

顕微授精による次世代への影響の解明と その異常の予防法の確立

Elucidation of the effects of ICSI on the offspring and establishment of methods to prevent abnormalities caused by ICSI.

京都大学大学院医学研究科 分子遺伝学 特定助教 城本 悠助

要 約

現在、Assisted Reproductive Technology (ART：生殖補助医療)としてin vitro fertilization (IVF)とintracytoplasmic sperm injection (ICSI：顕微授精)が盛んに利用されている。IVFは精子と卵子を体外で受精させ、受精卵を培養してから子宮に戻す方法であり、ICSIは顕微鏡下で一つの精子を卵子の中に直接注入して受精させる方法である。これらの技術によりARTにより生まれる子供の数は急速に増加しており、世界では1,000万人ほどの子供が生まれ、日本においても2020年の段階で14人に一人がARTで生まれている。しかしながら、いずれの技術も動物実験による安全性の確認が十分に行われず臨床応用されたため、ART出産児の健康に対する長期の影響や孫世代への影響について安全性への懸念があった。

健全な純系マウスを用いてICSIにより子孫の作製を行ったところ、第一世代のICSI産仔には外見上は大きな影響は認められなかったが、行動解析での不安様行動、社会的行動異常、記憶障害などの症状が観察された。また、第一世代のICSI産仔から次世代(第二世代)をIVFにより野生型マウスの卵子を用いて作製すると、着床不全による流産に加え、水頭症、無眼症、臍帯ヘルニアなどの奇形が発生した。これらの先天奇形の原因を調べるため、ICSI産仔の生殖細胞を培養して増加し、網羅的DNAメチル化解析を行ったが原因につながる異常を発見できなかった。胎生期の発生段階に異常があることから胎盤の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、ICSI産仔の第二世代において14遺伝子が発現低下し、21遺伝子が発現上昇していた。これらの遺伝子のGene ontology解析を行ったところ、免疫調節異常や免疫反応遺伝子が濃縮されていた。また、ICSI産仔の第二世代の胎盤においてはDNA-Guanineの酸化体の上昇も認められたことから、現在、先天奇形、免疫機構や老化への影響との関連を解析している。

緒 言

現在6組に1組の夫婦が不妊であり、少子化は大きな社会問題となっている。不妊症の治療にはARTが広く用いられており、IVFはヒトへの応用に多くの科学者からの強い反対がありながらも、1978年に英国で応用された結果、世界最初の試験管ベビーが生まれた。ICSIについては1988年にウサギ2匹の作出に成功し、1990年にウシ2頭の出産が報告され、1992年にはベルギーで臨床応用された。これまでに、世界ではARTにより1,000万人ほどの子供が生まれており、日本でも2020年の段階で14人に一人がこの技術を用いて生まれている。

このようにARTは広く社会に受け入れられてきたが、いずれの技術も動物実験による安全性の確認が

十分になされずにヒトに応用されたため、ART出産児の健康に対する長期の影響や孫世代の異常については不明な部分が多い。ARTにより生まれた子供は大きな奇形は見られないものの、自閉症や精神発育遅滞、先天性ゲノムインプリント異常症の発生が増加していることなどが報告されている。しかしながら、ヒトは遺伝的に不均一であり、不妊症の配偶子を用いているためにこれらの異常が起こった可能性が否定できず、ART自体により異常が生じるのか、ARTがどの程度ヒトの健康に影響を与えているかについては結論が出ていない。

新たなARTの一つとして近年注目されているのが精子幹細胞を用いた技術であり、精子幹細胞は精子形成の源になる細胞である。マウス精子幹細胞を培

養したGermline stem (GS) 細胞は試験管内では2年以上の長期にわたり安定して増殖し、不妊マウスの精巣内へと移植すると精子形成を再開し、子孫を作ることができる。近年のがん治療の進展により多くの小児がん患者の予後が良好となり、20代の若者の250人に一人が悪性疾患の生存者だと考えられている。その一方で、がん治療の副作用として不妊症が問題となっている。放射線療法や化学療法により生殖細胞ががん細胞と共に破壊された結果、がん治療は成功しても生殖細胞を喪失してしまうため、治療を受けた小児の約半数程度が成人した後に不妊症となる。小児患者においては成熟した配偶子がいないため、IVFやICSIを適用できないが、精子幹細胞は小児の精巣にも存在することから精巣の一部分をがん治療の前に回収して精子幹細胞を試験管内で増幅したのちに凍結保存することが可能である。がん患者が成人したのちに、凍結保存したGS細胞を精巣へ自家移植することで不妊症を回避できると期待されている。

