

—総説—

特集：日本受精着床学会／日本卵子学会合同シンポジウム 2020

凍結に由来するミトコンドリア障害からの胚の回復

Recovery of embryos from cryopreservation induced mitochondrial damages

伊藤 洵・岩田 尚孝*

Jun Ito and Hisataka Iwata*

東京農業大学農学部畜産学科家畜繁殖学研究室 〒243-0034 厚木市

Tokyo University of Agriculture, Department of Animal Science, 1737 Funako, Atsugi, Kanagawa 243-0034, Japan

要旨：凍結保存は胚移植を行ううえで有用な技術である。凍結はミトコンドリアに障害を与えるが、ミトコンドリアの質や機能は良好な胚発育には必要不可欠であり、凍結融解後に胚は凍結に由来する障害から回復する。レスベラトロールにはミトコンドリアの合成や分解を促す働きがある。本稿ではレスベラトロールが、凍結に由来する障害からの胚の回復を促すのかという仮説に対する一連の研究を紹介する。

キーワード：凍結保存, 胚, ミトコンドリア, SIRT1, レスベラトロール

Abstract: Cryopreservation is a useful tool for embryo transfer, however, it does induce mitochondrial damages. Since the proper function and quality of the mitochondria are required for embryonic development, frozen-thawed embryos need to recover from the cryopreservation-induced damages during subsequent embryo development. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis and autophagy through activation of SIRT1. This review introduces studies addressing the hypothesis that resveratrol may help the recuperation of embryos from mitochondrial damages after vitrification or slow freezing.

Key words: Cryopreservation, Embryo, Mitochondria, SIRT1, Resveratrol

はじめに

現在、胚移植はヒト、ウシに幅広く使われており、ヒトでは15人に1人が生殖医療を介して出産され、ウシでは年間10万件近い胚移植が行われている。胚移植には新鮮胚と凍結保存した凍結胚が用いられる。ウシでは、採卵時に偶然移植可能なウシが側にいるか、複数のウシに同期化処理を施す以外、新鮮胚の移植は行われなため、凍結胚を用いるのが一般的である。ヒトでは最良のレシピエントの状態を選択できるため、凍結胚の方が採卵した周期で新鮮胚を移植するより高い受胎率が期待できるという報告もある¹⁾。一方で、凍結保存は胚質を低下させ、この原因の一つにミトコン

ドリアの障害が挙げられる。ミトコンドリアはエネルギー生産やカルシウムシグナル、鉄の代謝やアポトーシスなど細胞にとって重要な細胞内小器官である²⁻⁵⁾。また高度に動的であり、融合や分裂、合成と分解を介してその数や質が維持されている⁶⁾。本稿では凍結融解後に胚が回復するプロセスを、ミトコンドリアの合成や除去を外部から刺激することで助けることができるのかといった仮説に対して行った一連の研究を紹介する。

凍結が胚のミトコンドリアに及ぼす影響

胚の凍結保存は胚移植を利用するうえで必須の技術である。ウシでは利用のしやすさから緩慢凍結が一般に使われており、長期保存や長距離輸送を可能にし、育種や優秀な個体の増産に広く用いられている。一方、ヒトでは凍結胚は妊娠する機会を増やす。そして生存率の高さや融解が施設内で行われることから、超急速凍結法であるガラス化保存法が一般的に用いられている。しかしながら、凍結保存は胚の質を低下させ受胎率を低下させる。ウシでは採取した胚を同じウシに戻すことはなく、任意に選んだレシピエントに

(受付 2020年10月26日／受理 2020年11月19日)

