

博士学位論文

論文要約

哺乳類卵細胞中の母性転写産物の解析を通じた
哺乳類胚発生の理解と予測

令和5年1月25日

近畿大学大学院

生物理工学研究科生物工学専攻

山本真理

序論

発生工学技術の発展により、生殖補助医療や畜産分野で卵の体外成熟培養や体外受精、着床前胚の体外培養が行われ、多数の受精卵を母体外で得ることが可能になっている。得られた受精卵は、産子を得るために子宮に戻される。しかし、形態による選抜を行っても、受精卵のすべてが産子にまで発生するわけではない。形態による選抜では主に卵細胞の核成熟を指標に判定するが、卵成熟では核の成熟に加えて、細胞質の成熟も重要であることが知られている。しかし、顕微鏡により非侵襲的に観察できる核の変化とは違って、細胞質の成熟の継時的な変化を捉えることは難しい。そこで、卵成熟における細胞質の状態を分子レベルで理解し、正常な卵成熟過程について知見を深める必要がある。

哺乳動物の卵細胞は、直径約 0.1mm の巨大な細胞で母性転写産物やタンパク質などの母性因子を細胞質内に蓄積している。これらの母性因子は卵形成過程で卵細胞に蓄積され、卵成熟や受精後の胚の初期発生を担っている。卵形成過程の終盤、卵成熟時期から受精後の胚発生初期にかけて卵は転写を停止するが、卵内に蓄えられた母性因子の働きにより、その間も減数分裂、受精、初期胚発生が進行する。母性因子のうち特に母性転写産物は、分解や poly(A)tail の修飾付加などにより、転写が停止した間も逐次的に作用することが知られている (Figure 1)。

本研究では、卵細胞質の成熟の分子過程を明らかにする目的で、卵形成過程で細胞質に蓄積される母性転写産物に着目し、single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) 技術を用いて卵成熟過程の卵内の母性転写産物の変化について解析した。第2章では、生殖補助医療で使用されなかった余剰卵を使用して、ヒト卵の体外培養成熟過程における母性転写産物の発現動態を明らかにした。また、第3章では、ウシ体外成熟卵と体内成熟卵から得られた受精卵を使用して、体外成熟と体内成熟の違いが母性転写産物の発現に及ぼす変化を評価した。さらに、第4章では、卵や受精卵に付随していた極体を用いて、卵や受精卵のトランスクリプトームを推測し、さらに受精卵の発生能を予測する技術の確立を目指した。

