

様式4 (公表用)

氏名	廣瀬 直樹
博士の専攻分野の名称	博士 (生命工学)
学位記番号	医工農甲 第103号
学位授与年月日	令和4年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	PLC ζ -mRNA 同時注入による円形精子細胞または体細胞由来産仔の作出
論文審査委員	主査 教授 若山 照彦 教授 岸上 哲士 教授 黒澤 尋 助教 若山 清香

学位論文内容の要旨

卵子の人為的な活性化は円形精子細胞との受精や、体細胞核移植等の卵子活性化能を持たない細胞に必要とされている。現在、家畜であるブタやウシ卵子の活性化には薬品や電気刺激が主に卵子の活性化に使われている。しかしこれらの活性化は通常受精よりも発生率や産仔率が低下する。そのため、より自然な方法として、精子頭部に存在するフォスフォリパーゼ C ζ (PLC ζ)をコードする mRNA を卵子内へ注入して卵子を活性化させる方法も開発されている。だがこの方法で円形精子細胞からの産仔作出の報告があるものの、卵子に2回の注入作業を要することから卵子への負荷も多く実用化までに問題を抱えている。そこで、第1章では哺乳類の中で現在最も高い活性化能力を持つとされているウマ PLC ζ -mRNA を採用し、発生向上を目指した。加えて注入方法の改良により卵子への負荷と作業効率の改善を図った。

まずマウス PLC ζ -mRNA とウマ PLC ζ -mRNA を卵子に注入する際の最適濃度を定めるための濃度検討を行った。その結果、マウス PLC ζ -mRNA において 0.1ng/ μ l 区で 18.5%と低い活性化率を示し、1ng/ μ l、10ng/ μ l では 93.8%、96.0%をそれぞれ示した。一方で、ウマ PLC ζ -mRNA では 0.01ng/ μ l で 21.5%の活性化率を示し、0.1ng/ μ l と 1ng/ μ l において、

様式 4 (公表用)

88.5%と 97.9%と高い活性化率を示した。

その後胚盤胞までの発生率を調べた結果、マウス PLC ζ -mRNA において、0.1 ng/ μ l および 10 ng/ μ l 区で胚盤胞発生率の低下が示された。また、ウマ PLC ζ -mRNA において、0.01 ng/ μ l と 1ng/ μ l の両区において、どの段階においても低い発生率を示した。これらの結果から、マウス PLC ζ -mRNA の最適濃度を 1 ng/ μ l、ウマ PLC ζ -mRNA の最適濃度を 0.1 ng/ μ l として今後の実験を行うことにした。

次に最適な不活性化処理精子の注入タイミングを調べた。マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA を注入後それぞれ 115-160 分後に観察を行った。そしてこれらの胚を MII、A/TII、PB の 3 つに分類し活性化開始時間を調べた。その結果極体の放出は 120-145 分後に行われていることが明らかとなった。したがって、不活性化精子の注入は mRNA の注入後に行うことにした。2 細胞期胚をレシピエントマウスに移植を行い産仔率の検討を行った。移植の結果、マウス PLC ζ -mRNA およびウマ PLC ζ -mRNA で活性化された卵子から正常な産仔が得られたが、ウマ PLC ζ -mRNA の産仔率は 24%となり他の区と比較して有意に産仔率が減少した。

第 2 章では最初に PLC ζ -mRNA の注入方法の検討を行った。細胞と同時に注入される PVP 溶液は、単独で注入する場合よりもおよそ 27 分の 1 であることがフィコエステリンの注入量の計算により明らかとなった。実際にマウス卵子へ 2, 20, 100 ng/ μ l の mRNA を注入した後に活性化率と発生率を観察した結果、20, 100 ng/ μ l 区において高い活性化率を示した。その後発生率を観察した結果 20 ng/ μ l 区と 100 ng/ μ l と比較して 20 ng/ μ l の方が高い胚盤胞発生率を示した。

本実験の活性化法が従来法である塩化ストロンチウムによる活性化と比べてどの程度活性化に遅延が見られるのかを調べるために、円形精子細胞を注入してから経時的に核相を観察した。精子細胞の核相は、染色体凝縮、染色体脱凝縮、前核形成の 3 つに分類した。結果として、同時注入を行った場合、活性化が MII 中期まで進行していることが明らかとなった。次に卵子の活性化方法の違いによって卵子のエピジェネティクス修飾が変化するかどうかを調べるために、円形精子細胞と正常受精胚と比較してすでに異常があることが知られている H3K9me3 の蛍光強度を調べた。その結果、正常受精胚と PLC ζ -mRNA を比較して塩化ストロンチウムと活性化した場合と同様の高メチル化が観察された。PLC ζ -mRNA を単体で注入して活性化した場合においても同様の結果が得られた。

実際に円形精子細胞と PLC ζ -mRNA を同時に注入した際の胚盤胞発生率および胚盤胞の質を調べた結果、塩化ストロンチウムで活性化した場合と同等の発生率を示した (65-64%)。一方で PLC ζ -mRNA を単体で注入した場合胚盤胞発生率は低下した(55%)。そ

様式4（公表用）

して胚盤胞の ICM および TE の細胞数を比較した結果、PLCζ-mRNA と円形精子細胞を同時に注入した場合と塩化ストロンチウムにより活性化した場合で差はみられなかった。