我々は臨床応用を行うためには十分な動物実験でGS細胞の安全性を検証することが必要だと考え、遺伝的に均一な純系であり健全なマウスを用いて実験を行った。ヒトでは一世代が30年程度であるが、マウスでは2-3カ月であるために次世代に対する影響も早期に確認することが可能である。また遺伝的に均一な系統を同一の環境で飼育できるため、ヒトで解析するよりも明確にARTの影響を解析できると期待し実験を行った。

方法

GS細胞の精巣への移植

精子幹細胞移植のために、C57BL/6系統のGS細胞(4×10^5 個)をトリプシン処理し、4~6週齢の先天性不妊マウス(Wマウス)の精細管にマイクロインジェクションした。移植により精細管の約75%~85%において細胞の生着が認められた。

本研究では法令を遵守し、京都大学動物実験委員会の審議及び承認を受けて動物実験を実施している。

IVFとICSIによる産仔の作製

体外受精は1.25mMの還元型グルタチオンを添加したHTF培地を用いて行った。精巣上体から採取した精子をHTF培地中で、37℃、5%CO₂環境下で1~2時間プレインキュベートし、精子懸濁液を卵丘-卵

母細胞を含むHTF液滴に加えて受精させた。

ICSIは、ピエゾマイクロピペット駆動装置を用い、HEPES (10.1mM) CZB培地を用いて実施した。ICSIに用いた精子は、GS細胞を移植したWマウスおよび無処理のマウスの精巣から採取した。胚はCZB培地、37℃、5% CO₂環境下で24時間培養し、擬妊娠マウスに移植した。全て24時間、胚培養を行った。受精20日目の朝に帝王切開により生きた胎仔の有無を解析した。

DNAメチル化解析 (Reduced Representation Bisulfite Sequencing : RRBS)

ゲノムDNAはDNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)を用いて、F1個体から樹立したGS細胞から抽出し、Zymo-Seq RRBS Library Kit (Zymo Research)を用いてDNAライブラリーを作製した。300ngのゲノムDNAをMspIで処理し、RRBS-adaptorにライゲーションした。そしてEZ DNA Methylation-Lightning kitを用いてbisulfite処理し、index primerを用いてPCR増幅した。シーケンスはNovaSeq6000 (Illumina)を用い、150bpのpair readで行った。

胎盤での遺伝子発現解析 (RNA-seq解析)

胎盤は胎生期13.5日のControl-F2及びICSI-F2個体から採取した。Total RNAはRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて精製し、RNAの品質をBioanalyzerまたはTapestation (Agilent Technologies)で評価した。ライブラリーは、100ngのトータルRNAを用いてTruSeq stranded mRNA sample prep kit (Illumina)で作製した。ライブラリーは15サイクルのPCR増幅を行い、Illumina NextSeq550を用いてsingle read 76bpの条件でシーケンスした。

そのほかの実験手法については引用文献に記載している¹。

結果

GS細胞を先天性不妊マウス(Wマウス)の精巣に移植し、ドナー細胞からできた精子を用いてICSIによりF1産仔を作製した。この実験ではGS細胞の対照群として、自然交配で生まれた産仔(自然交配群、Control)、正常なマウスの精子を用いたICSI産仔(ICSI群)を作出した(図1A)。この3種類(自然交配、ICSI、GS+ICSI)のマウスを比較すると、自然交配群とICSI群は外見上健常であったが、GS+ICSI

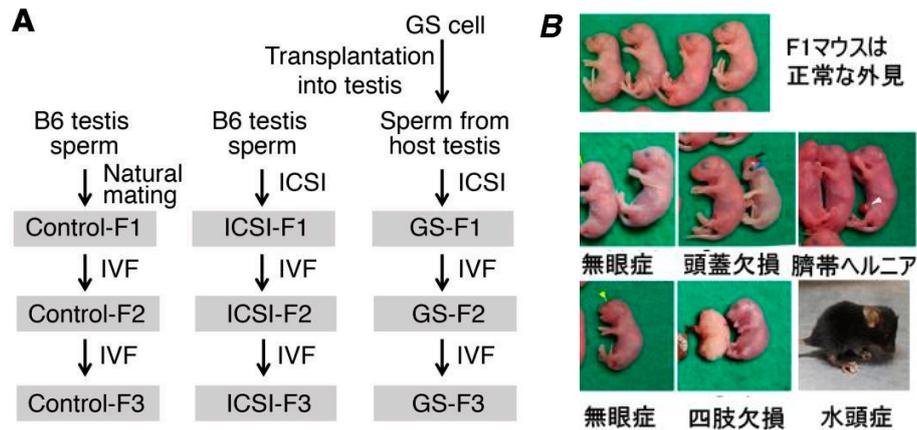


図1. 実験モデルとICSI-F2産仔の先天異常

(A) 自然交配、ICSI、GS細胞移植+ICSIによりF1産仔を作製し、IVFを用いてF2、F3世代を作出した。
 (B) F1世代のマウスに外見異常は認められなかったが、中段、下段パネルで示すICSI-F2産仔では先天異常が認められた。

