

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20580305

研究課題名（和文） 凍結乾燥ウシ精子の同種および異種顕微授精系による評価

研究課題名（英文） Evaluation of freeze-dried bull spermatozoa by intra- or inter-species microinsemination

研究代表者 保地 眞一（HOCHI SHINICHI）

信州大学・繊維学部・教授

研究者番号：10283243

研究成果の概要（和文）：凍結乾燥（FD）ウシ精子を長期間冷蔵保存した後、受精シグナルを発する各種能力がどの程度正常に維持されているのかを調べた。排卵マウス卵子を用いた異種顕微授精系において、FD 区では対照区よりも精子由来卵活性化因子の活性が劣る傾向があったが、致命的とまでは言えなかった。同種顕微授精系で作製した前核期卵の解析では、FD 行程が精子に加わることは雄ゲノムに能動的脱メチル化が誘起される時期や脱メチル化のレベルに問題を引き起こさなかった。精子中心体の微小管形成中心機能についても FD 行程による問題は認められず、FD 精子の DNA 断片化も comet assay では観察されなかった。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this study was to investigate whether freeze-drying process of bull spermatozoa disturbed early post-fertilization events essential to gain the developmental competence of intracytoplasmically sperm-injected (ICSI) oocytes. In interspecies assay using mouse ovulated oocytes, the ability of freeze-dried (FD) bull spermatozoa to induce normal intracellular calcium oscillation pattern was comparable despite of temperatures stored for 1 year. DNA fragmentation in FD spermatozoa stored at +4°C was not detected by alkaline comet assay. With intraspecies (bovine-bovine) ICSI, the FD process was found to be innocent in performance of epigenetic remodeling (active DNA demethylation) and function of microtubule-organizing center (sperm aster formation and network assembly) in the pronuclear-stage zygotes. Factors responsible for low blastocyst yield from the FD-ICSI bovine oocytes remain to be determined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：ウシ精子、顕微授精、凍結乾燥、カルシウムオシレーション、DNA 脱メチル化、ROCK 阻害剤、ガラス化保存、微小管形成中心

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの哺乳類において超低温環境下で精子を凍結保存することが可能になっており、この技術は人工授精や体外受精 (In vitro fertilization = IVF) などと組み合わせで実用化されている。一方、精子を凍結乾燥 (Freeze-dry = FD) してから常温あるいは低温で保存することができるようになると、精子の維持と輸送に係わるコストを大幅に削減できる。また液体窒素タンクを使わない細胞の保存様式は、作業管理者の安全面から見ても現状よりは望ましいことである。さらに、遺伝子改変動物等の精子を研究材料として無償あるいは有償で他の研究者に提供することが当たり前になってきた昨今では、FD 状態では例え常温での保存可能時間が数日間であったとしても、精子サンプルの国際輸送 (空輸) を考えたときに液体窒素タンクが必要にならないことの利点は計り知れない。

精子の運動性を損なうことなく FD する技術はまだ開発されていないので、FD 精子由来の動物個体を作製するには卵細胞質内精子顕微注入法 (Intracytoplasmic sperm injection = ICSI) を適用することになる。ICSI 技術は 1970 年代の開発当初から受精現象のメカニズムを解析するための手法としてよく利用されてきた。現在ではウマやクジラのような IVF が困難な動物種における胚作製手段としてのみならず、ヒトの不妊治療の一手法としても脚光を浴びており、日本では年間 1 万人を越える高度生殖補助医療由来の新生児のうち約 1/3 が ICSI 技術の助けを借りたものである。実験小動物ではマウスでは 1995 年、ラットでは 2002 年に、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いることによって効率的に ICSI 産仔が作製できると報告された。哺乳類では初めて ICSI 産仔作製例が報告されたウサギを含め、これら 3 つの動物種で FD 精子の ICSI に由来する産仔作出が報告されている。FD 精子に由来する ICSI 胚の産仔発生は 1998 年、マウスで最初に報告され、この種ではその後に再現性も確認され、対照の産仔率と何ら遜色ないレベルにまで技術が完成しつつある。ウサギでの報告 (2004) がそれに続いたが、FD 後 2 年間にわたって冷蔵保存した精子を ICSI し、1 匹の産仔が生まれたただだった (産仔率は 0.5%)。さらにそれに続いて、ラットで我々が 2005 年に FD 精子に由来する ICSI 産仔作出を報告した。この成功を支えたのは、ラット ICSI そのものの成功率を 2002 年に最初に報告した値 (約 10%) から最高で 3~4 倍の 40% 程度にまで改善したことによるところが大きかった。この ICSI 産仔率の改善は、ラット精子尾部の頭部からの分離に超音波処理を使うことによって、細胞膜/先体膜にもある程

