

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16803

研究課題名（和文）体外受精が胎児の性決定に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of in vitro fertilization on fetal sex determination

研究代表者

岡下 修己（Naoki, Okashita）

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：10757933

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）：本研究において、体外受精(IVF)が性分化の脆弱な Jmjd1a欠損マウス(XY)の性転換を促進することが明らかになった。さらに、体外受精がどのようなメカニズムで性転換を促進するのか解析を行った結果、初期胚の体外受精・培養期間中においてSryプロモーターの高DNAメチル化が誘導されること、さらにこの高メチル化が初期胚発生中におけるDNAメチル化のリプログラミングに影響を受けることなく性決定期間まで維持されることが明らかになった。本研究課題の遂行により、体外受精・培養期間におけるSryプロモーターのDNAメチル化異常が性転換促進の原因であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、エピゲノムの観点から性決定メカニズムを理解する独自のテーマであり、学術的に価値のある成果に繋がる非常に意義のある研究である。さらに、本研究課題は学術的価値だけでなく医学的な意義も大きい。本課題の遂行によって、体外受精がエピゲノム修飾の構築エラーを誘発し、胎児の性決定に影響を及ぼすことが明らかになれば、生殖補助医療によるエピゲノム修飾の異常を起因とした疾患の発症メカニズム解明やその治療を目的とした研究の道しるべになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that IVF enhances sex reversal of XY Jmjd1a / mice. Furthermore, we used molecular analyses and rescue studies to uncover the mechanisms underlying the IVF effect. Our results indicate that in vitro culture induces DNA hypermethylation at Sry promoter, and that this is maintained until the sex-determining period irrespective of DNA methylation reprogramming during early embryogenesis, and thus abnormal Sry induction is responsible for the sex reversal.

研究分野：分子生物学

キーワード：体外受精 体外培養 性決定 エピゲノム DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム修飾 (DNA のメチル化及びヒストンの化学修飾) は様々な生命現象の分子基盤を担っており、その制御はほ乳類が発生・分化するうえで、遺伝子を時間的・空間的に正しく発現させるための重要な役割を果たしている。

体外受精などの高度生殖補助医療の実施件数は、年々、増加傾向にある。一方でそれらの治療が胎児に及ぼす影響については追跡調査を行う必要があり、完全に把握することは困難である。近年、生殖補助医療による胎児への影響を疑う研究が進んでおり、エピゲノム修飾の異常を起因とした疾患 (ゲノムインプリンティング異常症など) を有する子供の割合が自然妊娠で生まれた場合に比べ、生殖補助医療で生まれた場合において高い傾向にあることが報告されている。受精直後の受精卵では、新たな個体を作り上げていくためにゲノムワイドなエピゲノム修飾の再構築が始まる。この再構築に異常があった場合、様々な疾患の原因になるだけでなく、最悪の場合には個体の死を招いてしまうことから、初期胚における正常なエピゲノムの構築は胎児の生命・健康を左右する重要なイベントであると言える。しかし、体外培養などの特殊な環境に対する受精卵や初期胚の暴露が、エピゲノム修飾の変異を生じさせ、発生・分化にどのような影響を与えているのかは十分には解析されていない。

2. 研究の目的

ほ乳類の性は、性染色体 (X、Y) の組み合わせにより決定し、XY を受け継ぐと雄、XX を受け継ぐと雌になるという先天的ゲノム情報によって決まる。一方で、エピ (後天的) ゲノムの関与についてはほとんど分かっていなかった。Y 染色体上には性決定遺伝子である *Sry* が存在し、この *Sry* が雌雄に分化していない胎児期の生殖腺で一過的に発現することで個体を雄へと誘導する。本研究室では、ヒストン脱メチル化酵素 *Jmjd1a* の遺伝子欠損マウスが XY 型の性染色体であっても雄→雌の性転換を引き起こすことを発見し、*Jmjd1a* がマウスの性決定に機能することを明らかにした。さらに、*Jmjd1a* が *Sry* 遺伝子座の抑制的なエピジェネティックマークであるヒストン H3 のリジン 9 (H3K9) のメチル化修飾を外すことで、その転写活性化を正に調節していることも明らかにした。この論文において、ほ乳類の性は単純な性染色体の組み合わせによって決まるのではなく、厳密なエピゲノム制御によって決定することを世界で初めて示した。

上記の解析において、自然交配により生まれた XY 型 *Jmjd1a* ホモ欠損マウスの全ての個体が性転換を引き起こすわけではなく、精巣と卵巣の両方を有する性転換が不完全な“半陰陽”や性転換を起こさない個体も観察された。しかし、申請者が体外受精により XY 型 *Jmjd1a* ホモ欠損マウスを作製したところ、すべての個体が性転換を引き起こしており、体外受精が胎児の性決定に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで本研究では、体外受精における体外培養などの特殊な環境への受精卵や初期胚の暴露が、その後の胎児の性決定にどのような影響を及ぼすのか明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では雌雄へのバランスが脆弱な *Jmjd1a* 欠損マウスの遺伝子背景を利用し、体外受精がエピゲノム制御を介して胎児の性決定にいつ、どのような影響を及ぼすのか明らかにする。