行動解析		ICSI-F1	ICSI-F2	GS-F1	GS-F2	
General health/neurological screen	GHNS			●	●	Body weight, rectal temperature measurement, condition of whiskers and hair, various reflexes, muscle strength
24hr home cage monitoring	HCSI			●		Social behavior within the home cage
Hot plate	HP				●	Pain sensitivity
Prepulse inhibition/startle response	PPI			●	●	Sensory-motor gating, auditory perception, startle response
Open field	OF			●	●	Activity level, anxiety-like behavior
Light/dark transition	LD		●	●	●	Anxiety-like behavior
Elevated plus maze	EP	●		●	●	Anxiety-like behavior
Tail suspension	TS			●		Depression-like behavior
Porsolt forced swim	PS			●	●	Depression-like behavior
Social interaction (novel environment)	SI			●	●	Social behavior
Social interaction (Crawley version)	CSI	●	●	●	●	Social behavior
T-maze	TM				●	Working memory, reference memory, perseverative tendency
Barnes maze	BM	●				Reference memory, perseverative tendency, working memory
Cued and contextual fear conditioning	FZ		●	●	●	Contextual memory

図2. F1, F2世代の産仔における行動異常

赤いハイライトは行動異常を示す

群では体重が重く、産仔のない胎盤のみとなった個体も観察された(図1A)。

ヒトARTでは精神発育遅滞や自閉症などの行動異常が報告されていることから、この3種類の雄マウスの行動解析を行ったところ、ICSI群の第一世代(F1)マウスでは不安様行動、社会的行動の異常、記憶力低下が観察された。GS+ICSI群F1産仔ではこれらの症状に加えて、鬱様行動や活動量の低下、驚愕反応の亢進なども見られ、より顕著な異常を示した。これらの結果はICSIが子孫の行動異常を引き起こすこと、また精子幹細胞の試験管内培養は子孫の行動異常をさらに悪化させることを示している(図2)。

さらに行動異常が次世代にも伝達する可能性を検

討するために、F1産仔からIVFにより孫世代(F2産仔)を作製した。3種類(自然交配、ICSI、GS+ICSI)のF1雄マウスの精子を野生型マウスの卵子と受精させ、F2産仔を帝王切開により解析したところ、ICSI群とGS+ICSI群において高頻度の着床不全が起こるのみならず、様々な奇形を持つ産仔が生まれてきた。水頭症(1.7%)や無眼症(2.6%)などをはじめとして、全体として11.2%の産仔に奇形が認められた(図1B)。水頭症は自然交配では0.029%の発生頻度であるが、ICSI群ではその137.9倍の頻度で異常が発生した。また自然交配群でも、老化したF1雄の精子を用いてIVFを行った場合には、ICSI群F2産仔と同様な奇形が認められた。