度の物理的な衝撃を与えた結果として先体酵素がリークし、ICSI で卵子内へ持ち込まれることを抑制した結果だろうと考察した。2005 年の報告では FD ラット精子は冷蔵庫 (+4°C) で 2 日間保存しただけのもので、1 ヶ月以上置いたものの ICSI には失敗していたが、その後、1 年間冷蔵保存した FD 精子からも生存ラット産仔を得ることに成功し、その結果は染色体異常の発生頻度を添えて 2008 年に論文発表した。この実験期間における大きな変更点は凍結乾燥機そのものを変えたことで、真空度や乾燥時の棚温度を多段階に設定可能なプログラマブル・フリーズドライヤーを導入した。マウスでの報告を参考に、昇華によって細胞の大部分の水分を除去する「一次乾燥期」の真空度を高めに設定することがこのドライヤーの導入によって可能となり、マウス以外の動物種でも FD 精子の長期保存に対する道が開けた。

一方、ウシ精子の FD に関する情報は極めて限られているが、FD 精子の ICSI 後に胚盤胞までの発生させた例は得られている (2002)。しかしウシでは ICSI による胚盤胞作製そのものがマウスやラットのような実験小動物と同じレベルには達していないのが現状で、ICSI 胚に研究機関ごとに推奨が異なる卵子活性化処理を補足しなければならない点も実験小動物の場合とは大きく異なる。

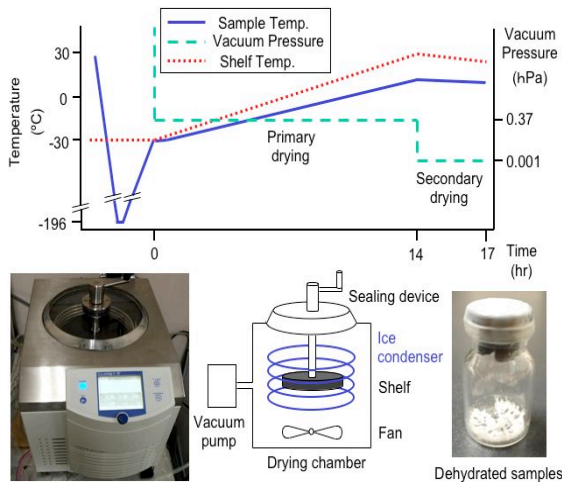
2. 研究の目的

本研究の目的はウシ精子の凍結乾燥する際の最適条件を決定し、長期間冷蔵保存した後にでも正常な受精シグナルを発する能力をもつことを同種および異種顕微授精系によって証明することである。大きく分けて、排卵マウス卵子を用いた異種顕微授精系と体外成熟ウシ卵子を用いた同種顕微授精系を利用する。前者ではカルシウムオシレーション動態追跡による精子由来卵活性化因子 (Sperm-borne oocyte-activating factor = SOAF) の活性を調べ、後者では雄性ゲノムの脱メチル化動態、精子中心体の微小管形成中心 (Microtubule-organizing center = MTOC) 機能解析、ならびに胚盤胞作製を行う。またウシ ICSI 系による胚盤胞作製を本格化させるまでには、ICSI 胚に補填する活性化処理の最適化を図っておく必要がある。さらに胚盤胞の受卵牛子宮への移植の実施を想定すると、ICSI 由来ウシ胚の凍結保存技術の確立も望まれる。