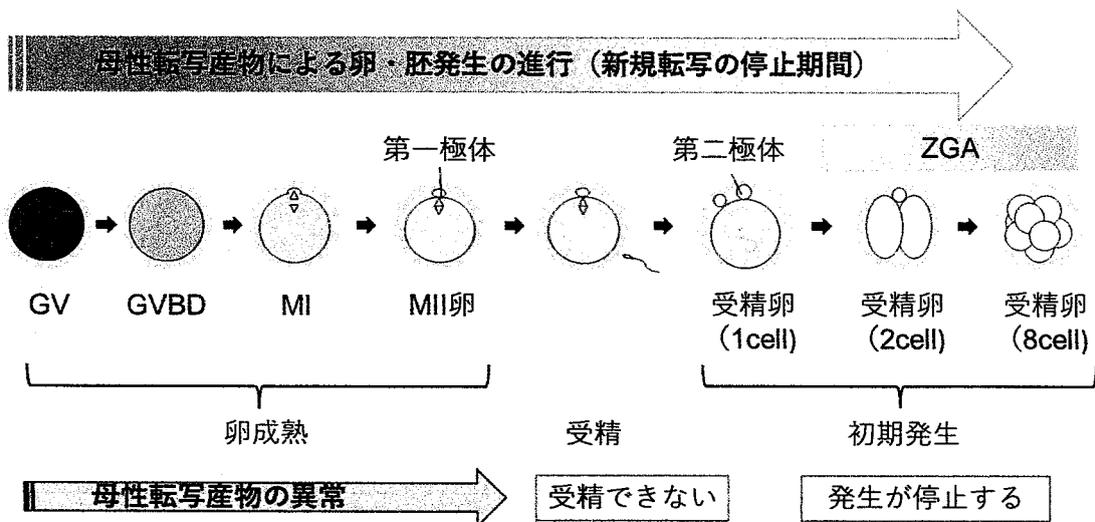


Figure 1. A schematic diagram showing mammalian oocyte maturation and subsequent embryonic development. Matured oocytes are transcriptionally inactive until reaching the embryonic stage at which zygotic genome activation (ZGA) is induced. Therefore, maternal transcripts are pivotal for progressing the early embryonic development.

第2章 ヒト卵の体外成熟培養過程におけるトランスクリプトームプロファイルの変化

緒言

生殖補助医療において、未成熟な卵を体外で培養して成熟させる体外成熟培養 (*in vitro* maturation : IVM) は重要な技術となっている。しかし、ヒト卵の IVM は生殖工学技術にとって大変貴重な選択肢であるにもかかわらず、IVM から得られた卵の受胎率はいまだに低い。さらに、IVM 卵の発生能にはばらつきがある。この卵の質がばらつく現象の本質について学ぶことは大変重要である。卵の質は卵形成時の遺伝子発現に大きく影響を受けることが知られており、結果として、高発生能卵の遺伝子発現パターンは低発生能卵のものとは違っていると考えられている。しかしながら、ヒト第二減数分裂中期の卵 (oocyte at the metaphase II stage、MII 卵) の遺伝子発現パターンが卵成熟時のどの段階で確立するのか、さらには卵成熟過程におけるトランスクリプトームの変動パターンの全容は解明されていない。

様々な成熟段階の卵におけるトランスクリプトームの研究は、まずマイクロアレイ法で行われ、近年になると1細胞 scRNA-seq 技術が使われるようになった。マイクロアレイ法を使用した Gayle M Jones らの報告では(2008)、体外成熟 MII 卵は体内成熟 MII 卵と比べて、転写産物の過剰な蓄積が起こることが明らかにされ、体外成熟 MII 卵と体内成熟 MII 卵との間にトランスクリプトームの違いがある事が示唆された。また、scRNA-seq 技術を用いて、Zhang 等は卵胞形成中のヒト卵のトランスクリプトームプロファイルを報告し(2018)、Yu 等は未成熟の GV 卵と比べて成熟卵で発現している転写物が少ないことを示した(2020)。また、卵成熟中の母性 mRNA のポリアデニル化は、卵成熟や続いて起こる発生の成功に関するタンパク質の翻訳をコントロールしている。そこで本研究では、ポリアデニル化 RNA の発現を、scRNA-seq 法を使用して様々な成熟ステージのヒト卵のトランスクリプトームで調べ、差次的に発現する遺伝子を同定した。

材料と方法

本実験では、不妊治療で使われずに残ったヒト余剰未受精卵をサンプルとして用いた。サンプルは、事前にインフォームドコンセントを得た患者11人から提供された。採卵時に未成熟で、IVM によっても採卵当日の16時までには成熟卵の MII ステージに成熟しなかった卵をさらに数時間培養し、卵核胞期 (oocyte at the germinal vesicle stage、GV 期)、第一減数分裂中期

(oocyte at the metaphase I stage、MI 期)、MII 期の各ステージに達した卵を scRNA-seq 解析に供した。各ステージの卵サンプルは、極体と透明帯を除いてサンプリングされた。上記のサンプリング時に未成熟だった卵は、そのまま一晩培養し、採卵翌日に各ステージを判定して、成熟が遅延した卵として前述と同じ方法でサンプリングした。その後、SMART-seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (Takara Bio, Z4889N)を使ってライブラリーを作製し、scRNA-seqを行った。さらにバイオインフォマティクス解析を行った。