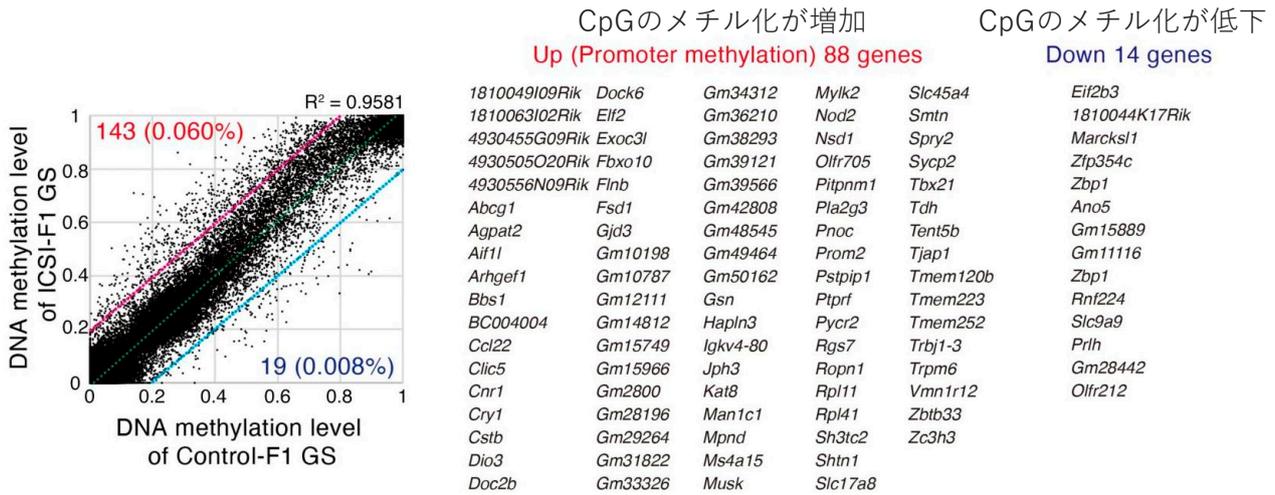


図3. F1産仔の精巣から樹立した培養生殖細胞（GS細胞）におけるDNA-CpGのメチル化解析
Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)法を用いてCpGごとのメチル化レベル測定し、プロットした。
CpGのメチル化レベルが20%以上増加していた遺伝子、20%以上減少していた遺伝子を示す。

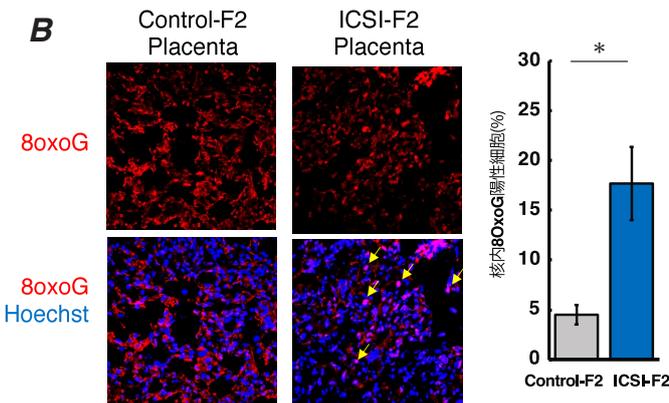
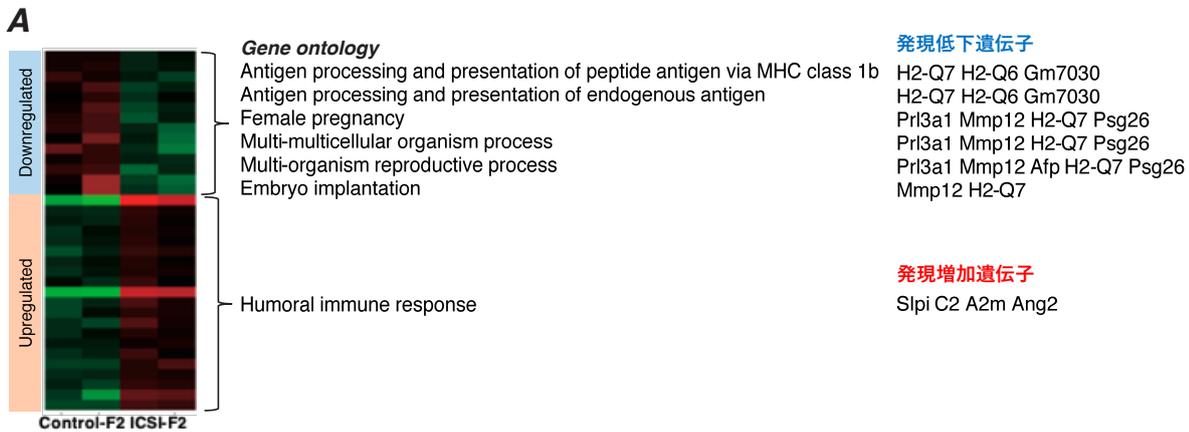


図4. ICSI-F2胎盤における遺伝子発現変化と核内酸化グアニンの増加

- (A) 胎生期13.5日の胎盤における遺伝子発現変化 (RNA-seq) とGene ontology解析。
(B) 抗8OxoG抗体を用いた胎盤迷路部の染色。核内8OxoG陽性細胞を定量した。

