

# 第2回疾患モデルシンポジウム 抄録集

テーマ：生殖細胞のなりたちから不妊治療の基礎まで

日時： 2009年11月17日（火）午後1時30分～5時  
会場： 弥生講堂（東京大学農学部）  
主催： 日本実験動物学会  
共催： 日本繁殖生物学会  
後援： 日本受精着床学会  
日本トキシコロジー学会

## 第2回疾患モデルシンポジウム

テーマ： 生殖細胞のなりたちから不妊治療の基礎まで

日時： 2009年11月17日(火)午後1時30分～5時

会場： 弥生講堂(東京大学農学部)

主催： 日本実験動物学会

共催： 日本繁殖生物学会

後援： 日本受精着床学会

日本トキシコロジー学会

企画担当： 岡部勝(大阪大学)、国枝哲夫(岡山大学)

連絡先： 日本実験動物学会事務局

〒113-0033 東京都文京区本郷5丁目29-12

赤門口イヤルハイツ1103

TEL: 03-3814-8276 FAX: 03-3814-3990

E-mail: [JDK06323@nifty.ne.jp](mailto:JDK06323@nifty.ne.jp)

**プログラム：**

- 1:30～2:00 1. **マウスの精子形成を維持する幹細胞システムとその制御機構**  
吉田 松生（基礎生物学研究所）
- 2:00～2:30 2. **生殖機能障害のモデル動物 - 精子形成異常を中心にして -**  
国枝 哲夫（岡山大学自然科学研究科）
- 2:30～3:00 3. **小胞体品質管理の破綻が引き起こす精子受精能障害と雄性不妊**  
伊川 正人（大阪大学・微生物病研究所）
- 3:00～3:15 休 憩
- 3:15～3:45 4. **マウス初期胚発生におけるオートファジーの新たな役割**  
塚本 智史（放射線医学総合研究所）
- 3:45～4:15 5. **実験動物における顕微授精の応用**  
越後貫 成美（理研 BRC）
- 4:15～4:45 6. **哺乳動物着床前初期胚ライブセルイメージング技術の開発と胚  
評価への応用**  
山縣 一夫，末次 里奈子，若山 照彦（理研 CDB）

## 1. マウスの精子形成を維持する幹細胞システムとその制御機構

吉田 松生 基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門

マウスをはじめほ乳類は、精巣の精細管の中で、継続して精子を産み出し続ける。これは、ほ乳類の生殖戦略の重要な基盤となっている。この、継続する精子形成は、強力な「幹細胞システム」によって支えられている。精子形成幹細胞の移植による検出や長期間の培養といった、実験発生工学に直結する技術的ブレークスルーによって、急速な発展を遂げている。その一方で、実際のマウス個体、あるいは精巣組織の中で、どの細胞が幹細胞で、どこで、どのように挙動（増殖・自己複製・分化・死）することにより、「システムとしての幹細胞」が維持されているのかは、多くが謎に包まれている。

我々は、ライブイメージングやパルス標識といった手法を用いて、この問題にアプローチしている。本シンポジウムでは、少しずつながら垣間みることが可能となって来た「幹細胞」の挙動について述べる。特に、精子形成の幹/前駆細胞である「未分化型精原細胞」の分化のタイミングがどのように制御されているのか？という問題を中心に議論したい。これは、古典的に「精細管周期」あるいは「精細管上皮サイクル」として記載される、精子形成の周期性がいかにして形作られるのか？という問いでもある。