この研究は、三重大学医学部附属病院 医学系研究倫理審査委員会のガイドラインに従って行われ (H2018-066)、大学病院医療情報ネットワークセンターへの登録も行われている (UMIN000034811)。加えて、日本産科婦人科学会で、ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究として登録されている。この研究は、ヘルシンキ宣言に従って行われた。本論文で取得されたデータは、Gene Expression Omnibus (GEO)の公開レポジトリの accession number “GSE166533”で公開している。またこの実験は、近畿大学生物理工学部の臨床研究倫理審査委員会の承認(H30-1-006)を受けており、大学の倫理規定に則り以下で得られたシーケンスデータを近畿大学で保管した。

結果と考察1:体外成熟卵の single cell RNA-seq 解析

採卵当日(採卵 7.5-9 時間後)にサンプリングした GV 卵4個、MI 卵4個、MII 卵3個、採卵翌日まで培養して(採卵後 15-16.5 時間)サンプリングした遅延(delayed)卵サンプルの dGV 卵3個、dMI 卵3個、dMII 卵3個を scRNA-seq した結果、13,799,742±4,127,048 リードが得られ、そのうち 85.6±2.0%のリードがヒト hg19 ゲノムにマッピングされた。発現遺伝子数(FPKM>1)は、卵成熟が進むにつれて減少したが、体外成熟 MII 卵は体外成熟 MI 卵に比べて発現遺伝子数の明らかな減少を示さなかった。これは、卵の成熟過程で発現転写物数が減少するという報告に反する一方で、体外成熟培養卵は体内成熟卵と比べて母性転写産物が十分に分解されないという報告と関連があると考えられる。本研究で使用した MII 卵は全て採卵時に未成熟ステージだった卵が体外成熟培養で成熟 MII 卵になったのに対し、MI 卵は採卵時から体外成熟培養時も変わらず MI 卵だった可能性があり、MII 卵の発現遺伝子数が MI 卵と比べて明らかな減少を示さなかったのは、体内成熟時と体外成熟時の母性 RNA の分解の違いに起因しているかもしれない。

卵成熟中のトランスクリプトームを比較したところ、Spearman correlation coefficientを見ると、同じステージの卵のトランスクリプトームは互いに似通っていることが分かった。これは、主成分分析(Principal Component Analysis: PCA)や階層的クラスタリング解析でも見られた。しかし、各ステージにうまく分類されない卵がいくつかあり、卵ごとにばらつきが存在することが示唆された。次に、差次的発現遺伝子(Differentially Expressed Genes: DEGs)を同定し(p<0.05, 4-fold difference)、Gene Ontology (GO)解析を行った。微小管ベースの細胞プロセスや細胞骨格組織といった GO term が MII 卵で発現が高い遺伝子にエンリッチされていた。また、既に報告のあるヒト卵胞形成中の卵のトランスクリプトーム変化を調べたデータセットと比較したところ、

胞状卵胞より排卵前卵胞卵で高発現しているはずの多くの減数分裂マーカー遺伝子は MII 卵で高発現していたが、一部はそうではなかった。さらに、胞状卵胞卵で発現上昇しているはずの減数分裂関連遺伝子の転写物は、本研究の体外成熟 MII 卵では完全には発現低下しておらず、体外成熟中の卵内 mRNA の分解が不完全であることを示唆している。

