

博士學位論文

論文要旨

メチルグリオキサールが
マウス配偶子の受精、発生に及ぼす影響に関する研究

令和3年1月22日

近畿大学大学院
生物理工学研究科 生物工学専攻
中野達也

論文内容の要旨

近年、終末糖化産物 (AGEs) と健康との関係が注目されている。AGEs は糖尿病をはじめとする多くの疾患の発症や進展に関わっていることが明らかにされている。不妊領域においても加齢や糖尿病は最も影響の強い患者背景である。高齢の不妊患者や糖尿病不妊患者の中には、血中の AGEs の濃度が健常者に比べて高い患者が存在し、ART 施行後の採卵数や妊娠率の低下が報告されている (Jinno *et al.*, 2010)。しかし、AGEs と妊孕性の関係についてはほとんど明らかとなっていない。本研究では、グルコースなどの糖類から代謝されて生じるカルボニル化合物の一種であるメチルグリオキサール(MG)に着目した。MG はタンパク質との反応性が非常に高く、終末糖化産物(AGEs)の生成過程で活性酸素種(ROS)が産生する。MG は血中や組織中に存在し、糖尿病や慢性腎疾患などのバイオマーカーとしての利用も検討されている。MG の配偶子への影響については、マウス卵母細胞の体外成熟培養下での MG の添加は DNA 損傷の増加、紡錘体形成異常、ミトコンドリア膜電位の低下などをもたらす成熟率を低下させる (Tatone *et al.*, 2011)。また、ヒト精子を 100 μ M の MG に暴露すると細胞膜の損傷が誘発される (Nevin *et al.*, 2018)。しかし、MG の影響を受けた卵子や精子などの配偶子について、受精やその後の発生能については明らかにされていない。そこで本研究では、不妊症との関与が示唆されている AGEs に着目し、その前駆体そして糖代謝の間に不可逆的に蓄積される生理的な増悪因子である MG をマウス卵母細胞の体外成熟培地や精子の前培養培地に加え、成熟、その後の受精、発生能に及ぼす影響について検討した。

本論文の第 2 章では、体外成熟培養における MG の添加がマウス卵子に及ぼす影響について検討した。MG 添加体外成熟培地で培養した結果、MII 期に達した成熟卵子の割合に差は認められなかったものの、紡錘体の形成率は 1 mM で低下がみられた。また、紡錘体の形態については、300 μ M と 1 mM では紡錘体の長径の短縮がみられた。さらに、MII 期卵子を用いた体外受精については、300 μ M 及び 1 mM においては濃度依存的に有意な低下がみられ、胚盤胞発生率についても 300

μM と 1mM で有意に低下していた。これらのことから、体外成熟培養における MG の添加は、細胞内のタンパク質や DNA などとの糖化反応を引き起こし、その機能を障害し発生に影響を与えた可能性が考えられた。そこで、MG が卵子に与える影響を検証するために、卵子及び受精卵内の ROS や AGEs の蓄積、ミトコンドリア機能の評価を行った。MG 由来 AGEs である Argpyrimidine の蓄積量については、MII 期卵子及び受精卵では MG の添加による影響はみられなかったが、2 細胞期では 1mM 区において増加がみられた。また、細胞内 ROS の蓄積については、MG 添加による差はみられなかった。さらに、MG 処理によるミトコンドリア活性への影響は、MII 期卵子から前核期におけるミトコンドリア活性の変化は MG 非添加区では大幅に上昇していたのに対して、MG 添加区では濃度依存的に活性の上昇量が減少した。特に、高濃度の MG 添加区でのミトコンドリア活性は MII 期卵子から 2 細胞期胚までほとんど変化が認められなかった。これらのことから、体外成熟培地へ MG 添加はマウス卵子のミトコンドリアの機能障害を引き起こし、紡錘体形成異常や受精、発生能の低下をもたらした可能性が示された。しかしながら、 $150\mu\text{M}$ の MG 処理区においては受精及び発生能は同等であり、細胞質内の ROS の蓄積やミトコンドリア機能の低下は示さなかった。一方で、Jinno ら (2010) は血中の AGEs 濃度の高い不妊症患者は AGEs 濃度の低い患者と比較して、ART 施行後の採卵数や妊娠率の低下を報告している。しかし、この移植胚の妊娠率の低下については、母体側もしくは胚側のどちらの影響かは明らかではない。そこで、胚自体の着床能などを調べることで MG の胚発生への影響について検討した。偽妊娠マウスへ胚盤胞移植を行った結果、 $150\mu\text{M}$ は $0\mu\text{M}$ や IVF 胚を同等の着床や生産率を示した。また、得られた胎子と胎盤の重量に及ぼす影響について検討を行った。その結果、 $150\mu\text{M}$ は $0\mu\text{M}$ や IVF 胚と比べ、胎盤重量や胎盤/胎子の比率に増加がみられた。これらの結果から、体外成熟培地へ MG 添加はマウス卵子のミトコンドリアの機能障害を引き起こし、紡錘体形成異常や受精、発生能の低下をもたらした可能性が示された。また、体外成熟培養環境下において成熟や受精、発生など影響を及ぼさな

