様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　３１　日現在

機関番号：　８２４０１
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４３０１００

研究課題名（和文）染色体分配の正常化による加齢マウス卵子の品質改善の試み

研究課題名（英文）Rescue of age-related meiotic segregation errors in mouse oocytes

研究代表者
越後貫　成美（Ogonuki, Narumi）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任技師

研究者番号：４０３７３２８７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：加齢による卵子の質の低下とそれに伴う不妊や流産、新生児疾患等が社会的問題となっている。本研究ではマウスをモデルとして、加齢による卵子の質を非侵襲的方法にて改善を図ることを目標とした。若齢マウスGV卵にRNA干渉により脱アセチル化酵素HDAC活性を減少させたところ、MII後のヒストンアセチル化の異常（高アセチル化）が確認、さらに染色体数が正常より多い、あるいは少ないサンプルが認められ、老齢マウス卵子を再現することが出来た。また、老齢マウスの排卵誘起時に、内因性FSHを利用した抗インヒビン血清を使用することで通常の外因性FSHを利用したeCGの場合と比較して排卵数の増加、異常卵の減少が認められた。

研究成果の概要（英文）：It is well known that low quality oocytes increases with maternal age in humans. Low quality oocytes cause low pregnancies, or chromosome abnormalities of newborn infants. In this study, the quality of aged oocyte improved by non-micromanipulating approaches using mice. Abnormal revel (high revel) of histone deacetylase (HDAC) and aneuploidy were seen in MII oocytes after knock-down with histone deacetylase (HDAC) activity with "young oocytes" (9- to 12-week-old). These phenotypes were similar to aged oocytes, so HDAC activity might be involved to aged oocyte abnormalities. In superovulation methods of aged female mice (8- to 15-month-old), using injection of anti-inhibin serum (AIS) which works with endogenous FSH instead of eCG which works as exogenous FSH was increased the number of ovulated oocytes and decreased abnormal oocytes.

研究分野：　発生工学

キーワード：　マウス　発生工学

１．研究開始当初の背景

近年、女性の結婚年齢の上昇とともに、加齢による卵子の質の低下とそれにともなう不妊や流産、新生児の疾患が社会的に問題になっている。卵子の質の低下には大きく 2 種類が考えられる。1 つは細胞質の劣化、そしてもう 1 つが染色体の異常である。細胞質劣化の原因として酸化ストレスや卵子内のミトコンドリア機能の低下等が知られており、抗酸化剤の投与や細胞質置換による改善法が報告されている。細胞質置換の例としては、2009 年にアカゲサルにて、さらに 2013 年にはヒト卵子でも成功が報告がされている。しかし本法で作出された受精卵は、レシピエント核の遺伝子とドナー卵細胞質中のミトコンドリア遺伝子を受け継ぐため、出生児は遺伝的に３人の親を持つことになり、倫理面の問題が残されている。

一方、染色体の異常は卵子の減数分裂のプロセスに由来する。哺乳類の雌における卵形成はすでに母体内の胎児期に開始される。誕生前に第一減数分裂前期で一旦停止し、誕生後、性成熟期（思春期）以降の排卵で再開される。したがって排卵による減数分裂再開までの長期の休止期間に染色体構造に何らかの損傷あるいは脆弱化が起こることが考えられている。具体的には、姉妹染色分体を結合しているコヒーシンの減少により染色体の分配異常が挙げられているが、どのような機構で減少するのかはまだ明らかにされていない。

２．研究の目的

本研究ではマウスをモデルとして、加齢による卵子の質を、非侵襲的に（顕微操作を行わずに）染色体の改善を図ることで向上させることを目標と設定した。そこで着目したのがヒストンのアセチル化である。生殖細胞の減数分裂の過程で染色体が正常に姉妹細胞に分配されるためには、ヒストンがメチル化やアセチル化などの化学的な修飾による調整を受けることが重要である。近年、特に卵子におけるヒストンの化学修飾状態が徐々に明らかにされつつあり、減数分裂において正常に染色体が分離されるためにはヒストンが脱アセチル化されることが重要であると指摘されている。なお、これまでヒストンアセチル化とコヒーシンを関連づける研究がほとんどなかったが、最近、コヒーシンの疾患である Cornelia de Lange syndrome (CdLS)患者由来の体細胞では、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC8 の減少によりコヒーシンの再生が行われずに不足していることが明らかにされた(Deardorff et al. Nature 2012)。そこで本研究課題では、同様の HDAC 異常が減数分裂中の加齢卵子でも起こっている可能性に着目し、実験を進める。

本研究では、(1) 若齢卵子のヒストン化学修飾状態を人為的に操作することで、加齢卵子の染色体状態を再現。(2) (1) の解析で得られた結果をもとに加齢卵子の染色体分配異常のメカニズムを明らかにし、エピジェネティクス的な手法により加齢卵子の染色体の改善　を目標とした。

３．研究の方法

本研究では、加齢卵子での質の低下の一要因である染色体分配異常を改善するため、マウス若齢卵子にてヒストン化学修飾の再現を行った。実験および解析には HAT・HDAC 酵素活性測定やライブセルイメージング技術、卵子への siRNA･mRNA 注入法を駆使しながらの解析を進めた。続いて若齢卵子のヒストン化学修飾操作卵子で得られた結果をもとに、加齢卵子のヒストン化学修飾の改善を行なう。最終的に加齢卵子の質の向上を図ることによる正常受精および産仔の獲得を目指す。