## 2. 生殖機能障害のモデル動物 - 精子形成異常を中心として - 国枝 哲夫 岡山大学・大学院自然科学研究科

不妊症は生活の質に関わる重要な疾患であるにも関わらず、その原因や発生のメカニズムの解明は他の疾患に比べて遅れている。また、産業動物における繁殖障害も、その経済的損失は大きいにも関わらず、原因の解明は進んでいない。そこで、我々はこれらの生殖機能障害の原因や発生のメカニズムを解明することを目的として、生殖機能に異常を呈すモデル動物の確立と解析を試みてきた。それらのモデル動物は、自然発生突然変異により特定の生殖形質に異常を呈する突然変異動物、他の形質の異常を呈する突然変異動物に新たに見いだされた生殖機能異常、ENU（エチルニトロソウレア）誘発により体系的に樹立された誘発突然変異動物、生殖機構に特異的な機能を持つ遺伝子のノックアウトマウスなどが含まれている。例えばC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）のシグナルの欠損より卵成熟における減数分裂の停止が早期に再開する *cn* マウス、細胞分裂のチェックポイント機能の異常により雌雄とも生殖細胞が欠損する *repro22* マウス等、これらのマウスの表現型は多岐にわたっているが、今回のシンポジウムでは、それらの中の精子形成に異常を呈する突然変異マウスについて紹介したい。

精細管内に精原細胞等の未分化な生殖細胞が存在するにも関わらず、成熟した精子が形成されない所謂 Maturation arrest はヒトの男性不妊症にもよく見られる精子形成異常である。我々は、特に精母細胞から精子細胞にかけての減数分裂の進行の異常により精子形成異常を呈する突然変異マウスを中心に解析を進めてきた。その結果、中軸骨格と配偶子形成に異常を呈する *sks* マウスでは、核膜孔構成タンパク質の機能の欠損により、核膜孔を介した細胞内の物質移動の阻害によると考えられる生殖細胞特異的な異常を呈すること、分子シャペロンとしての機能をもつ *Fkbp6* が減数分裂の進行に不可欠な生殖細胞特異的な翻訳制御に関与していると考えられること、ENU 誘発突然変異マウスである *repro34* の解析から、膜融合に関わる *Stx2* 遺伝子の欠損により、減数分裂過程での細胞質の分離の異常による生殖細胞の多核化が生じること、生殖細胞に特異的な *Spata4* 遺伝子の欠損により、減数分裂前期における精母細胞のアポトーシス頻度が増加することなどを明らかにしてきた。

これらの結果から、ほ乳類の精子形成に関わる多様な分子機構とその破綻により生じる特異的な精子形成異常の病態の一端が明らかにされた。今後、これらの機構と病態の関係をより詳細に解明することで、配偶子形成と減数分裂の進行に関わる分子機構を明らかにし、それらを標的とした生殖機能障害の治療や生殖機能の人為的コントロールが可能となることが期待される。

### 3 . 小胞体品質管理の破綻が引き起こす精子受精能障害と雄性不妊 伊川 正人 大阪大学・微生物病研究所

見かけは同じでも受精できる精子とできない精子、何が違うのだろうか？その鍵は精子形成の過程にある。我々は、精細胞の小胞体に存在するレクチンシャペロンが、受精に關与する精子の膜・分泌タンパク質の運命を制御していることに着目して研究を進めている。

体細胞に普遍的に発現するカルレティキュリン(CALR)やカルネキシン(CANX)は、小胞体レクチンシャペロンとして膜・分泌タンパク質の品質管理に重要な役割を担っている。我々はこれまでに、カルネキシンの精細胞特異的ホモログであるカルメジン(CLGN)のノックアウトマウスが、見かけは正常な精子を作るが、精子が卵子の透明帯に結合できないために雄性不妊となることを報告している<sup>1</sup>。その後の解析により CLGN が精子受精タンパク質である ADAM1/ADAM2 のヘテロダイマー形成に必須であり、CLGN なしでは ADAM3 が精子上に提示されないことを明かにした<sup>2,3</sup>。本講演では、精巣特異的な小胞体シャペロンが ADAM の発現を介して精子の受精能を制御するメカニズムを紹介するとともに、遺伝子組み換え動物を用いて得られた受精に関する最近の知見について議論したい。

#### 参考文献

1. The putative chaperone calmegin is required for sperm fertility. Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, Okabe M. **Nature**. 387:607-11 (1997)
2. Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. Ikawa M, Nakanishi T, Yamada S, Wada I, Kominami K, Tanaka H, Nozaki M, Nishimune Y, Okabe M. **Dev Biol**. 240:254-61 (2001)
3. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiko K, Takumi K, Adham I, Ikawa M, Okabe M. **Biol Reprod**. 81:142-6 (2009)

