

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32682
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K09608
研究課題名(和文) 卵管分泌因子機能不全による新規不育症モデル動物の胚・雌性生殖管超微細構造の分析

研究課題名(英文) Ultrastructure of oviduct from OVGP1-KO hamster

研究代表者

大和屋 健二 (Yamatoya, Kenji)

明治大学・研究・知財戦略機構(生田)・研究推進員

研究者番号：80447309

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)：卵管分泌タンパク質OVGP1の不全はハムスターにおいて雌性不妊であった。しかし、卵自体には異常は無く、卵管におけるOVGP1の供給不全が着床前胚の正常な発生に重要である事を明らかにした。このOVGP1は卵管上皮の分泌細胞より卵管内へと供給され、卵および上皮細胞へと供給されている。まず上皮細胞への影響を解析した。野生型の卵管上皮と比べ微絨毛および繊毛の長さや形態に著しい異常は認めなかった。一方、KO個体において卵のオルガネラが中央へ集積し、透明体が固定操作により著しく薄化する事を認めた。体外受精が可能である事を踏まえ、OVGP1が何を行っているか今後明らかにする必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OVGP1KOにおける雌性不妊が示す重要な点として、正常な卵であっても、雌性生殖管内因子の欠乏により発生異常をきたす事である。また、その時、卵管形態に異常は認められなかったことから、その不妊の原因を雌性生殖管の形態から知る事は困難である事を明らかにした。OVGP1欠損卵であっても、正常な雌性生殖管では発生可能であったことから、OVGP1に関わる機構を補充することで発生が可能であることを明らかにした。即ち、更なるOVGP1の機能解析を行うことで、初期胚発生の質をモニターし、管理する事が可能になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：Oviducuctal glycoprotein OVGP1 KO female Syrian hamster were infertile due to preimplantation developmental abnormalities. The OVGP1 is supplied from secreting cells of oviducal epithelium to the lumen. Ovary transplant experiment showed that the OVGP1-KO Oocytes were normal since they developed in WT females. The abnormalities were due to the abnormal oviducal environment. Microvilli and cilia of oviducal epithelium seemed normal by transmission electron microscopy. However, zygotes from OVGP1-KO showed accumulation of organelles to the center and thin zona pellucida. Since in vitro fertilization can be performed, the responsible function of OVGP1 must be investigated.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵管 OVGP1

1. 研究開始当初の背景

現代では顕微授精の普及により、初期発生上の問題は受精障害よりむしろ胚の成育不全(不育症)が大きな障壁となっている。不育症は受精時の配偶子の質、あるいは母体の凝固系や内分泌・子宮形態異常など様々な病因に依ると言われているが、多くの点が未だに不明である。生体内では胚の良好な発育には卵管因子などによる着床前胚の養育や分化制御、適確な胚の輸送と着床までの過程が重要で、その破綻は不育症の原因となりえる。一方、生殖補助技術の発展により、体外授精によって卵管をバイパスし妊娠可能であることから、卵管の受精および着床前胚の発生の場としての機能について多くの謎が残されている。近年になり、受精後の胚発生において卵管・子宮上皮から分泌されるエクソソーム等の重要性が提唱され、雌性生殖管の液性成分による胚の養育が再び注目され始めた。

本応募研究の標的である oviductal glycoprotein 1 (Ovgp1) は、卵管上皮から分泌される糖タンパク質である。卵巣から排卵された直後の未受精卵には Ovgp1 は発現しておらず、卵管内で未受精卵に修飾される。これまでハムスターの他、ヒヒ・ウサギ・家畜大動物などを用いてこの糖タンパク質の機能解析が行われ、受精・着床前過程で重要な機能を有すると考えられてきた。しかし、2003年に発表された *Ovgp1* 遺伝子ノックアウトマウスには正常な妊孕性があり、産仔数も特に異常を認めなかった。今までのハムスターを用いた実験データの蓄積から、マウスで表現型として明らかでない不妊にならないのは、その胚の可塑性も含めた、種の違いに起因する生殖生理の違いがあり、本分子におけるヒト疾患のモデル動物として、マウスは必ずしも妥当な種だとは限らないと思われた。

