ8個体の胚を作成し、受精後 18, 24, 30, 72 時間の時点でサンプリングを行った。それぞれのサンプルの遺伝子発現プロフィールを rpkm 値で計算したものをを用いて主成分分析した結果を図2に示す。発生に従った遺伝子発現プロフィールの推移を見ることができるが、この結果から、cIVF によって受精した胚の遺伝子発現の推移と比較すると ICSI によって受精した胚のプロフィールの推移は、受精後 18 時間から 30 時間にかけての2細胞期の間で全体に変化が遅れる傾向にあることが認められた。更に、個々の遺伝子発現について解析を行うと、図2で見られた発生の遅れに対応するように ICSI と cIVF の胚で発現が異なる遺伝子が多数認められたが、発現変化の遅れだけでは説明のできない遺伝子

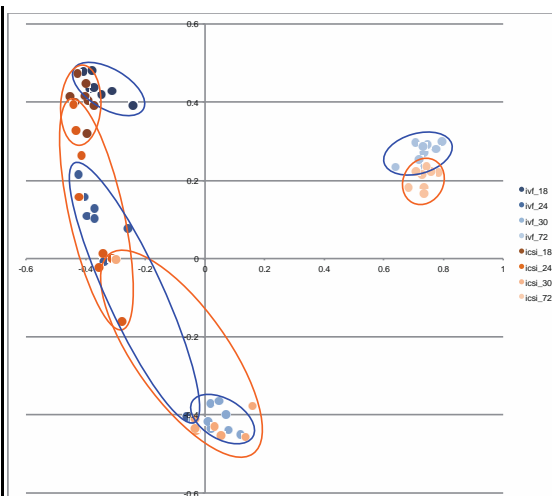


図2 ICSI および IVF で作成したマウス初期胚の遺伝子発現プロフィール

も複数存在することが明らかとなった。

また、発生のごく初期の RNA の多くは未受精卵からの持ち込みである maternal RNA で、受精後に新たに合成された RNA はごく一部であると考えられる。一方、精子はほとんど細胞質を持たないため、初期胚においては精子由来の RNA の残存はほとんど考慮する必要がないと考えられる。そこで、C57BL/6 と DBA2 の間の1塩基多型を用いて発現アレルごとに RNA-seq のリードを集計し、精子側のアレルに由来する発現の解析を行った。また、発現が卵に由来するアレルに特異的な遺伝子についても、未受精卵で発現が認められない遺伝子については、受精後に発現する zygotic な転写物であると考えることができる。これらの解析の結果、ゲノムインプリンティングを受ける Phf17 遺伝子は2細胞期においても父親側のアレルからのみ発現することが明らかになったが、インプリントを受ける遺伝子以外にも多くの遺伝子がマウスにおいて zygotic activation の時期である2細胞期で片親性発現を示すことを明らかにした。

##### (3) ヒト体外受精胚の解析

ヒトにおいては、zygotic activation はマウスよりは遅く、桑実胚から胚盤胞期にかけて、主たる zygotic な遺伝子発現が開始されると言われている。そこで、体外受精において作成、凍結保存されたヒト胚で、移植に用いられることなく廃棄することが決まった胚の提供を受け、胚盤胞期のヒト胚の解析を行った。その結果、cIVF によって受精した胚と ICSI によって受精した胚の2群の間で有意に発現の違いを示す遺伝子を複数同定することに成功した。これらの遺伝子の発現や、そのエピジェネティックな修飾は、ICSI 技術の改善のための有用なマーカーとなることが期待される。マウスの初期胚における ICSI の影響の解析結果と併せ、研究成果を現在投稿準備中である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kohda T. Effects of embryonic manipulation and epigenetics. (Review) J Hum Genet **58**(7):416-420. (2013) doi: 10.1038/jhg.2013.61 (査読あり)

Kohda T and Ishino F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. (Review) Phillos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **368**(1609):20120353 (2013) doi: 10.1098/rstb.2012.0353 (査読あり)

[学会発表](計11件)

幸田 尚、高木 清考、及川 真実、越後 貫 成美、井上 貴美子、金児-石野 知子、小倉 淳郎、石野 史敏 Zygotic gene activation と顕微授精によって誘導される遺伝子発現変化 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日 (パシフィコ横浜、神奈川)

幸田 尚 着床前の遺伝子発現制御と体外受精 Art Forum 2014 年 7 月 31 日(ハイアットリージェンシー東京、東京)

幸田 尚、高木 清考、及川 真実、越後 貫 成美、井上 貴美子、金児 石野 知子、小倉 淳郎、石野 史敏 マウス初期胚で顕微授精によって誘導される遺伝子発現調節の変化 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日(神戸国際会議場、神戸)

高木 清考、幸田 尚、及川 真実、越後 貫 成美、井上 貴美子、金児-石野 知子、小倉 淳郎、石野 史敏 マウス着床前胚における父親性発現遺伝子の解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日(神戸国際会議場、神戸)

幸田 尚 顕微授精によって誘導される遺伝子発現の変化とゲノムのエピジェネティックな非対称性、生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御-第 1 回公開シンポジウム 2013 年 11 月 15 日(大阪大学微生物病研究所、大阪)

幸田 尚 マウス初期胚のエピジェネティックな非対称性と遺伝子発現、大阪大学蛋白質研究所セミナー DNA メチル化の制御機構 - メチル化模様形成、維持と消去 - 2013 年 11 月 1 日(大阪大学蛋白質研究所、大阪)

幸田 尚、高木 清考、及川 真実、越後 貫 成美、井上 貴美子、小倉 淳郎、金児-石野 知子、石野 史敏 顕微授精によって発生初期に誘導される遺伝子発現の変化

第 7 回日本エピジェネティクス研究会  
年会 2013 年 5 月 30-31 日(奈良県新  
公会堂、奈良)

高木 清考、幸田 尚、及川 真実、小倉 淳郎、石野 史敏 マウスを用いた初期胚の父系発現遺伝子の同定 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 2013 年 5 月 30-31 日(奈良県新公会堂、奈良)

幸田 尚、次世代シーケンサーを用いた胚操作のマウス初期胚への影響の解析 第 60 回日本実験動物学会総会 2013 年 5 月 15-16 日(筑波国際会議場、茨城)

Takashi Kohda, Kiyotaka Takagi, Mami Oikawa, Narumi Ogonuki, Kimiko Inoue, Tomoko Kaneko-Ishino, Teruhiko Wakayama, Atsuo Ogura, Fumitoshi Ishino: 11<sup>th</sup> Transgenic Technology Meeting: Gene expression changes induced by intracitoplasmic sperm injection. February 26, 2013 (Baiyun International Convention Center, Guangzhou, China)

幸田 尚、高木 清考、及川 真実、越後 貫 成美、井上 貴美子、小倉 淳郎、金児-石野 知子、石野 史敏 顕微授精によって最初に誘導される遺伝子発現調節の変化第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11-14 日(福岡国際会議場、福岡)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/epgn/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

幸田 尚 ( KOHDA, Takashi )  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
研究者番号：60211893

(2)研究分担者

( )  
研究者番号：

(3)連携研究者

久保田 俊郎 ( KUBOTA, Toshiro )  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号：50126223

堤 治 ( Tsutsumi, Osamu )  
国際医療福祉大学・大学院医療福祉学研究  
科・教授  
研究者番号：60134574