別刷請求先：〒243-0034 神奈川県厚木市船子1737

東京農業大学農学部畜産学科家畜繁殖学研究室

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: h1iwata@nodai.ac.jp

対して移植が行われる。そのため、新鮮胚と凍結胚の移植成績を比較することができる。農林水産省が平成27年度にまとめた、我が国におけるウシ胚移植の受胎率では、新鮮胚に比べて凍結胚は5%受胎率が低い (http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/attach/pdf/index-10.pdf)。このような凍結保存された胚の受胎能力が新鮮胚に比べて劣っている事実は、多くの動物種で広く受け入れられている⁷⁾。しかし、ヒトでは新鮮胚と凍結胚を移植するときのレシピエントの背景が異なっており、凍結融解胚の場合も評価選別後、移植するため直接比較することは難しい。そこで、受胎率に差を認める報告と認めない報告が混在している^{8,9)}。また、凍結胚と新鮮胚に由来する児を比べた仕事では、差がないとする報告¹⁰⁾に対し、ガラス化保存胚に由来する児の体重が大きくなる¹¹⁾という報告もある。いずれにせよ凍結に由来する何らかの影響があることを示唆している。

ミトコンドリアが凍結によって障害を受けることは、電子顕微鏡による観察によって確認されており、羊の胚を用いた検討ではミトコンドリアの形状が膨れた状態になっている¹²⁾。さらに、Daiら¹³⁾は凍結保存によりミトコンドリアの膜電位の低下や局在変化が起こることも示している。ウシを使った我々の検討では、胚盤胞期胚を緩慢凍結保存するとミトコンドリアゲノムの断片化が観察され、ATP含量が低下し、胚の持つミトコンドリア数が減少する¹⁴⁾。また、ウシの8細胞期胚でガラス化保存したウシ胚でも、新鮮胚に比べて融解後ミトコンドリアゲノムの断片化、胚のATP含量の減少、胚盤胞期胚への発生率の低下が観察され、その胚盤胞胚の持つミトコンドリア数も減少する¹⁵⁾。しかし、凍結胚から正常な産仔が得られることを考えると、融解後、凍結に由来するミトコンドリアの損傷は回復されるのであろうと考えられる。

凍結融解後の胚のミトコンドリアの動態

ミトコンドリアには精巧な品質管理機構が備わっており、その経路はミトコンドリアの融合と分裂といった動的な変化に加えて、相反する二つの機構によって調節されている。不要あるいは損傷を受けたミトコンドリアは、速やかに細胞内から除去され、同時に新規のミトコンドリア合成を促すことにより、ミトコンドリア全体の品質が維持される^{16,17)}。ミトコンドリアの内膜の膜電位はATP合成に重要であるが、脱共役剤 (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone: CCCP) で処理して膜電位を失わせると、ミトコンドリアの管理機構の一端をうかがい知ることができる。CCCP処理後、細胞のミトコンドリアの外膜にはパーキンというE3ユビキチンリガーゼが誘導され、外膜の蛋白がプロテアソームにより分解され、その後マイトファジーによって除去される¹⁸⁾。ウシの顆粒層細胞を体外で培養し、CCCPで短時間処理すると、ATPの産生量は低下し、その後の培養中に回復して細胞の生存率には影響を与えないが、培養液中に大量のミトコンドリアゲノム由来の細胞外DNA (mt-cfDNA) が観察できる。この細胞を同時にオートファジーの

阻害剤であるバフィロマイシンで処理するとmt-cfDNA放出が増え、プロテアソームの阻害剤であるMG132で処理すると減る。つまり、機能不全を起こしたミトコンドリアはまずプロテアソームによって分解が始まり、その後マイトファジーによって細胞内で除去されるが、細胞内部での処理能力を超えたものが培地中に表われると考えられる¹⁹⁾。若齢のブタ卵巣から回収した未成熟卵子を10 μMのCCCPで2時間処理し、その後培養した場合は、卵子のATPが一時的に減少するが、卵子の発育能力には影響がない²⁰⁾。しかし、処理後44時間の体外成熟中に卵子中では、ミトコンドリアDNAの合成が活性化し、同時に除去も活性化する。ミトコンドリアの合成の活性化は、TFAM等ミトコンドリア合成を司る遺伝子の発現上昇からも裏付けられる。また、細胞のエネルギーのセンサーでもあり同時にミトコンドリアの合成や分解を制御するSIRT1とリン酸化AMPKの蛋白発現量が増える。興味深いことに若齢と加齢ウシの卵巣から回収した未成熟卵子を対象に同様の実験を行うと、若齢ウシの卵子では、若齢ブタと同様に授精処理後の胚盤胞期胚への発生率には影響がなく、卵子でのミトコンドリアの合成の活性化やSIRT1の上昇が観察されるが、加齢ウシの卵子では体外受精後の発生率が低下し、ミトコンドリアの合成が起こらず、SIRT1の活性化が低調になる²¹⁾。このことは加齢個体ではミトコンドリア障害に対する反応性が低下していることを意味している。