近年 CRISPR/Cas システムを応用し、今までは困難であったマウス以外の哺乳類の遺伝子操作が容易に行なえるようになった。そこで我々はデータの蓄積があるハムスターで *Ovgp1* 欠損動物を作製した。その結果、我々の当初の予想どおり、このモデルはファウンダーの時点で雌性不妊になった。この結果は、マウス相同遺伝子欠損の場合とは大きく異なっており、この動物はヒト不育症モデルになると考え、本研究課題に着手した。

2. 研究の目的

本応募研究では、我々が作製した卵管分泌因子 oviductal glycoprotein 1 (Ovgp1) の欠損により発症する新規不育症モデルを正常型動物と比較し、主として超微形態学的に解析する。Ovgp1 欠損時の生殖過程への直接的影響をより明確にし、ヒト疾患の診断・治療法開発等の応用に耐えうる強固な学術的基盤構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ovgp1 欠損における受精能の解析

ファウンダー雌が不妊であったため、F1 は雄から作製した。CRISPR/Cas9 によるオフターゲットの可能性を下げるために、Ovgp1 欠損雄と野生型との交配を複数代行った後、解析に用いるホモノックアウト雌をホモノックアウト雄とヘテロ雌の交配によって供給した。妊孕性の確認は実績のある野性型の雄との自然交配によって行った。発情前期で同居させたペアを翌朝に確認し、膣栓および膣垢から精子を多数確認した場合、交配の成功とし交尾後 0 日とした。交尾後 0.7 日、5.5 日、8.5 日に受精、着床を確認した。

(2) Ovgp1 欠損における卵管上皮の解析

交尾後 0.7 日の卵管を採取しグルタルアルデヒドによる浸漬固定を行い、定法に従い透過電子顕微鏡用サンプルを作製した。

(3) 卵巣移植による卵および卵管機能の解析

野生型雌と Ovgp1 欠損雌間で両側卵巣の正位スワップ移植を行い、最低 2 週間の回復期間の後交配を行った。これにより、卵子の遺伝子型と卵管の遺伝子型が異なる *in vivo* 環境をつくり胚発生の可否を調べた。

4. 研究成果

(1) Ovgp1 欠損における受精能

交尾後 0.7 日に採卵し受精の有無と卵の形態を解析した結果、Ovgp1 欠損雌においても野生型同様、2 つの前核と 1 本の精子尾部を確認し、受精している事を確認した。しかし、卵の形態を注意深く観察したところ、Ovgp1 欠損の明視野像において細胞質顆粒の分布に偏りが認められた。透過電子顕微鏡により詳細を確認したところ、主にミトコンドリアであるオルガネラが中心へ集積していた(図 1)。

さらには、透明体の厚みが OVGP1 欠損において著しく薄く、OVGP1 欠損では固定による透明体の収縮がより起こりやすいことが明らかとなった。さらなる、胚の発生を確認するため、交尾後 5.5 日、8.5 日の子宮を採取し着床と胚発生を調べた。その結果、着床数は野生型と比べ OVGP1 欠損雌では著しく低く、胚の発生に関しては認められず、着床反応による脱落膜腫が誘起されていることが明らかとなった。

(2) *Ovgp1* 欠損における卵管上皮受精直後の卵で著しい異常を認めたため、その時の卵管上皮の状態を透過電子顕微鏡により解析した。その結果、野生型雌と OVGP1 欠損雌の間で卵管上皮細胞の微絨毛や繊毛の長さや形態に著しい異常は認めなかった。

(3) *Ovgp1* 欠損雌から野生型雌への卵巣移植による卵および卵管機能

Ovgp1 欠損雌において受精が確認できた事、卵管上皮の形態に著しい異常が認められなかったことから、卵に問題がない事を確認するために卵巣移植を行った。その結果、野生型雌に移植した OVGP1 欠損雌の卵巣から供給された OVGP1 欠損卵は野生型雌の卵管内で正常に発生、子宮に着床し自然分娩により出産した。

