

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06369

研究課題名（和文）卵子の減数分裂特異的な細胞内温度変化の機能的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the functional significance of meiosis-specific intracellular temperature changes in oocytes

研究代表者

星野 由美（Hoshino, Yumi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：10451551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：卵子の細胞内温度の機能的役割を明らかにするために、本研究ではマウス卵子における細胞内温度変化と発生能力との関連を解析するとともに、細胞内温度に関わる候補分子の解析を行った。その結果、細胞内温度は卵子ごとに異なり、発生能力の高い成熟卵子で高温であることを明らかにした。また、温度に影響する因子として着目したPin1が卵成熟過程における染色体分配（減数分裂）に重要な役割を果たすことを明らかにした。発生能力の高い新鮮卵子では、細胞内温度もPin1の発現も高いが、過熟・加齢により低下する。これらの結果は、卵成熟と発生能力の維持に細胞内温度が関与し、Pin1による制御機構が必須であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、卵成熟に細胞内温度が影響し、細胞内温度の高い成熟卵子は発生能力が高いことを明らかにした。細胞内温度とその分布は卵子ごとに異なり、卵子の運命決定に関与している。これまで卵成熟は、核成熟と細胞質成熟の観点で議論されてきたが、温度を軸とした新たな概念が加わることで、卵成熟（減数分裂）を熱産生の観点から理解することに繋がる。また本研究では、細胞内温度が卵子の発生能予測や健全性診断に有効な指標になり得ることを示した。細胞内温度が細胞診断の指標になれば、これまで困難であった卵子の客観的かつ定量的な診断が実現し、生殖医療や動物生産における出生率向上に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：To clarify the functional role of intracellular temperature in oocytes, in this study, analyzed the relationship between intracellular temperature changes and developmental competence in mouse oocytes and analyzed candidate molecules related to intracellular temperature. As a result, it was clarified that the intracellular temperature differs from oocyte to oocyte, and that mature oocytes with high developmental competence are at high temperatures. In addition, Pin1, which is a factor that affects temperature, plays an important role in chromosome segregation (meiosis) during oocyte maturation. The intracellular temperature and Pin1 expression are both high in fresh oocytes with high developmental competence but decrease with overmature. These results indicate that intracellular temperature is involved in oocyte maturation and maintenance of developmental competence and that a regulatory mechanism by Pin1 is essential.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵子 細胞内温度 温度プローブ 発生能予測 細胞診断 生殖技術 Pin1

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵子は卵巣内で形成・成熟し、受精可能な成熟卵子として排卵される。排卵された卵子は、発生できる能力を獲得していると考えられるが、体外受精に供試すると、途中で発生を停止する卵子が一定の割合で存在する。このことは、卵子ごとに発生能力（以下、発生能）に違いがあることを意味している。卵子の質は、その後の発生に大きく影響するが、その判定は顕微鏡下での形態観察に基づいて行われている現状にある。体外受精や卵子の凍結保存など、卵子の体外操作技術は一般的な技術として確立されつつあるが、発生能を評価する適切な仕組みがないため、安定した高い出生率に繋がっていない。生殖医療や家畜生産において出生率を向上させるためには、健常で発生能の高い、いわゆる優良卵子を準備する必要があり、確実に遂行するには、科学的根拠に基づいた精度の高い診断マーカーの選定と、それを活かした診断技術の確立が不可欠である。このような中、研究代表者は卵子の過熟（加齢）に伴う細胞内変化を多角的に解析し、細胞内温度が新鮮卵子と過熟卵子で大きく異なることを発見した。しかし、細胞内温度の機能的役割については不明である。

### 2. 研究の目的

研究代表者による研究で、卵子内温度とその分布は細胞ごとに異なり、新鮮卵子で高い傾向にあることを明らかにしている。本研究では、卵子における細胞内温度変化の意義を明らかにするとともに、卵子の細胞内温度と受精後の初期胚発生への影響を解析し、卵子内温度が果たす機能的役割を解明する。さらに、卵子の減数分裂と細胞内温度との関連を明らかにし、卵子内温度が卵子の運命決定にどのように寄与するのかを追求する。