#### 4. マウス初期胚発生におけるオートファジーの新たな役割

塚本 智史 放射線医学総合研究所

オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞質成分の大規模な分解系である。ユビキチン・プロテアソーム系が選択的な分解を担うのに対して、オートファジーは原則として非選択的な分解系であると考えられる。オートファジーの最もよく知られた役割は、飢餓時などの栄養供給と細胞質の品質管理である。最近では、オートファジーの新たな生理機能が次々と明らかになっている。しかし、これまで初期発生におけるオートファジーの役割は不明であった。

受精直後には卵子由来の母性タンパク質は急速に分解され、胚性ゲノムにコードされるタンパク質に入れ替わることが知られている。私たちは、受精直後のマウス初期胚で活発にオートファジーが誘導されることを見いだした。そこで、この時期のオートファジーの生理機能を調べるために、卵子特異的に Atg5 (オートファジー) を欠損したマウスを作製した。この雌マウスでは卵子形成や成熟は正常に起こることが分かった。次に、Atg5 ヘテロ雄マウスと交配させて受精後の初期胚発生を調べた。その結果、Atg5-由来の精子と受精した場合には4～8細胞期の着床前致死となることが明らかとなった。一方で、Atg5+由来(野生型)の精子と受精した場合には産仔を得ることができた。また、オートファジーを欠損した受精卵では、新規のタンパク質合成率が低下することも分かった。受精直後のオートファジーによって母性タンパク質は大規模に分解され、この時期の胚発生に必要なアミノ酸が確保されていると考えられる。

一方、低いレベルで起こる恒常的なオートファジーは細胞内浄化の観点から必要である。その後の解析から、オートファジーを欠損した卵子の細胞質には、加齢依存的にユビキチン陽性の凝集体や不要成分が蓄積することが明らかとなった。老化によって卵子の品質が低下することはよく知られているが、卵子の品質を維持する分子機構は不明である。卵子の品質維持にオートファジーが関与する可能性が示唆される。

このシンポジウムでは、初期発生の視点からオートファジーの多彩な機能について発表したいと思います。

## 5. 実験動物における顕微授精の応用

越後貫 成美 (独) 理化学研究所 バイオリソースセンター

マウスや家畜、希少動物を含めて多くの動物種で顕微授精技術を用いた研究が報告されている。顕微授精は精子を物理的に卵子へ注入する技術であるので、精子の運動性を必要としない。したがって運動性のない精巣精子や精子以前の未成熟精子細胞も受精に関与することが可能である。完成した精子を用いる卵細胞質内精子注入法(ICSI)は、マウスにおいては繁殖不能系統での子孫獲得の一手段としてすでに実用化している。また、体内あるいは体外受精に関する情報が乏しい動物種では胚作製時に体外受精を超える確実な効果を示す場合があり、大変有益な技術となる。それに対し精子以前の未熟精子細胞を用いた顕微授精は、マウス以外の動物種での成功例は少ない。その原因として各動物種における雄性生殖細胞の卵子活性化能の機能発現時期が不明なこと、そして卵子内での星状体形成不全による胚発生停止の可能性の2点が挙げられる。前者について我々はカニクイザル、マストミス、ウサギの精子細胞をマウス卵に顕微注入して活性化能の発現時期について調べた。その結果、伸張精子細胞は卵子活性化能を持っていること、カニクイザルについてはヒトと同様、円形精子細胞からすでに卵子活性化能を持っていることがわかった。次に同種間で顕微授精を行い、精子細胞から産仔あるいは胎仔が得られた。特にカニクイザル円形精子細胞を用いた顕微授精(ROSI)による胎仔作出は、ヒトを除いた霊長類における円形精子細胞での初の妊娠例であり、サル類がヒト不妊治療の最適なモデル動物となりえることを示唆した。また、卵子の活性化に対する感受性が動物種によって異なることが明らかになり、異種間での活性化能の判定が必ずしも同種間に反映しないことが示唆された。後者の中心体は雌雄ゲノムの融合や第一分裂紡錘体形成に関与し、マウス以外の多くの動物種では精子が卵子内に導入することが知られている。ウサギ ROSI 胚では円形精子細胞に中心体が存在しないために星状体形成が認められなかった。またウサギ ROSI 胚が異数体になって発生停止するのも中心体不在による星状体形成不全が原因と考えられる。ヒトの形態異常精子でも中心体が正常に機能していないことが顕微授精を用いた実験で報告されており、実験動物の卵子を使った精子中心体機能検査の必要性が考えられている。