以上より、ハムスターの生理的な受精から着床において OVGP1 の欠損は卵子が正常であっても胚発生異常を起こす事が明らかとなった。この事は、化学的流産の原因の一つに迫るものである。ハムスターにおいて体外受精が可能な事を踏まえ、この発見の応用には、卵管内で OVGP1 が何を行っているかを今後明らかにする必要がある。

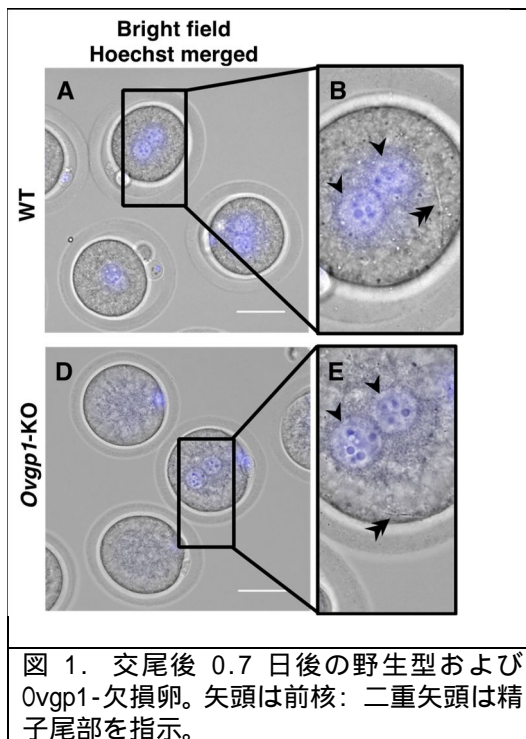


図 1. 交尾後 0.7 日後の野生型および *Ovgp1*-欠損卵。矢頭は前核：二重矢頭は精子尾部を指示。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamatoya Kenji, Nagai Yuya, Teramoto Naozumi, Kang Woojin, Miyado Kenji, Nakata Kazuya, Yagi Tohru, Miyamoto Yoshitaka	4. 巻 19
2. 論文標題 Cryopreservation of undifferentiated and differentiated human neuronal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 58～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.12.007	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 -
1. 著者名 Yoda Tomoka, Furuta Masateru, Tsutsumi Tomohiko, Ikeda Seiki, Yukizawa Shunsuke, Arai Satoshi, Morita Akinori, Yamatoya Kenji, Nakata Kazuya, Tomoshige Shusuke, Ohgane Kenji, Furuyama Yuuki, Sakaguchi Kengo, Sugawara Fumio, Kobayashi Susumu, Ikekita Masahiko, Kuramochi Kouji	4. 巻 41
2. 論文標題 Epo-C12 inhibits peroxiredoxin 1 peroxidase activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116203～116203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2021.116203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Woojin Kang, Kenji Yamatoya, Kenji Miyado, Mami Miyado, Yoshitaka Miyamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuronal expression of Ca ²⁺ oscillation initiator is linked to rapid neonatal growth in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.000325	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 -
1. 著者名 Okubo Mitsuo, Furuta Yoshiaki, Nakamura Yuki, Osawa Toshiya, Tada Naoki, Sawada Tomohiro, Yamatoya Kenji, Sekiguchi Yasunobu, Araki Yoshihiko, Miyake Kazunori, Noguchi Masaaki, Komatsu Norio, Ohsaka Akimichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Threshold for optimal administration of plerixafor in autologous peripheral blood stem cell collections through CD34 + cell monitoring based on the experience from two Japanese university hospitals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1744-9987.13614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki Yoshihiko, Yoshitake Hiroshi, Yamatoya Kenji, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 An overview of sex and reproductive immunity from an evolutionary/anthropological perspective	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2020.1831219	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
研究分担者	荒木 慶彦 (Araki Yoshihiko) (70250933)	順天堂大学・大学院医学研究科・前任准教授 (32620)	

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