い MG 濃度であっても、胚移植後の胎子や胎盤に影響を及ぼすことを明らかにした。このことから、MG に暴露された卵子では、糖化反応により酸化ストレス以外にも DNA やヒストンへのエピゲノム修飾やタンパク質の機能障害を引き起こし、その後の胚発生能を失っていく新たな経路がはたらいっている可能性が考えられる。

本論文の第 3 章では、精子前培養における MG 添加がマウス精子に及ぼす影響について検討した。マウス精子への MG 処理は、精子運動率と直進運動精子濃度を著しく悪化させることが示された。特に、低速直進運動性精子濃度の減少は著しく、その結果として精子運動性指数が減少した。そこで、これら精子運動性の低下の原因として考えられる膜損傷や ROS の蓄積、ミトコンドリア活性の低下、DNA の損傷などについて検討した。MG 処理した精子における ROS の蓄積については差がみられなかったが、細胞膜の損傷については濃度依存的に増加した。また、PI(-)精子の集団では、300 μ M および 500 μ M 区では ROS の蓄積は観察されなかったのに対し、1 mM および 5 mM 区では蓄積がみられた。次に、MG 処理した精子のミトコンドリア活性については、ミトコンドリア膜電位が高い精子の割合が MG 濃度依存的に低下した。さらに、Sperm chromatin structure assay (SCSA) を用いた精子 DNA の損傷については、すべての MG 濃度区において非 MG 処理区と比べ有意差はなかった。以上のことから、MG の暴露による精子の運動性の低下は、ミトコンドリア活性の低下によるミトコンドリア機能障害が原因と考えられた。また、運動性精子においても ROS の蓄積が 1 mM 以上から増加し、これらの精子を用いることで卵子との受精能や発育能に影響を与える可能性が考えられた。そこで、MG 処理がマウス精子の受精及びその後の発生への影響について検討した。媒精後 6 時間での 2 前核形成率は濃度依存的に有意に低下がみられ、2 前核を形成した卵子における胚盤胞発生率は、500 μ M および 1 mM では濃度依存的に有意に低下した。また、MG 処理精子と未処理精子を使用した胚盤胞の間に形態学的な違いはなく、総細胞数についても有意な差はなかった。これらの結果から、MG はミトコンドリア活性の低下により精子運動性の低下をもたらすことが示唆された。そし

て、それらの運動精子を用いた体外受精においては受精率及びその後の発生能が濃度依存的に低下することを初めて明らかにした。精子への酸化ストレスは胚発生のエピゲノムに影響することが報告されている (Wyck *et al.*, 2018) が、本研究から、MG に暴露された精子に由来する受精卵では、酸化ストレス以外にも糖化反応により DNA やヒストンへエピゲノムやタンパク質の機能障害が生じ、その後の胚発生能に影響した可能性が考えられた。

以上のことから、卵子及び精子の培養過程での MG 添加はミトコンドリア機能の低下をもたらすこと、受精や初期発生能を低下させることを明らかにした。さらに、MG に端を発する糖化反応が長期的に発生プログラムに影響する可能性を提示した。本研究は、メチルグリオキサールが雌性生殖器内に蓄積することにより、卵子においては卵子形成過程に、精子においては受精能獲得の過程に影響を及ぼし、受精後の胚発生能を低下させる事象が起こりうることを体外培養系にて初めて実験的に明らかにした。本研究成果を足掛かりに AGEs と生殖発生との理解が進み、母体環境のバイオマーカーとしての先制医療への利用や不妊カップルの生殖能力を改善するための有用なツールの開発へとつながることが期待される。

研究業績一覧表(学術論文)