### 3. 研究の方法

卵子内温度とその変化の機能的意義を明らかにするため、まず、卵成熟過程における細胞内温度とその分布を網羅的に解析する。続いて、卵子の発生能獲得に不可欠な核成熟と細胞質成熟の観点から、細胞内温度との関連を解析する。さらに、卵子形成から成熟に至るまでの一連の減数分裂と細胞内温度との関連性を解析し、温度が卵子の運命決定にどのように寄与するのか明らかにする。

本研究では、これまでの研究実績に基づき、マウスを対象として実施する。細胞内温度の検出には、温度プローブ (Thermoprobe) を使用し、蛍光寿命顕微鏡もしくは共焦点レーザー顕微鏡により可視化する。

### 4. 研究成果

- (1) 卵成熟過程（第一減数分裂前期～第二減数分裂中期）の卵子に温度プローブを注入し、細胞内温度を可視化したところ、個々の卵子で細胞内の温度とその分布、熱産生・吸熱量が大きく異なることを明らかにした。特に、卵巣内から採取した卵核胞期（第一減数分裂前期）と排卵された第二減数分裂中期では、同一個体から採取した卵子であっても細胞内温度にばらつきが認められ、卵成熟のステージに関係なく個々の卵子で異なることを明らかにした。

- (2) 成熟卵子の温度分布を解析するため、排卵後の卵子を経時的に採取し（hCG 投与後 13、15、18、24 時間）、時間経過に伴う変化を調べたところ、過熟になるにつれて細胞内の高温領域が減少することを確認した（図1）。hCG 15h までの新鮮卵子では、紡錘体周辺にも高温領域が存在することを確認しており、先行研究を踏まえるとミトコンドリアの関連が強く示唆された。

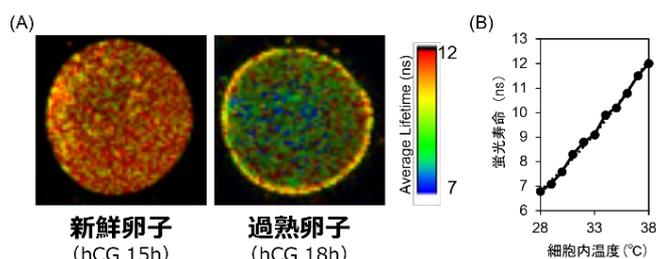


図1. 温度プローブを用いた排卵卵子の細胞内温度イメージング

- (A) 新鮮卵子と過熟卵子の温度イメージング。
- (B) 蛍光シグナルに基づく細胞内温度。

- (3) 細胞内温度変化に関わる要素を特定するため、エネルギー産生器官であるミトコンドリアに着目して、その局在と膜電位を検出したところ、細胞内温度分布はミトコンドリア膜電位の高い領域とほぼ一致していた。経時的に解析してみると、ミトコンドリアの膜電位が細胞内温度よりも早期に変化を示すことから、細胞内の温度はミトコンドリア活性に影響を受けているものと考えられた。

- (4) 細胞内温度は卵成熟促進因子などの受精・発生能に関わる細胞内タンパク質活性とも相関があり、いわゆる発生能の高い卵子で細胞内温度が均一的に高いことを確認した。以上の結果より、細胞内温度は卵子の受精・発生能の判定に有効であり、細胞診断マーカーになり得ると結論づけ、卵子の受精・発生能の評価指標として特許出願した。
- (5) 受精後の初期胚でも細胞内温度にばらつきがあり、割球内でも温度分布に違いが認められた。一部の細胞表層で高温領域が検出されていることから、細胞内温度が細胞分裂に参与していることが示唆された。
- (6) 細胞内の温度は、様々な要因に影響を受けていると考えられる。その作用機序を明らかにするため、温度に応じて活性を変化させる Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) に着目して解析を行った。Pin1 は、プロリン異性化酵素であり、リン酸化したセリン/スレオニンの隣に位置するプロリンに特異的に作用し、タンパク質の適切なフォールディングを促すことで、複数の細胞プロセスにおいて分子スイッチとして機能していることが知られている。この Pin1 の欠損マウスは不妊の傾向にあることが報告されているが、生殖分野 (特に卵子形成、成熟、初期胚発生) における機能的役割は明らかでない。そのような中、本研究により、Pin1 欠損マウス由来の卵子では、高頻度に染色体分配異常が発生し、減数分裂が途中で停止することを明らかにした。また、野生型マウスの卵子では、Pin1 は一定の発現量を維持し、卵成熟の進行に伴って局在を変化させ、核膜崩壊から極体放出などの核成熟に重要な役割を果たしていることを明らかにした。過熟 (加齢) 卵子では、Pin1 発現が低下し、局在性を失っている。減数分裂特異的に Pin1 を阻害したところ、加齢個体由来の卵子で観察される現象に類似した第一減数分裂中期での停止 (第一極体放出エラー) が高頻度で観察された。この原因を追究するため、染色体と細胞骨格関連タンパク質の局在を詳細に解析した結果、極体放出に必要なアクチンキャップは細胞皮質で形成されるものの、第一減数分裂中期に形成された紡錘体が表層への移動中に回転することが引き金となって、極体放出エラー (染色体分配異常) が生じることを明らかにした (図2)。以上の結果は、原著論文として発表し、国際誌に掲載されている (Hoshino and Uchida, 2022)。