結果と考察2: 正常成熟卵と成熟遅延卵の遺伝子発現の違い

翌日まで体外成熟培養してサンプリングした卵、すなわち GV 期のままの dGV 卵、明らかに遅れて MI 期や MII 期になった dMI 卵、dMII 卵について、トランスクリプトームプロファイル調べた。PCA 解析では、dGV 卵は GV 卵と、dMII 卵は MII 卵とトランスクリプトームが似ていたが、dMI 卵は MI 卵と異なるトランスクリプトームを示した。dMII 卵のトランスクリプトームについては、3つのサンプルのうち2つは MII 卵に近かったが、1つは大きく異なるパターンを示した。次に、成熟遅延卵で発現上昇または発現低下している DEGs を同定した ($p < 0.05$, 4-fold difference)。GV と dGV の比較では、dGV サンプルで発現変動を示した遺伝子群は確認されなかった。これは、長時間培養した GV 卵において転写物が比較的安定していることを示唆している。MI と dMI の比較では、GO 解析の結果、dMI サンプルで発現上昇している遺伝子から多くの特異的な遺伝子群が見つかり、特に、ミトコンドリア調節に関連する遺伝子の発現異常が確認された。MII と dMII の比較では、MII 卵で高発現している遺伝子のリストの GO 解析で、molecular function で最も特徴的な term として "ubiquitin protein ligase binding" が見つかった。これまでの研究で、ユビキチンプロテオソーム経路に関する遺伝子の発現が MII 卵で発現が高い事が示されている。これらより、遅延 MII 卵は、受精後の胚発生で必要となるユビキチンプロテオソーム経路に関する遺伝子の発現上昇に失敗している可能性がある。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を使った Canonical pathway 解析では、サーチチェーンシグナル経路に関する遺伝子が見つかった。さらに、MII と dMII 間の発現の差と関わる上流調節因子の候補として、SMARCA4 が見つかった。SMARCA4 の適切な発現は、初期胚における遺伝子発現制御や胚発生に重要であることがわかっている。成熟遅延卵は、SMARCA4 タンパク質を異常に蓄積し、それによって遺伝子発現の調節異常を招き、低い発生能につながるのかもしれない。

結果と考察3: 成熟ステージに特有の遺伝子マーカーの探索

GV ステージの卵と MI+MII ステージの卵を比較して DEGs を同定し、GV ステージで発現が上昇している 1889 個の転写物を見つけた ($p < 0.05$, 4-fold difference)。次に、遺伝子発現レベルに基づいた教師無し遺伝子クラスタリング解析を行い、GV サンプル、特に GV1 と GV2 で強発現が見られるクラスター5 が見つかった。クラスター5の遺伝子と (GV vs MI+MII を比較した) GV サンプルで発現上昇している DEG リストと比べたところ、144 遺伝子が一致した。次に、成熟 MII 卵のみで発現している転写物を探した。教師無し遺伝子クラスタリング解析でクラスター9,12,16 が、MII 卵、特に MII2 と MII3 で強発現を示した。これらのクラスターの遺伝子と、

(GV vs MII を比べた)DEG リストで MII サンプルで発現上昇している遺伝子を比べ、共通している 52 遺伝子を見つけた。これらのマーカー遺伝子の発現を、成熟遅延 MII 卵で調べたところ、発現低下していることが分かった。このことは、これらの遺伝子が、質の良い MII 卵に発現するマーカーの候補となる可能性があることを示唆している。最後に、すべての卵サンプルを使って教師無しクラスタリング解析を行い、MII2 サンプルと MII3 サンプルでのみ高発現しているクラスター 6 と 12 を同定した。これらのクラスターに APOB と TNFRSF10C がみつき、前述したマーカーに加えて質の良い MII 卵を選別するバイオマーカーになるかもしれない。

小括

本章では、ヒト体外成熟卵間でのトランスクリプトームの違いについて調べ、同じ成熟ステージの卵のトランスクリプトームは似通っている一方で、成熟ステージごとに異なるトランスクリプトームを示すことがわかった。これは、GV、MI、MII の各ステージに特有のトランスクリプトームがあることを示唆している。さらに、本実験で得られた正常成熟 MII 卵と、成熟遅延卵を含む他のステージの卵のトランスクリプトームの比較解析により、正常成熟 MII 卵のみで発現が高い遺伝子を見つけ、良質な MII 卵のバイオマーカー候補として示した。