また、顕微授精技術を利用した実用的な応用例としては簡便凍結したマウスの組織および個体由来の精子・精子細胞が産仔作出能を持っていることを明らかにした。本凍結法は今後、顕微授精技術と併用することによってリソースの新たな凍結保存法および輸送方法の一手段として期待できる技術であると思われる。さらには精子発生以前の幼若齢雄マウスの精子細胞を顕微授精に用いて、世代交代期間を半分以下に短縮する超迅速スピードコンジェニック法を確立した。有用研究資源の作出にも顕微授精技術を利用している。野生マウス精子と実験用マウス卵子の顕微授精による亜種間雑種の作製や2個の円形精子細胞核を顕微注入し雌核を除去することで雄核発生胚の作出などである。

本シンポジウムでは上に示した応用例のほかに顕微授精を行う上での重要なポイントや今後の展開についても述べたいと思う。



## 6 哺乳動物着床前初期胚ライブセルイメージングシステム技術の開発と胚評価への応用

山縣 一夫, 末次 里奈子, 若山 照彦

(独)理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター

顕微授精 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) をはじめとする生殖補助医療 (assisted reproductive technology, ART) の発展により、不妊に悩むカップルでも子を得ることが可能になってきている。しかし、いまだに着床不全や流産が高頻度で起きているのが現状である。その原因の多くは胚の染色体異常に由来すると考えられており、妊娠率を向上させるためには染色体の正常性を評価し、確実に産仔へ発生し得る胚を移植前に選別できる技術開発が望まれる。現在、割球バイオプシーと FISH による着床前診断が世界中で広く行なわれているが、この方法では染色体モザイシズムの問題や胚へのダメージがあり、妊娠率向上に関しては議論の余地がある。そこで本研究では、このような問題を解決し得る新しい着床前胚評価法として、胚にダメージを与えずに染色体動態を観察できるライブセルイメージング技術を開発し、妊娠率向上につなげることを目的とした。

卵割時における紡錘体や染色体動態を観察するため、マウス 1 細胞期胚に EGFP- $\alpha$ -tubulin と Histone H2B-mRFP1 をコードする mRNA をインジェクションし、胚盤胞期まで 3 次元イメージングを行なった後、偽妊娠マウスに移植した。蛍光シグナルを検出する顕微鏡機器の開発や、mRNA 濃度、レーザー強度・照射回数を調節することで、最終的には 6 万枚近くの蛍光画像を取得した後も胚が正常に個体発生するイメージング技術を構築できた。そこで、本システムを用いて ICSI 胚の第 1 体細胞分裂を観察したところ、一部の胚において外見上は全く正常であるにもかかわらず染色体分配の異常 (abnormal chromosome segregation, ACS) が観察された。興味深いことに、ACS の出現頻度はオペレーターの技術レベルや精子の保存状態に強く依存していた。得られた動画情報を元に ACS を起こした胚を選別しその後の発生能を検討したところ、半数以上が胚盤胞へ発生し着床していたが、移植の結果、胎齢 7.5 日前後でほぼ全てが流産した。以上の結果より、第 1 体細胞分裂における染色体分配の異常は、ICSI 胚における低出産率の原因の一つになっていると考えられた。また、本技術により、将来流産する胚を 2 細胞期までに特定し、その胚を移植から除外することで妊娠率を向上させることに成功した。さらに、ICSI 胚のみならず円形精子細胞注入胚の妊娠率を大幅に改善することに成功した。本技術は胚に対して低ダメージであり、かつ mRNA の導入による蛍光観察であるため、産仔はトランスジェニック動物にはならないことから、今後新規着床前診断法として畜産動物やヒト ART への応用が期待される。