3. 研究の方法

FDウシ精子は以下の要領で調製した。凍結融解ウシ精液を 50 mM EGTAを含むバ

ッファーに懸濁し、バイアル瓶に分注した。 -196°C の液体窒素で予備凍結後、Christ社製のプログラブル・フリーズドライヤー (ALPHA2-4) で一次乾燥圧が0.37 hPa、二次乾燥圧が0.001 hPaの減圧条件下においてそれぞれ14時間と3時間、脱水させてFDサンプルを作製した。不活性窒素ガスを充填後、 -196°C 、 $+4^{\circ}\text{C}$ 、あるいは $+25^{\circ}\text{C}$ で保存した(図1参照)。なお、FD処理後の精子DNAの損傷程度は、断片化したDNAを定量化できるアルカリコメットアッセイによって評価した。



(図1)

カルシウムオシレーションの動態観察を行う異種頭微授精系は以下の要領で行った。過剰排卵誘起した BDF1 マウスから排卵卵子を採取し、カルシウムイオンプローブの Fluo-3AM で 30 分間処理しておいた。そしてウシ精子を頭部のみにしてから ICSI し、共焦点レーザー顕微鏡下でパルスの発生頻度を記録した (20 秒間隔で 2 時間まで)。オシレーションパターンは、(A) 高頻度正常、(B) 低頻度正常、(C) 異常、(D) 単回パルス、(E) 無反応、の 5 段階に分類した。

同種頭微授精系を利用する評価についてはまず、前核期での雄ゲノムの能動的脱メチル化動態を 5-メチルシトシン抗体を用いた免疫染色によって調べた。すなわち、ウシ卵巣から採取した卵丘卵母細胞複合体 (Cumulus-oocyte complex = COC) を 22 時間成熟培養し、裸化後に第一極体を有するものを成熟卵とみなして集めた。ここに新鮮精子あるいは FD 精子を ICSI し、対照としては IVF 区を設けた。IVF の場合、精子侵入までに 2 時間かかると仮定し、8、14 時間目のサンプルを、そして ICSI の場合、6、12 時間目のサンプルをそれぞれ免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて雄性ゲノムのメチル化程度を比較した。

ウシ FD 精子の ICSI による胚盤胞作製を目指すに当たり、卵子活性化補填系の見直しによる ICSI 由来胚盤胞作製系の確立も平行して進めた。ICSI 卵子に補填する活性化方法は、① 無処理、② ICSI 後 4 時間待ってから 7%エタノール (5分あるいは10分) で単独処理、③ ICSI 直後に $5\ \mu\text{M}$ イオノマイシン (= IM、5 分) で単独処理、④ $5\ \mu\text{M}$ IM (5 分) 処理に $1.9\ \text{mM}$ 6-ジメルアミノプリン (=DMAP、3 時間) 処理を併用、⑤ $5\ \mu\text{M}$ IM (5 分) 処理に $10\ \mu\text{g/ml}$ シクロヘキシミド (=CHX、5 時間) 処理を併用、⑥ $5\ \mu\text{M}$ IM (5 分) 処理から 4 時間後に 7%エタノール (=EtOH、5 分あるいは 10 分) 処理を併用、を設けた。ICSI 胚の体外培養には m-SOFaa 培地を用い、低酸素濃度下で 8 日間培養した。得られた胚盤胞には二重染色を施し、内部細胞塊 (Inner cell mass = ICM) と栄養膜細胞 (Trophectoderm = TE) のそれぞれの細胞数とそれらを合計した胚盤胞総構成細胞数を求めた。