また、体外成熟期間が長くなると、より早く同じステージに達した卵より発現遺伝子数が多くなる傾向があることが分かった。これは、正常な卵成熟過程で分解が進むはずの母性転写産物が、体外成熟培養期間中にうまく分解されていない可能性を示す。このことは、経験的に知られている、早期に成熟した卵と成熟が遅延した卵では発生能に大きな違いがあることの分子機構の一部を反映している可能性がある。

以上の結果をまとめて、*Reproductive Medicine Biology* 誌に発表した (Takeuchi*, Yamamoto* et al., 2022. doi.org/10.1002/rmb2.12464)(*共同筆頭著者)。

第3章 ウシ卵の成熟方法の違いが受精卵におけるトランスクリプトームプロファイルに及ぼす影響

緒言

畜産分野における発生工学技術の発達により、ウシ未成熟卵子を体外成熟培養し、多数の IVM 卵を得、体外受精により受精卵を作出することが可能となっている。しかし、未成熟卵から体外成熟培養した卵と、体内で成熟後に回収した卵では、体外受精後の胚の発生率に差があることが知られている。これは、体内成熟卵と体外成熟卵の間で、後の胚発生に関係のある分子レベルでの違いが存在することを示唆している。そこで、卵成熟方法の違いによる発生能の違いの分子機構を明らかにする目的で、経腔採卵 (Ovum pick up; OPU) で取り出したウシ未成熟卵を体外成熟させた卵と、排卵直前の卵胞から採取した体内成熟卵をそれぞれ体外受精させ、受精卵を scRNA-seq に供してトランスクリプトームを調べた。

材料と方法

ウシ卵サンプルは、独立行政法人家畜改良センター宮崎牧場の黒毛和種のウシより、未成熟卵、成熟卵ともに OPU を実施して採卵した。未成熟卵は OPU による採卵後、体外成熟培養を行うことによって成熟させた。また、体内成熟卵は、ウシに卵胞発育処理、過排卵処置を行って体内成熟させた卵を OPU によって採取した。その後、IVF 似て受精させ、1細胞期胚の時期に透明帯と極体を除いた胚をサンプリングし、scRNA-seq に供した。その後、バイオインフォマティクス解析を行った。

結果と考察

体内成熟卵、体外成熟卵をそれぞれ受精させて得られた受精卵を4個ずつ scRNA-seq 解析に供試し、すべてのサンプルで9百万リード以上検出され、マッピングできなかったリードは10%未満であり、scRNA-seq は成功したと考えた。体外成熟卵と体内成熟卵のトランスクリプトームデータの相関(Pearson correlation)を調べたところ、体外成熟卵、体内成熟卵のほとんどの組み合わせで高い相関がみられた。しかし、体外成熟卵の1サンプルのみ相関が少し低かった。PCA 解析の結果、体内成熟卵同士、体外成熟卵同士でトランスクリプトームの相関性がより高かった。次に、体外成熟卵と体内成熟卵間の DEGs を同定し($p < 0.05$, 4-fold difference)、GO解析を行った。体外成熟卵で発現が高い DEG リストを用いた GO 解析では、脂質に関連する term が見つかった。

小括

第3章では、ウシ体内成熟卵と体外成熟卵から得られた受精卵におけるトランスクリプトームを比較解析し、互いにトランスクリプトームの相関は高く、総じて遺伝子発現が似通っていることがわかった。一方で、PCA 解析より、体内成熟卵と体外成熟卵それぞれに特有のトランスクリプトームがあることを示す結果となった。DEGs を用いた GO 解析でも、体外成熟卵で見つかった GO term に脂質関連の遺伝子群がみつき、体外成熟、体外受精、体外培養された卵や胚に脂肪が蓄積されるという知見に一致した。

第4章 低侵襲的母性転写産物測定法の確立と、胚発生予測への応用

緒言

母性因子である母性転写産物が、受精時や初期発生時に重要な働きをしていることはよく知られているが、母性転写産物を受精卵から非侵襲的あるいは低侵襲的に調べる方法は確立されていない。そこで、個々の受精卵内の母性転写産物発現の違いと胚発生の関係を明らかにするため、低侵襲的に受精卵内の母性転写産物を検出する方法を検討した。本研究室