第3章では、円形精子細胞による受精卵、および体細胞からクローン胚を作り産仔への発生率を調べた。まず、円形精子細胞と PLCζ-mRNA を同時注入する活性化を繁殖技術に応用することが可能か調べるために、2細胞期の ROSI 胚を偽妊娠雌に移植することで産仔率を調査した。その結果、従来法での生存卵子は74%、円形精子細胞と PLCζ-mRNA を同時に注入した区では77%と有意な差はみられなかった。活性化率においても、2PNの割合が従来法では49%、同時注入法では31%と低くなる傾向はみられたが、有意な差はみられなかった。その後2細胞期に発生する割合は従来法で62%、同時注入法では56%であった。その胚を偽妊娠雌に移植した結果、従来法では30%、同時注入法では31%と差はみられなかった。そして得られた産仔に異常はみられなかった。

PLCζ-mRNA を用いて再構築胚を活性化させた場合において、再構築胚に対してエピジェネティクス修飾に変化を及ぼすかどうかを調べた。再構築胚において H3K9me3、H3k4me3、H3K27me3 が体細胞の初期化に大きくかかわると考えられていることからこの3つの蛍光強度を観察した。その結果、PLCζ-mRNA と塩化ストロンチウムで活性化させた場合を比較したが、有意な差はみられなかった。

最後に、PLCζ-mRNA を用いて体細胞核移植を行い、卵丘細胞から正常な産仔を得ることに成功した。この成功率は同時注入による活性化と塩化ストロンチウムによる活性化は同等の産仔率であった(2.3-1.8%)。一方で、PLCζ-mRNA を単体で注入した場合では他の実験区と比較して産仔率は低下した(0.5%)。また、胎児の重量および胎盤重量に関してすべての区において差は見られなかった。以上より、本研究は新規活性化方法の開発を試みた結果、高い活性化能をもつウマ PLCζ-mRNA を用いても産仔率を向上させることができなかった。一方で、PLCζ-mRNA と細胞を同時に注入する方法は作業効率の改善と卵子への負荷の減少に成功した。

論文審査結果の要旨

本論文は、受精能がない精子および精子前駆細胞である円形精子細胞を用いた不妊治療の際に、卵子を人為的に活性化している点に焦点を当て、産仔率が低い原因究明とその改善を試みた非常に重要な論文である。従来は化学薬品などを用いた完全に人為的な処理で卵子を活性化していた。本論文では、精子が持つ卵子活性化因子である PLCζ を用いて、卵子により自然な活性化をもたらし、出産成績および作業の簡略化を試みている。

第1章では、活性化効率を改善するため、マウスの卵子に対して、哺乳類で最も活性

様式4（公表用）

化効率の強いとされるウマの PLC ζ を注入して比較を行った。異種間という人為的な行為を通して、活性化の本質を調べる手法である。結局、同種であることが一番重要ではあったが、活性化の質について新たな知見を得ることができた。

第2章では、PLC ζ の注入という卵子へ与えるダメージをなくすため、まだ誰も試みたことのない、円形精子細胞と PLC ζ の同時注入という方法を考案した。この方法は、ただ2つを同時に注入すればいいというものではない。最適濃度の検討や、PLC ζ の mRNA の翻訳時間を考慮しなければならず、この技術を確立するために様々な条件検討が必要だった。この検討のため、受精直後の核相を調べる手法の開発、注入した PLC ζ の量を測定する方法を開発するなど、苦労した点が多数みられる。

第3章では、いよいよこの同時注入法で、円形精子細胞由来の受精卵、および体細胞の核移植で作られたクローン胚の発生率、産仔率が改善できるか調べた。この2つの種類の胚は全く異なるため、両者が同一論文で検討されたのは初めてである。またこれまでにない方法であるため、クローン胚についてはエピジェネティック修飾への影響も詳細に調べている。結果は残念ながら出産率の改善には結びつかなかったが、同時注入は、活性化処理という1つの工程が不要となるため、作業時間の大幅な短縮につながる。したがって今後、この手法が卵子活性化の主流になる可能性が初めて示された。この研究は繁殖分野ではもっともレベルの高い Reproduction という国際誌に掲載されており、世界的にも評価されていると考えられる。また、修士課程で手伝った成果については共著者として JRD 誌に発表されている。

最終審査では主査および副査の教員合わせて4名で行い、廣瀬氏に対して厳しい質問を多数行った。副査から本研究の要となる卵子活性化の必要性および同時注入のメリットについて、博士論文中で明確に表現できていない、という指摘を受けた。また、クローン胚には初期化が不可欠だが、同時注入が初期化にどのような影響を与えるのか、という質問に明確な回答をすることが出来なかった。しかし、公聴会で受けたいずれの質問に対しても、廣瀬氏は的確にこたえることが出来ており、個々の研究に対しては十分に理解していると思われた。

博士論文については、標記の不一致や専門用語の略字が説明なく頻出しており、専門外の読者への配慮が見られなかった。図表のタイトルの表記方法を間違えていた点、および行番号が図表にまで付けられていた点なども指摘された。いずれも重大なミスではないが、すべての指摘を最終稿で修正しておくように指示された。

廣瀬氏は他に多数の研究を手伝い共著者になっている。学会発表も多い。これらのことを総合的に討論した結果、廣瀬氏は博士として十分な知識と技術を有しており、今回の成果は廣瀬氏へ博士号を授与するのに値するものであると全員が判断した。