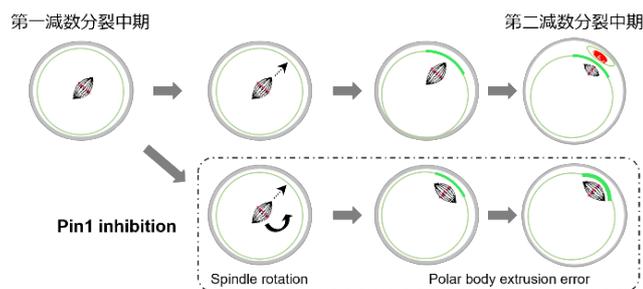


図2. Pin1阻害による減数分裂異常の発生メカニズム

### 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

細胞内温度は、がん細胞で高く、熟産生が亢進しているとの報告があるが、卵子を含め生殖細胞における報告はこれまで確認されていない。本研究では、マウス卵子を対象として、細胞内温度やその分布が個々の細胞で異なることを初めて明らかにした。また、細胞内温度がその後の発生能と相関があり、卵子の発生能評価に有効な指標となり得ることを実証した。細胞内温度が細胞診断の指標となれば、これまで困難であった客観的かつ定量的な判定が実現し、生殖医療や動物生産に貢献できると考えられる。

また、これまで卵成熟は、核成熟と細胞質成熟の観点で議論されてきたが、温度を軸とした新たな概念が加わることで、卵成熟 (減数分裂) を熟産生の観点から理解することが可能となる。

### 今後の展望

本研究で用いた温度プローブは、細胞内に取り込ませて蛍光で可視化するものであり、プローブの特性上、長期間のイメージングは実現できなかった。将来的に細胞内温度を非侵襲的に計測することができれば、細胞内温度変化をより詳細に観察できるようになり、細胞内温度と細胞分裂との関係をより深く理解することに繋がる。また、卵子の発生能 (健全性) を評価するための細胞診断技術の実用化に大きく前進するものと期待される。加えて、卵巣内における卵子形成から初期胚発生に至る一連の過程を、温度を基軸として解明できれば、卵子や受精卵の運命決定機構を理解することに繋がり、生命現象の理解に貢献できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hoshino Yumi, Uchida Takafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Prolyl Isomerase, Pin1, Controls Meiotic Progression in Mouse Oocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3772 ~ 3772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11233772	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4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野由美
2. 発表標題 卵子や受精卵の発生能力をどのように評価するか？ 細胞診断技術の確立を目指した指標探索
3. 学会等名 第45回グリーンサイエンスセミナー（福山大学）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野由美
2. 発表標題 受精卵の発生能力をどのように評価するか
3. 学会等名 第43回家畜診療技術研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野由美
2. 発表標題 卵子の運命はどのように決まるのか？
3. 学会等名 日本女子大学理学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野由美
2. 発表標題 卵子の細胞内温度は発生能評価の指標になり得るか？
3. 学会等名 日本伝熱学会第3回ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 卵子の受精能又は発生能を検査する方法及び受精卵の発生能を検査する方法	発明者 星野由美	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-002075	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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		
米国	コロラド大学		