４．研究成果

最初に、加齢卵子の質を確認するため、加齢（8-15 ヶ月齢）マウスより採取した MII 期卵子をホールマウント標本作成後、アセトオ

ルセイン染色した結果、MII 紡錘体の赤道面より離脱した姉妹染色分体が多くの卵子で確認された。また、加齢マウス卵子の GV 期から MII 期への発生をライブイメージングにて観察したところ、ヒストンアセチル化の異常（高アセチル化）が確認された。次に若齢（2-3 ヶ月齢）マウスの GV 期卵に RNA 干渉により脱アセチル化酵素である HDAC 活性を減少させたところ、MII への発生後、ヒストン高アセチル化が確認された。さらに卵子の染色体数について確認したところ、正常の 2n=20 より多い、あるいは少ないサンプルが認められた。また、加齢マウスでは排卵誘起の効果が若齢に比較して低率で、反応性の個体差も確認された。さらに、排卵卵子の多くが異常発生した卵子であった。そこで抗インヒビン血清による内因性 FSH を利用した排卵誘起を試みたところ、排卵効率の上昇、異常卵の大幅な減少が認められた。この結果は外因性 FSH を利用した通常の排卵誘起法は加齢マウスには過剰刺激となり、異常卵発生の一因と考えられた。排卵数が少なく、染色体異常率が高い加齢マウスには、本法が非常に有益な排卵誘起法であることが明らかになった。また、異常卵率が高いマウス系統においても本法により改善が認められたことより、加齢卵子モデルとして利用できる可能性が考えられた。

本研究において、加齢マウス卵子の質の向上までは到達できなかったが、加齢により卵子のヒストンアセチル化制御の異常や、FSH に対する感受性の変化などが生じていることが明らかになった。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 15 件）

①Kaminuma O,,, Ogonuki N (17 人中 10 番目). Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific CD4+ T cells. EMBO Reports 査読有 (in press)

②Nakasuji T,,, Ogonuki N (13 人中 2 番目). Asahara H. Complementary critical functions of Zfy1 and Zfy2 in mouse spermatogenesis and reproduction. PLoS Genet 査読有 13(1):e1006578, 2017.

③Watanabe S,,, Ogonuki N (6 人中 3 番目). Adeno-associated virus-mediated delivery of genes to mouse spermatogonial stem cells. Biol Reprod 査読有 96: 221-231, 2017.

④Kanatsu-Shinohara M,,, Ogonuki N (9 人中 3 番目). Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Genes Dev 査読有 30: 2637-2648, 2016.

⑤Kojima-Kita K,,, Ogonuki N (9 人中 4 番目). MIWI2 as an effector of DNA methylation and gene silencing in embryonic male germ cells. Cell Rep 査読有 16: 2819-2828, 2016.

⑥Inoue H, Ogonuki N (12 人中 2 番目). Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. Biochem Biophys Res Comm 査読有 478: 592-598, 2016.

⑦Kanemori Y,,, Ogonuki N (12 人中 10 番目). Biogenesis of sperm acrosome is regulated by pre-mRNA alternative splicing of Acrbp in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 査読有 113: E3696-3705, 2016.

⑧Komeya M,,, Ogonuki N (17 中 14 番目). Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. Sci Rep 査読有 6:21472, 2016.

⑨Hatanaka Y,,, Ogonuki N (9 人中 5 番目). Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposon. Proc Natl Acad Sci USA 査読有 112:14641-14646, 2015.

⑩Sato T,,, Ogonuki N (9 人中 6 番目). Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. Stem Cell Reports 査読有 5: 75-82, 2015.

⑪Inoue K,,, Ogonuki N (8 人中 4 番目). Trichostatin A specifically improves the

aberrant expression of transcription factor genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer. Sci Rep 査読有 5:10127, 2015.

⑫Itou D,,, Ogonuki N (11 人中 6 番目). Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells. Curr Biol 査読有 25:901-906, 2015.

⑬Kurotaki YK,,, Ogonuki N (8 人中 6 番目). Hatanaka Y, Kamimura S, Oikawa M, Inoue H, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A. Impaired active DNA demethylation in zygotes generated by round spermatid injection. Hum Reprod 査読有 30:1178-1187, 2015.

⑭Mizutani E,,, Ogonuki N (14 人中 9 番目). Generation of cloned mice from adult neurons by direct nuclear transfer. Biol Reprod 査読有 92:81, 2015.

⑮Takashima S,,, Ogonuki N (9 人中 5 番目). Functional identification of mouse spermatogonial stem cells with distinct self-renewal properties. Stem Cell Rep 査読有 4:489-502, 2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

①発生工学的手法を用いたマーモセット世代短縮技術の開発, ポスター, 越後貫成美, 葛西秀俊, 井上弘貴, 饗場篤, 小倉淳郎, 第 6 回日本マーモセット研究会大会, 2016/12/13, 東京大学(東京都文京区).

②マーモセット精子細胞を用いた顕微授精技術の開発, 口頭, 越後貫成美, 葛西秀俊, 井上弘貴, 饗場篤, 小倉淳郎, 第 109 回日本繁殖生物学会, 2016/9/13, 麻布大学(神奈川県相模原市).

③精巣の異種異所移植の新しい試み, 口頭, 越後貫成美, 山海直, 小倉淳郎, 第 63 回日本実験動物学会, 2016/5/20, ミューザ川崎シンフォニーホール(神奈川県川崎市).

〔図書〕(計　　件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計　　件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計　　件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/

６．研究組織
(1)研究代表者
越後貫　成美(OGONUKI NARUMI)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任技師
研究者番号：40373287

(2)研究分担者
(　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
(　　)

研究者番号：

(4)研究協力者
(　　)