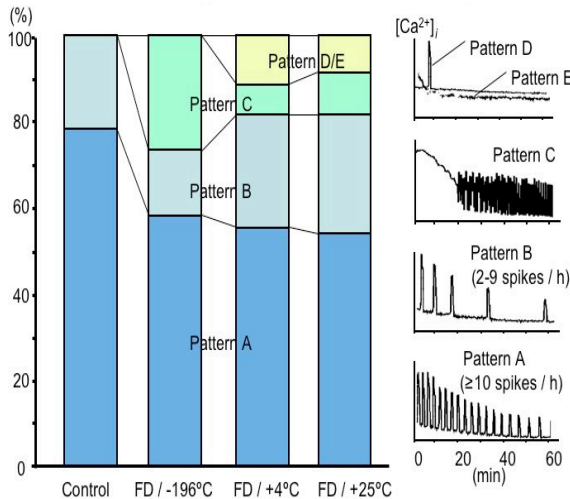
また、ICSI 由来ウシ胚盤胞の凍結保存技術を高度化するため、ヒト ES 細胞においてアポトーシス抑制に有効なことが報告されている ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) 阻害剤、Y-27632 を $10\ \mu\text{M}$ の濃度で蘇生培地に添加することで蘇生率の改善を目指した。凍害保護物質としては 15% エチレングリコール、15% DMSO、0.5 M シュクロースを添加した培地を用い、クライオトップをデバイスとした超急速冷却行程を特徴するガラス化保存法を採用した。さらに ICSI 由来胚のガラス化耐性を、胚盤胞までの発生速度 (7 日目胚か、8 日目胚か)、ならびにガラス化保存時の胚盤胞の大きさ (外径 $200\ \mu\text{m}$ 以上か、それ以下か) に基づいて比較・検討した。

最後に、同種頭微授精系を利用する評価として精子中心体機能の正常性を星状体形成に基づいて調べた。MTOC 機能は精子頭部とミトコンドリア鞘の間にある中心体が α チューブリン + β チューブリンからなる微小管繊維のネットワークを伸ばす起点として機能するかどうかを見る。顕微注入から 6 時間目の前核期卵を微小管安定化バッファー (Buffer-M) とメタノールによって固定し、 α チューブリン抗体を一次抗体に用いて免疫染色 (核は DAPI 染色) した。精子星状体出現の有無ならびに成長度合いを共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、同時に雌雄両前核の成長ならびに卵子中央への移動との関連についても調べた。

4. 研究成果

(1) $0.37\ \text{hPa}$ 、14 時間と $0.001\ \text{hPa}$ 、3 時間の FD 処理後に 1 年間、 $+25^{\circ}\text{C}$ 、 $+4^{\circ}\text{C}$ また

は-196°Cで保存したウシ精子が卵子活性化誘起活性を保持しているかを確認するため、排卵マウス卵子への異種顕微授精を行ってカルシウムオシレーションの発現パターンを共焦点レーザー顕微鏡下で調べた。反復性の細胞内カルシウムイオン濃度の増加はFD後の保存温度に関わらず54~58%の割合でマウス卵子に起こったが、FDしていない精子を注入したときの79%よりは低かった(図2参照)。



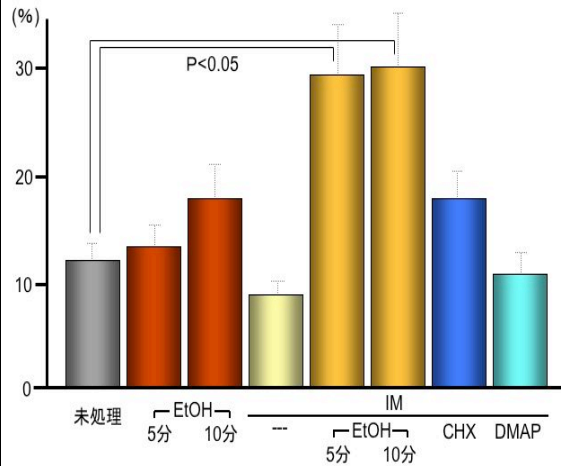
(図2)

体外成熟ウシ卵子への同種顕微授精を行って核相の変化を追跡したところ、減数分裂再開ウシ卵子の割合(48~57% vs 70%)や前核形成卵子の割合(27~34% vs 64%)にも同様の傾向、すなわち致命的ではないもののFD区では対照区よりも受精初期のシグナル伝搬が遅れるあるいは劣る傾向が認められた。