そして、F2産仔の行動解析を行ったところ、F1世代よりもやや症状は改善したものの、概ね同様な行動異常がICSI群、GS+ICSI群でも認められた (図2)。またいずれの群においてもF1世代とは異なる、新たな症状も観察されたことから行動異常も次世代へと伝達することが明らかとなった。これまでのところ、奇形の異常はF3世代でも確認されており、ICSI群、GS+ICSI群のF1産仔からIVFだけでなく自

然交配で出来たF2産仔にも奇形が認められている。

これらARTによる異常の原因を解明するために、F1産仔の生殖細胞を培養増殖 (GS細胞樹立) し、RRBS法を用いてゲノムワイドなDNAのメチル化への影響を調べた。ICSI-F1 GS細胞では自然交配-F1 GS細胞と比べ、143個のCpGでのDNAメチル化の増加、19個のCpGでのDNAメチル化の低下が認められた (図3)。Gene ontology解析などを行ったが現

在原因につながるDNAメチル化の異常は発見できていない。

胎生期の発生段階に異常があることから胎生期13.5日の胎盤を採取し、total RNAを精製後、RNA-seq解析を行ったところ、ICSI産仔の第二世代において14遺伝子が発現低下し、21遺伝子が発現上昇していた。これらの遺伝子のGene ontology解析を行ったところ、免疫調節異常や免疫反応遺伝子が濃縮されていた(図4A)。

また、ICSIでは体外での操作が必要となることから低酸素状態である母体内よりも酸化を一時的に受けやすい環境にさらされる。そこで第二世代の胎生期13.5日胎盤における酸化DNAである8-Oxoguanine(8OxoG)量を抗体染色により解析したところ、ICSI群において核内8OxoG量が増加していることが示唆された(図4B)。現在、ICSIによる8OxoGの解消機構への影響、先天奇形、免疫機構への影響について関心を解析している。

以上の結果から、我々はICSIやGS細胞の培養により子孫の行動異常や奇形が起こることを見出した。F1産仔は外見上大きな異常は認められなかったことから、F1産仔の生殖細胞において起こった異常がF2、F3世代で顕在化した可能性がある。その原因としてDNAの酸化や胎盤での免疫異常が関わるのではないかと考え研究を展開している。

Abstract

In vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are 2 major assisted reproductive techniques (ARTs) used widely to treat infertility. Recently, spermatogonial transplantation emerged as a new ART to restore fertility to young patients with cancer after cancer therapy. To examine the influence of germ cell manipulation on offspring development, we produced F1 offspring by a combination of two ARTs, spermatogonial transplantation and ICSI. Although F1 offspring appeared normal, F2 offspring produced by IVF using F1 sperm and wild-type oocytes showed various types of congenital abnormalities, including anophthalmia, hydrocephalus, and missing limbs. To understand the mechanism of congenital malformation of offspring, we performed the reduced representation bisulfite sequencing method to verify the overall genomic methylation of germ cells. Our analysis identified 143 hypermethylated CpGs and 19 hypomethylated CpGs in the ICSI-F1 versus the control-F1 GS cells. Gene ontology analysis failed to detect significant association with specific biological functions. Next, we sought to examine the gene expression profiles in developing placentas. RNA-seq analysis of placentas of 13.5 dpc ICSI-F2 and control-F2 revealed that 36 genes were differentially expressed, with 14 downregulated genes and 21 upregulated genes for ICSI-F2 mice. Gene ontology analysis revealed that most of these genes are related to immunological dysregulation or immune response.

考 察

純系マウスを用いたART技術の評価系はヒトARTの改善に寄与するものと期待されるが、マウスとヒトの種間差は大きいと期待されるが、本研究のマウスでの研究成果がそのままヒトICSIに当てはまるかは不明である。しかしながら、現在用いられているARTはいずれも十分な動物実験を経て確立された技術とは言いがたいことから、今後さらなる実験動物を用いた評価、特に経代的な解析が必要であるといえる。GS細胞の臨床応用については、GS細胞の移植後にICSIでなく自然交配により産仔を作製し、この条件でも異常が起こるかを検討していく。

本研究で得られた知見をもとに、これらの異常の予防法の確立に繋げていきたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なご支援を賜りました、公益財団法人 神澤医学研究振興財団並びに関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

引用文献

1. Kanatsu-Shinohara M, Shiromoto Y, Ogonuki N, Inoue K, Hattori S, Miura K, Watanabe N, Hasegawa A, Mochida K, Yamamoto T, Miyakawa T, Ogura A, Shinohara T. Intracytoplasmic sperm injection induces transgenerational abnormalities in mice. *J Clin Invest.* 2023 Nov 15;133(22):e170140. doi: 10.1172/JCI1170140.