論文題目	著者	発表雑誌名等 (巻・発表年月・ページ等)	博士学位論文 との対比
Effects of exposure to methylglyoxal on sperm motility and embryonic development after fertilization in mice.	<p><u>Tatsuya Nakano,</u> Mizuki Kono, Kazuki Segawa, Satoshi Kurosaka, Yoshiharu Nakaoka, Yoshiharu Morimoto, Tasuku Mitani</p>	<p><i>Journal of Reproduction and Development</i> 64: 2021. (accepted)</p>	<p>本論文 第3章に該当する</p>
PGT-Aにおけるラボワークのコツ -低侵襲性を維持しつつ正確にNGS解析を行うための工夫-	<p><u>中野達也</u></p>	<p><i>Journal of Mammalian Ova Research.</i> 2021. (accepted)</p>	
Mitochondrial oxygen consumption rate of human embryos declines with maternal age.	<p>Naoharu Morimoto, Shu Hashimoto, Masaya Yamanaka, <u>Tatsuya Nakano,</u> Manabu Satoh, Yoshiharu Nakaoka, Hisataka Iwata, Atsushi Fukui, Yoshiharu Morimoto, Hiroaki Shibahara.</p>	<p><i>Journal of Assisted Reproduction and Genetics.</i> 37: 1815-1821, 2020.</p>	

研究業績一覧表(学術論文)

論 文 題 目	著 者	発表雑誌名等 (巻・発表年月・ページ等)	博士学位論文 との対比
凍結前の胞胚腔収縮の 確認は胚盤胞選択の評 価因子となる	柴田美智子、 <u>中野達也</u> 、 佐藤 学、中岡義晴、森 本 義晴	日本 IVF 学会雑誌 23: 32-35, 2020	
特集 着床前診断-現在 と近未来の方向性- 【各論】7. 胚盤胞生検 と初期胚生検における 技術的課題－モザイク 胚の発生要因とその取 り扱い－	<u>中野達也</u> 、中岡義晴	産婦人科の実際 69: pp855-860, 2020.	
授精操作後 26 時間の 第一分裂に基づく発 生能の予測精度の再 評価	宮本麻梨恵、 <u>中野達也</u> 、 佐藤学、橋本周、中岡義 晴、森本義晴	日本受精着床学会雑誌 34: 286-291, 2017.	
当院における均衡型相 互転座症例を対象とし た array comparative genomic hybridization を用いた着床前診断の 現状	<u>中野達也</u> 、中岡義晴、松 本由香、庵前美智子、佐 藤学、橋本周、森本義晴	本受精着床学会雑誌 34: 147-151, 2017.	

研究業績一覧表(国際学会・口頭共著)

論文題目	著者	発表大会名等 (発表年月日・開催場所等)	博士学位論文 との対比
<p>On the difference in the morphokinetic parameters in the blastocysts derived from abnormal cleavage embryos and, their influence on miscarriage and live birth</p>	<p><u>Tatsuya Nakano,</u> Manabu Satoh, Shu Hashimoto, Tasuku Mitani, Yoshiharu Nakaoka, Yoshiharu Morimoto.</p>	<p>The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine, Osaka, 2017</p>	

研究業績一覧表(国内学会・口頭筆頭)

論文題目	著者	発表大会名等 (発表年月日・開催場所等)	博士学位論文 との対比
終末糖化産物(AGEs)中間体・メチルグリオキサールの暴露がマウス精子の生殖発生へ及ぼす影響	<u>中野達也</u> 、河野みずき、黒坂哲、中岡義晴、森本義晴、三谷匡	日本アンドロロジー学会 第 39 回学術大会 2021 年、金沢	本論文 第 3 章に該当する
Next Generation Sequencing (NGS) を用いた染色体解析における複数か所の栄養膜細胞生検と胚盤胞の染色体一致率について	<u>中野達也</u> 、佐藤学、中岡義晴、森本義晴	第 38 回日本受精着床学会 総会・学術講演会 2020 年、福岡	
ワークショップ：低侵襲なバイオプシーを目指して-生検細胞数と NGS の解析精度から考える-	<u>中野達也</u>	第 38 回日本受精着床学会 総会・学術講演会 2020 年、福岡	
メチルグリオキサールがマウスの生殖発生へ及ぼす影響	<u>中野達也</u> 、尾西湖々、黒坂哲、中岡義晴、森本義晴、三谷匡	第 37 回日本受精着床学会 総会・学術講演会 2019 年、東京	本論文 第 2 章に該当する
血中酸化ストレスが卵子に与える影響	<u>中野達也</u> 、佐藤学、中岡義晴、森本義晴	第 60 回日本卵子学会学術講演会 2019 年、広島	