(2) FDウシ精子のICSIによって作製された前核期卵におけるエピジェネティクス、とくに雄ゲノムの能動的脱メチル化動態を調べた。FD後1年間、+4°Cで保存したウシ精子のICSIで作出した前核期卵の雄ゲノムにおける脱メチル化レベルをIVF由来卵子のそれと比較したところ、雄ゲノムの能動的脱メチル化現象はIVFからは10時間以内、ICSI(新鮮対照精子使用)からは6時間以内に開始しており、雌ゲノムのメチル化レベルを1とした雄ゲノムの相対的メチル化レベルは0.4から0.6程度の値を示した。少なくともFD行程が精子に加わることによって雄ゲノムに能動的脱メチル化が誘起される時期や脱メチル化のレベルに特筆すべき問題は生じなかった。

(3) FD-ICSI由来胚盤胞作製に取り組むに

先立ち、ICSI後に補填する卵子活性化誘起の方法を見直した。ICSI直後に5μMイオノマイシンで5分間処理し、4時間後に7%エタノールで5分間ないし10分間処理することにより、胚盤胞の総細胞数やICM/TE細胞比にも問題なく、約30%の胚盤胞発生率が得られるようになった(図3参照)。

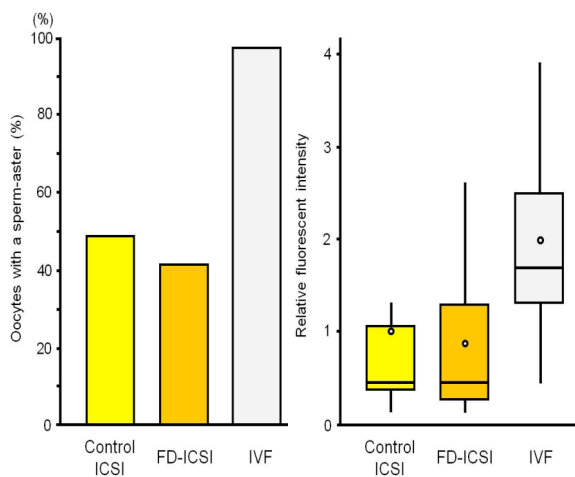


(図3)

また、ICSI由来ウシ胚盤胞の凍結保存技術を高度化するため、ROCK阻害剤、Y-27632を蘇生培地に添加することによって、IVF由来ウシ胚盤胞のガラス化保存後に95%もの高生存率を得ることに成功した。また、外径が200μmを超える拡張胚盤胞期まで培養を継続してからガラス化保存の方が加温胚の蘇生にとって好都合であることも明らかにした。

(4) 精子中心体機能の正常性を星状体形成に基づいて検討した。まず、FD-ICSIにおける胚盤胞作製効率(1%)はICSI区の値(21%)や対照のIVF区の値(43%)より有意に低かった。アルカリコメットアッセイにおいては、FD行程によってウシ精子のDNA断片は誘発されていなかったし、FD-ICSIから7時間目の精子星状体出現率もICSI区と同等だった(FD-ICSI区の41%に対しICSI区は49%)。精子星状体を形成した卵子に限定した場合、微小管繊維ネットワークの大きさにも両区の間で差は認められなかった(図4参照)。

しかしながら、ICSI由来前核期卵におけるMTOC機能は対照のIVF由来胚におけるそれと同等というわけではなかった(IVF区の精子星状体出現率は97%で、微小管繊維ネットワークの大きさはICSI区の約2倍)。よって、FD行程自体はウシ精子のMTOC機能の維持にとって悪影響を及ぼさないことが示唆された。