今回、以下のテーマに分けて研究を行う。

I - 体外受精による胎児の性転換の促進は初期胚のどの発生時期が影響しているのか

マウスの体外受精の流れは体外受精用培養液内で精子と卵子を受精させた後、受精卵を胚培養液内で発生させ、仮親に移植する。この一連の流れの中でどの段階が胎児の性決定に影響を及ぼすのか解析する。今回、以下の2つのアプローチを行う。雌雄の *Jmjd1a* ヘテロ欠損マウス同士を自然交配させ、発生ステージに応じて妊娠マウスから前核期胚（受精卵）2細胞期胚、胚盤胞期胚を回収する。前核期胚及び2細胞期胚は胚培養液内で胚盤胞期胚まで発生させた後、仮親に移植する。胚盤胞期胚に関しては回収後、直ちに仮親に移植する。

雌雄の *Jmjd1a* ヘテロ欠損マウスから精子または卵子を回収し、体外受精用培養液内で体外受精を行う。得られた前核期胚は胚培養液内で発生させずに直ちに仮親に移植する。または、胚培養液内で2細胞期胚、胚盤胞期胚まで発生させた後、仮親に移植する。以上により、生まれてきたXY型 *Jmjd1a* ホモ欠損マウスの内部生殖器官を観察・比較し、どの段階を体外で経ることが胎児の性転換を促進させる要因になっているのか明らかにする。

II - 体外受精により *Sry* 遺伝子座のどのようなエピゲノム修飾に変化があるのか

体外受精により作製したXY型 *Jmjd1a* ホモ欠損胚の性決定期（胎生11.5日）生殖腺における *Sry* 遺伝子座のエピゲノム状態（DNAメチル化及びヒストン修飾（H3K9メチル化など））を分子生物学的手法を用いて解析する。具体的には、DNAメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法及びメチル化DNA免疫沈降法、ヒストン修飾状態をクロマチン免疫沈降法により解析することで、体外受精により影響を受けるエピゲノム修飾を明らかにする。

4. 研究成果

体外受精により得られた2細胞期胚を仮親に移植したところ、誕生したXY型 *Jmjd1a* ホモ欠損マウスはすべての個体が性転換を起こしていた。一方、自然交配で得られた2細胞期胚を回収し、直ちに仮親に移植したところ、通常自然交配で誕生したXY型 *Jmjd1a* ホモ欠損マウスと同様に性転換を起こさない精巣を2つ有する個体が同程度観察された。この結果は、2細胞期胚までの発生期間を体外で培養することが胎児の性決定に影響を与えている可能性を示唆していた。

続いて、2細胞期胚を仮親に移植した後、XY型 *Jmjd1a* ホモ欠損胚の生殖腺体細胞（胎生11.5日）における *Sry* の発現及び *Sry* 遺伝子座のエピゲノム状態を解析した。近年、体外受精によりゲノムインプリンティングのDNAメチル化に変異が生じることが報告された。そこで *Sry* プロモーターのDNAメチル化状態の解析をバイサルファイトシーケンシング法により行った。解析の結果、体外受精を行うことで *Sry* の発現低下（図1a）及びそれに伴う抑止的修飾であるDNAメチル化が上昇していた（図

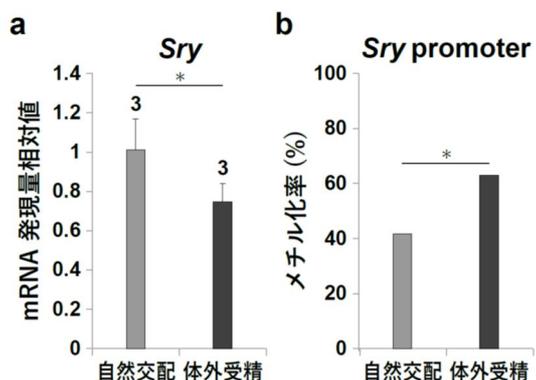


図1: 体外受精による *Jmjd1a* ホモ欠損胚の生殖腺における *Sry* の発現と *Sry* 遺伝子座のメチル化

1b)。このDNAのメチル化異常は、初期胚の体外受精・培養期間中において誘導されること、さらにこの高メチル化が初期胚発生中におけるDNAメチル化のリプログラミングに影響を受けることなく性決定期間まで維持されることが明らかになった。本研究課題の遂行により、体外受

精・培養期間における Sry プロモーターの DNA メチル化異常が性転換促進の原因であることが示された。

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 Naoki Okashita
2. 発表標題 TET2 plays a pivotal role in active DNA demethylation of Sry
3. 学会等名 HP Axis and Gonad Biology (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----