研究業績一覧表(国内学会・口頭筆頭)

論文題目	著者	発表大会名等 (発表年月日・開催場所等)	博士学位論文 との対比
メチルグリオキサールが マウス卵子の成熟、受精、 発生能へ及ぼす影響	<u>中野達也</u> 、永井遼、高 松晋吾、細川美咲、黒 坂哲、佐藤学、中岡義 晴、森本義晴、三谷匡	第 36 回日本受精着床学会 総会・学術講演会 2018 年、千葉	本論文 第 2 章に該当 する
異常卵割であっても 3 日 目において形態良好な 7 細胞以上の胚は十分な発 育能を有する	<u>中野達也</u> 、佐藤学、橋 本周、三谷匡、中岡義 晴、森本義晴	第 62 回日本生殖医学会学 術講演会 2017 年、山口	
異常卵割胚の流産及び出 生への影響	<u>中野達也</u> 、佐藤学、橋 本周、中岡義晴、森本 義晴	第 35 回日本受精着床学会 総会・学術講演会 2017 年、鳥取	
タイムラプス観察から得 られた着床前診断におけ る胚盤胞生検の有用性	<u>中野達也</u> 、松本由香、 宮本麻梨恵、佐藤学、 庵前美智子、橋本周、 中岡義晴、森本義晴	第 58 回日本卵子学会学術 講演会 2017 年、沖縄	

研究業績一覧表(国内学会・口頭共著)

論文題目	著者	発表大会名等 (発表年月日・開催場所等)	博士学位論文 との対比
マウス胚性ゲノム活性化 における Cyclin T の機能 解析	高松晋吾、細川美咲、 <u>中野達也</u> 、白水誠也、 黒坂哲、三谷匡	第 36 回日本受精着床学会 総会・学術講演会 2018 年、千葉	

研究業績一覧表(国内学会・ポスター筆頭)

論文題目	著者	発表大会名等 (発表年月日・開催場所等)	博士学位論文 との対比
終末糖化産物の中間体であるメチルグリオキサールが卵子の質の低下を引き起こす	<u>中野達也</u> 、黒坂哲、中岡義晴、森本義晴、三谷匡	第 42 回日本分子生物学会 年会 2019 年、福岡	本論文 第 2 章に該当 する
終末糖化産物 (AGEs) の中間体であるメチルグリオキサールが卵子の質の低下を引き起こす	<u>中野達也</u> 、尾西湖々、高松晋吾、細川美咲、黒坂哲、中岡義晴、森本義晴、三谷匡	第 41 回日本分子生物学会 年会 2018 年、神奈川	本論文 第 2 章に該当 する

研究業績一覧表(国内学会・ポスター共著)

論文題目	著者	発表大会名等 (発表年月日・開催場所等)	博士学位論文 との対比
<p>マウス胚性ゲノム活性化 における PTEF-b 複合体 構成因子 Cyclin T のスプ ライスバリエント (T1、 T2) の作用</p>	<p>高松晋吾、細川美咲、 <u>中野達也</u>、山道惇弘、 白水誠也、黒坂哲、三 谷匡</p>	<p>第 41 回日本分子生物学会 年会 2018 年、神奈川</p>	

研究業績一覧表(その他)

論文題目	著者	発表大会名等 (発表年月日・開催場所等)	博士学位論文 との対比
メチルグリオキサールがマウスの生殖発生へ及ぼす影響	<u>中野達也</u> 、細川美咲、高松晋吾、尾西湖々、黒坂哲、三谷匡	近畿大学大学院サイエンスネットワーク 2018年、大阪	本論文 第2章に該当する
稀少動物種への応用に向けたマウス雄性2倍体胚由来ES細胞の樹立	細川美咲、 <u>中野達也</u> 、高松晋吾、美濃部晃平、黒坂哲、三谷匡	近畿大学大学院サイエンスネットワーク 2018年、大阪	

博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	令和3年3月2日	博士学位論文
	公開内容	メチルグリオキサールが マウス配偶子の受精、発生に及ぼす影響に関する研究
	全文・要約	要約