(図 4)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- ① H. Hara, H. Abdalla, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi, S. Hochi. Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. *J Reprod Dev* 誌, 57 巻, 428- 432, 2011, 査読有.
- ② S. Hochi, H. Abdalla, H. Hara, M. Hirabayashi. Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. *J Reprod Dev* 誌, 57 巻, 557- 563, 2011, 査読有.
- ③ H. Abdalla, M. Shimoda, H. Hara, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi, S. Hochi. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. *Theriogenology* 誌, 74 巻, 1028- 1035, 2010, 査読有.
- ④ S. Hochi, H. Abdalla, H. Hara, M. Shimoda, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi. Stimulatory effect of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor on revivability of in vitro-produced bovine blastocysts after vitrification. *Theriogenology* 誌, 73 巻, 1139-1145, 2010, 査読有.
- ⑤ H. Abdalla, M. Shimoda, M. Hirabayashi, S. Hochi. A combined treatment of ionomycin with ethanol improves blastocyst development of bovine oocytes harvested from stored ovaries and microinjected with spermatozoa. *Theriogenology* 誌, 72 巻, 453-460, 2009, 査読有.
- ⑥ H. Abdalla, M. Hirabayashi, S. Hochi.

Demethylation dynamics of the paternal genome in pronuclear-stage bovine zygotes produced by in vitro fertilization and ooplasmic injection of freeze-thawed or freeze-dried spermatozoa. *J Reprod Dev* 誌, 55 巻, 433-439, 2009, 査読有.

- ⑦ H. Abdalla, M. Hirabayashi, S. Hochi. The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis. *Theriogenology* 誌, 71 巻, 543-552, 2009, 査読有.

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 原 弘真, 顕微授精、精子凍結乾燥、卵子ガラス化の各行程がウシ微小管形成中心の機能発現に及ぼす影響, 第 52 回日本哺乳動物卵子学会, 平成 23 年 5 月 21-22 日, 栃木.
- ② 原 弘真, IVF または ICSI に由来するウシ前核期卵における DNA メチル化量と H3 ヒストンアセチル化量との関係, 第 103 回日本繁殖生物学会, 平成 22 年 9 月 2-4 日, 青森.
- ③ 下田 美怜, ICSI と IVF に由来するウシ胚盤胞の超急速ガラス化保存: 発生速度と発育ステージの影響, 第 51 回日本哺乳動物卵子学会, 平成 22 年 5 月 29-30 日, 新潟.
- ④ 原 弘真, ROCK の活性阻害はガラス化保存した体外受精由来ウシ胚盤胞の蘇生率を改善する, 第 112 回日本畜産学会, 平成 22 年 3 月 28-30 日, 東京.
- ⑤ 下田 美怜, ICSI と IVF により作出した拡張度が異なる 7 日目ウシ胚盤胞におけるガラス化耐性の比較, 第 112 回日本畜産学会, 平成 22 年 3 月 28-30 日, 東京.
- ⑥ 下田 美怜, ウシ卵細胞質内精子注入法の効率改善と凍結乾燥精子を用いた胚盤胞作製の試み, 第 102 回日本繁殖生物学会, 平成 21 年 9 月 10-12 日, 奈良.
- ⑦ 保地 眞一, ウシ顕微授精胚の胚盤胞発生率を改善する卵子活性化補填法について, 第 110 回日本畜産学会, 平成 21 年 3 月 28-30 日, 神奈川.
- ⑧ Abdalla H, Demethylation dynamics of paternal genomes in pronuclear bovine zygotes produced by IVF and ICSI with non-dried or freeze-dried spermatozoa, 第 35 回国際胚移植学会, 平成 21 年 1 月 4-6 日, カリフォルニア州.
- ⑨ Abdalla H, Demethylation dynamics of paternal genomes in pronuclear bovine zygotes produced by IVF and ICSI with non-dried or freeze-dried spermatozoa, 第 101 回日本繁殖生物学会, 平成 20 年 9 月 18-20 日, 福岡.

- ⑩ Abdalla H, Ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and meiosis resumption, 第 1 回世界生殖生物工学会議, 平成 20 年 5 月 24～25 日, ハワイ州.

[図書] (計 1 件)

- ① S. Hochi, H. Abdalla, M. Hirabayashi. Nova Science Publishers, In Vitro Fertilization, 2011, pp35-63.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保地 眞一 (HOCHI SHINICHI)
信州大学・繊維学部・教授
研究者番号 : 10283243

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし