

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09596

研究課題名（和文）体外培養条件による性決定エピゲノム変異克服への挑戦

研究課題名（英文）Challenges in overcoming sex-determining epigenomic mutations by in vitro culture conditions

研究代表者

岡下 修己（Okashita, Naoki）

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：10757933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然交配により誕生したXY Jmjd1a欠損マウスは、雌雄の中間的な表現型を示す。一方、このマウスを体外受精により作製すると、雌雄のバランスが雌の方へと傾き、全個体が完全な性転換を引き起こしていた。この結果は、受精卵・初期胚の体外受精用培養液や胚培養液への暴露が性決定に影響を及ぼす可能性を示していた。そこで本研究では、CRISPR/Cas9システムを応用したエピゲノム編集及び培養液への薬剤投与により、既存の体外培養条件による胎児への影響を修正できるのか挑戦を試みた。その結果、移植前の胚においてSryプロモーターのDNAメチル化を低下させることで性転換の促進が修繕できることが明らかになった。

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、遺伝要因だけでなく環境要因による性の攪乱を定量的にアプローチする点に特色がある。本研究結果は性決定の仕組みの解明に繋がる非常に意義のある成果である。さらに、本研究成果は学術的価値だけでなく医学的な意義も大きい。本研究では、体外受精がエピゲノム変化を起こすことで胎児の性決定に影響を及ぼすことを明らかにしており、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標になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：XY Jmjd1a-deficient mice are generated by natural mating showed an intermediate phenotype between male and female. On the other hand, when these mice were generated by in vitro fertilization, the male-female balance tilted toward females, causing complete sex reversal in all individuals. These results indicated that exposure of fertilized eggs and early embryos to IVF culture media and embryo culture media may affect sex determination. Therefore, we attempted to challenge whether the effects of existing in vitro culture conditions on the fetus could be modified by applying the CRISPR/Cas9 system to epigenome editing and the administration of drugs to the culture medium in this study. As a result, it was found that the promotion of sex reversal could be repaired by decreasing DNA methylation of the Sry promoter in the embryo before implantation.

研究分野：発生生物学

キーワード：性決定 体外受精 エピゲノム DNAのメチル化

1. 研究開始当初の背景

近年、体外受精などの人工的な環境への暴露により初期胚や胎児にエピゲノム変化が生じ、発生異常や疾患の原因になる可能性が懸念されている。

ほ乳類の性は胎児期の生殖腺に性決定遺伝子 *Sry* が発現するか否かで決定し、*Sry* の発現によりその個体は雄へと誘導される。本研究室では、ヒストン脱メチル化酵素 *Jmjd1a* が *Sry* プロモーターの抑制的エピゲノム修飾 H3K9 メチル化を消去することで、その発現を正に制御することを明らかにした。この成果は、ほ乳類の性決定におけるエピゲノムの重要性を世界に先駆けて示すものであった。

自然交配により誕生した XY 型 *Jmjd1a* 欠損マウスは、*Sry* の発現が雄化に必要な発現量の閾値まで低下しており雌雄の中間的な表現型を示す。一方、このマウスを体外受精により作製すると、雌雄のバランスが雌の方へと傾き、全個体が雌への完全な性転換を引き起こしていた。この結果は、受精卵・初期胚の体外受精用培養液や胚培養液への暴露が性決定に影響を及ぼす可能性を示していた。

2. 研究の目的

体外受精用培養液や胚培養液の進歩により、高い受精率・胚発生率で体外受精を行えるようになってきた。しかし、子宮内や卵管など場所によって体液の組成は異なっており、さらに卵管液は採取できる量が微量なため組成分析が難しく、体外受精用培養液や胚培養液を母体の環境(体液)と全く同じ状態に再現するのは困難である。マウスを用いた体外受精の流れは体外受精用培養液内で精子と卵を受精させた後、胚培養液内で少なくとも 2 細胞期まで体外環境で発生させる。DNA メチル化は可塑的な化学修飾であり、胚の置かれる栄養環境や化学物質への暴露により変異が起こることが実験的に証明されており、体液と体外培養液の成分の違いが体外受精による DNA メチル化異常を引き起こしている可能性が示唆された。

そこで本研究では、体外受精用培養液や胚培養液を構成するどのような成分が *Sry* プロモーターの DNA メチル化異常を引き起こし、性転換を促進させたのか明らかにする。具体的には、上記の *Jmjd1a* 欠損マウスを用い、体外受精用培養液及び胚培養液を構成する各々の成分の内 1 つを過剰投与または欠損させ、その培養液で受精または胚培養を行うことで、*Jmjd1a* 欠損マウスの性転換が促進またはレスキューされるのか解析する。従来の実験系では、環境因子(培養液成分)による性決定への影響を定量的に捉えるのは困難であった。本研究では、雌雄の中間的な表現型が示す *Jmjd1a* 欠損マウスを用いることで要因の効果を定量的に評価することが可能性ある。さらに、体外受精により生じた *Sry* プロモーターのメチル化異常をエピゲノム編集 (CRISPR/dCas9 活性化システムによる *Sry* プロモーター特異的な DNA 脱メチル化誘導) 及び培養液への薬剤投与 (DNA 脱メチル化を誘導できる薬剤) により修正できるのか試みる。

3. 研究の方法

エピゲノム変異を介した胎児性決定に影響を与える体外受精用培養液・胚培養液成分の解明に関しては、体外受精用培養液または胚培養液から各々を構成する成分の内 1 つを過剰投与または欠損させ、その培養液内で受精または胚発生を行う。成分を欠損させることで受精率・胚発生率が著しく低下する場合は濃度を半分程度に減少させるなどして対応する。以上の条件で受精卵を 2 細胞期胚まで培養し、*Sry* プロモーターの DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンシング法で解析することでエピゲノム変異を引き起こす原因成分のスクリーニングを行う。

エピゲノム編集技術・薬剤投与を用いた体外培養によるエピゲノム変異克服への挑戦に関し

では、申請者はこれまでの解析から、*Sry* プロモーターの脱メチル化制御に DNA 脱メチル化酵素 Tet2 が関わることを明らかにした。そこで、Tet 酵素の DNA 脱メチル化機能に着目し、Tet 酵素により体外受精で生じた *Sry* プロモーターの高メチル化を修正できるのかを試みる。本研究では、*Sry* プロモーター特異的に DNA 脱メチル化を誘導するため、CRISPR-dCas9 活性化システムを用いる。具体的には、dCas9 (遺伝子切断不活性型 Cas9) に Tet 酵素の脱メチル化活性領域 (CD) を結合させた dCas9-TetCD の mRNA を人工的に作成し、*Sry* プロモーターに誘導する gRNA と共にエレクトロポレーション法を用いて受精卵に導入する。ウイルスベクターや遺伝子を導入することで dCas9-TetCD を発現させる場合、ゲノムを傷つけてしまう可能性があるため、本研究では mRNA を用いる。雌雄の *Jmjd1a* ヘテロ欠損マウスから精子または卵を回収し、体外受精を行う。得られた受精卵に dCas9-TetCD の mRNA 導入した後、2 細胞期胚及び性決定期 (胎生 11.5 日) の生殖腺における *Sry* プロモーターの DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンシング法で解析することで、体外受精によるメチル化異常を修正できるのかを試みる。さらに、DNA 脱メチル化を誘導できる薬剤を培養液に添加することで *Sry* プロモーターの高メチル化を修正できるのかを試みる。同様に *Jmjd1a* ヘテロ欠損マウスの精子と卵を用い、薬剤を添加した培養液中で受精及び初期胚の培養を行った後、2 細胞期胚及び性決定期 (胎生 11.5 日) の生殖腺における *Sry* プロモーターの DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンシング法で解析する。

4. 研究成果

エピゲノム変異を介した胎児性決定に影響を与える体外受精用培養液・胚培養液成分の解明に関しては、培地の組成を変えることで媒精時における精子の運動能力や受精卵培養時における受精卵の発生に影響が出てしまうため、正確な影響を明らかにするのは困難であった。

エピゲノム編集技術・薬剤投与を用いた体外培養によるエピゲノム変異克服への挑戦に関しては、dCas9-TetCD の mRNA を作成し、*Sry* プロモーターに誘導する gRNA と共にエレクトロポレーション法を用いて受精卵に導入した結果、体外受精を行ったにも関わらず性転換を起こさない XY 型 *Jmjd1a* 欠損マウスが観察された。更に *Jmjd1a* ヘテロ欠損マウスの精子と卵を用いて、DNA 脱メチル化誘導剤 RG108 を添加した培養液中で受精及び初期胚の培養を行ったところ、同様に性転換を起こさない XY 型 *Jmjd1a* 欠損マウスが観察された (図 1)。これらの結果は、体外受精

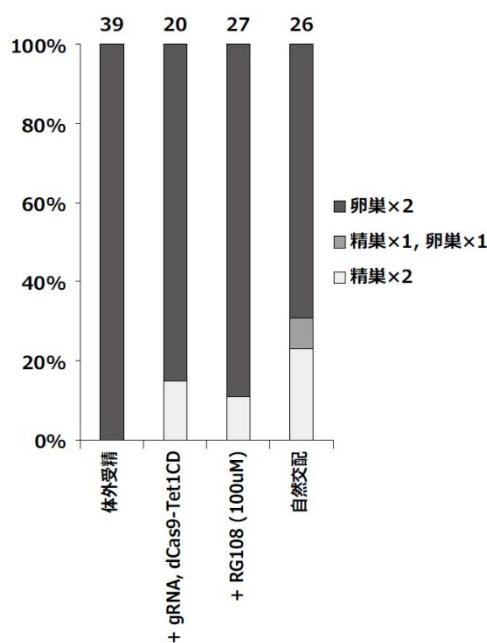


図 1
各条件で誕生した XY 型 *Jmjd1a* 欠損マウスの内部生殖器の状態

/培養期間中における *Sry* プロモーターの DNA メチル化の上昇が性決定に影響を与えることを裏付けていた。

さらに追加実験として、体外受精・培養におけるどのような要因が性決定に影響を与えているのか解明した。今回、体外受精中の酸素濃度、体外受精の使用する雄マウスの年齢を要因に候補とした。まず体外受精中の酸素濃度に関しては、体外培養は生体内とは異なる酸素濃度環境で行うため、生体内環境により近い酸素濃度で体外培養を行った。その結果、性決定への影響は特

に見られず、体外培養による性転換の促進はレスキューすることはできなかった。続いて体外受精の使用する雄マウスの年齢に関しては、体外受精に用いる雄マウスの週齢が増すごとに性転換が起こりやすくなることが明らかになった。実際に、若いマウスに比べ、年齢の進んだマウスの精子では *Sry* プロモーターの DNA メチル化が高くなっており、その高メチル化が性決定期まで維持されることで、胎児の性決定に影響することが分かった (図 2)。

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、遺伝要因だけでなく環境要因による性の攪乱を定量的にアプローチする点に特色がある。本研究結果は性決定の仕組みの解明に繋がる非常に意義のある成

果である。さらに、本研究成果は学術的価値だけでなく医学的な意義も大きい。本研究では、体外受精がエピゲノム変化を起こすことで胎児の性決定に影響を及ぼすことを明らかにしており、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標になることが期待される。

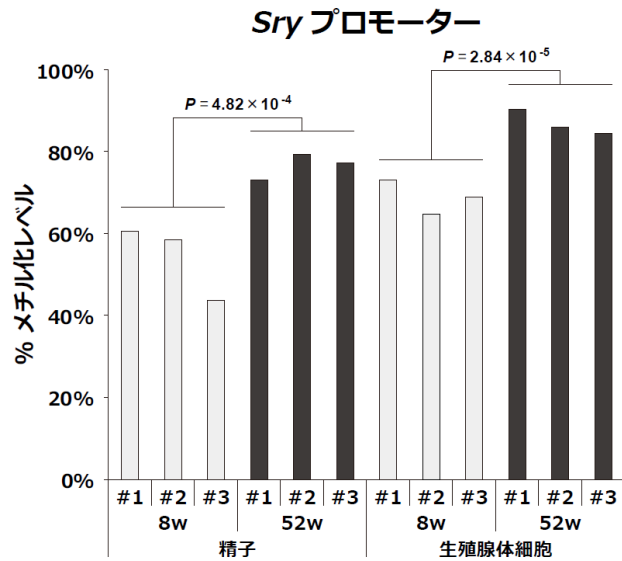


図 2
8 週齢および 52 週齢の *Jmjd1a* ヘテロ欠損マウスの精子における *Sry* プロモーターの DNA メチル化レベルとそれら精子を用いて体外受精により作製した胎生 11.5 日の *Jmjd1a* 欠損胚の生殖腺における *Sry* プロモーターの DNA メチル化レベルの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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