において、マウス受精卵とそれに付随する第二極体のトランスクリプトームを scRNA-seq で調べ、両者は酷似していることが示されており、第二極体のトランスクリプトームを調べることで、付随する受精卵の母性転写物発現を予測できると考えられる。そこで本章では、ヒトおよびウシにおいても極体のトランスクリプトームは付随する受精卵と酷似するのかを scRNA-seq を用いて調べた。また、ウシ受精卵を用いて低侵襲的に第二極体を採取した後に、極体採取後の受精卵を個別培養に供試し、その後の発生を観察し、胚盤胞期まで発生した胚と途中で発生停止した胚を選別し、胚盤胞期まで発生した胚に特異的に発現する母性転写物の同定を試みた。

材料と方法

第2章でサンプリングしたヒトMII卵、dMII 卵に付随していた第一極体、第3章でサンプリングした体内成熟卵及び体外成熟卵由来ウシ1細胞期胚に付随していた第二極体を scRNA-seq に供した。また、OPUによって採卵し、体外成熟培養の後にIVFにて受精させた1細胞期胚と付随する第二極体を透明帯除去と共にピペッティングで分離し、胚を個別培養し、第二極体は scRNA-seq に供試し、バイオインフォマティクス解析を行った。サンプリングおよび scRNA-seq とバイオインフォマティクス解析は、それぞれ、第2章、第3章と同様に行った。

結果と考察

ヒト未受精卵と付随する第一極体 6 セット、ウシ 1 細胞期胚と付随する第二極体 8 セットを scRNA-seq に供試し、すべてのサンプルで 9 百万リード以上が検出され、マッピングできなかったリードも 10%未満であり、scRNA-seq に成功したと考えた。ヒト・ウシサンプルそれぞれについて、極体と卵または胚で発現している遺伝子について調べた (FPKM>1)。ヒトサンプルでは、極体で発現する転写産物のうち、約 91%が卵でも検出可能であった。ウシサンプルでは、極体で発現する転写産物のうち、約 87%が卵でも検出された。このことから、極体のトランスクリプトーム解析により、付随する 1 細胞期胚または MII 卵の母性転写産物量を推測できる可能性が示唆された。

また、体外成熟培養卵由来1細胞期胚12個を使用し、第二極体は scRNA-seq のためにサンプリングし、1 細胞期胚は個別培養して、胚盤胞に到達した胚 7 個と、発生が停止した胚 5 個を得た。scRNA-seq 解析に供試した極体は、すべてのサンプルで 1 千万リード以上を検出し、マッピングできなかったリードは 5%未満であり、採取した極体の scRNA-seq 解析が可能であることを示した。極体をサンプリングし、胚を個別培養することで、母性転写産物を低侵襲的に調べ、さらに胚発生の追跡を可能とする実験系をウシにおいて樹立したといえる。

小括

本章では、極体を用いた低侵襲的母性転写産物測定法を樹立し、胚の発生能と関連のある母性転写産物の同定を試みた。今後は、第二極体におけるバイオマーカー転写物の発現

を定量的に調べる実験系を確立することによって、受精卵の時点で早期に胚発生能を予測するシステムの開発が期待される。

総括

本論文では、体外成熟卵にはステージごとに異なるトランスクリプトームがある事、異なる発生能の胚同士はトランスクリプトームが異なっている可能性がある事を示した。さらに、卵や胚と付随している極体の母性転写産物発現が酷似していることから、極体のトランスクリプトームを調べることで卵や胚における母性転写物の発現様式を低侵襲的に予測できる事がわかった。以上の結果より、極体を利用することにより、個々の胚間の発生能の違いと母性転写産物発現の関係性を調べる事が可能になったといえる。今後は、本研究で示した手法によって、胚の発生予測に使用できるバイオマーカー転写物の選定を進めていく必要がある。