そこでSIRT1を人為的に活性化するとどうなるのか。SIRT1は脱アセチル化酵素であり、多くのタンパク質の活性を制御しているが、その主要なターゲットの一つにPGC1αがあり、その下流に位置するTFAMはミトコンドリアの合成の鍵でもある²²⁾。SIRT1の活性化効果をもたらす多くの物質の中で古くから知られているものにレスベラトロールがある。レスベラトロール (trans-3,4',5-trihydroxystilbene) はピーナッツ、桑やブドウの皮などに含まれるフラボノイドである。若齢ブタ卵巣から回収した未成熟卵子をレスベラトロールで処理すると、卵子の胚盤胞への発生能力が改善する。このときにミトコンドリアの新規合成や分解が活性化し、TFAMの発現量も上昇する。この効果はSIRT1の阻害剤であるEX527抑制剤で失われることから、レスベラトロールがSIRT1を活性化し、ミトコンドリアの合成と分解を促進した結果として卵子の質を改善したと考えられる²³⁾。これらの機序をまとめると図1のようになる。では、凍結がミトコンドリアに障害を与えるのであれば、融解後にSIRT1をレスベラトロールによって活性化させると、胚の回復が早まるのであろうか。

凍結胚のレスベラトロール処理の効果

レスベラトロールを培地に添加し、胚の凍結への耐性を観察した先行的な報告では、Salzanoら²⁴⁾はウシの胚を受精処理の翌日から7日後までレスベラトロール添加培地で培養すると、胚盤胞期胚の凍結後の生存性が改善されることを示している。この論文ではレスベラトロールの効果の

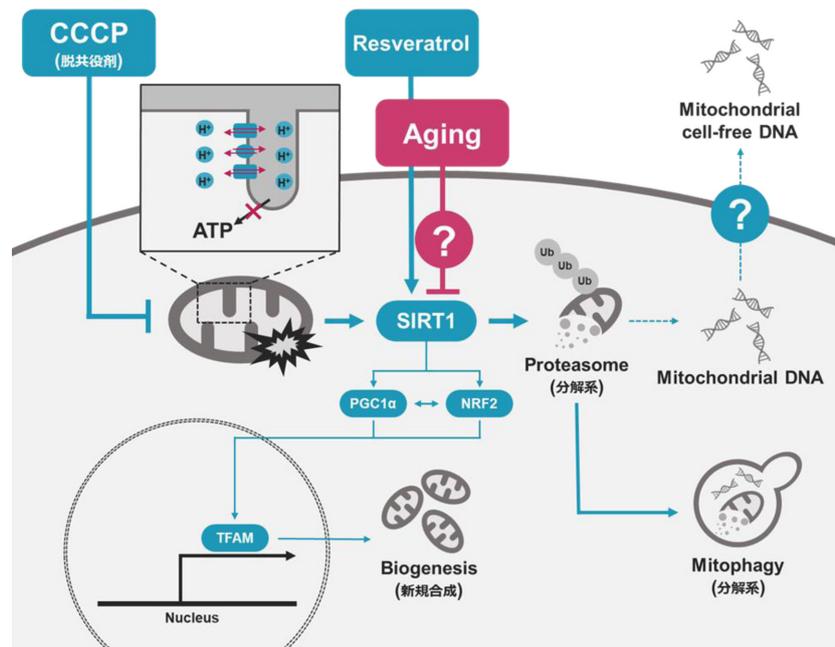


図1 脱共役剤 (CCCP) で処理した後のミトコンドリアの動態

CCCP処理はミトコンドリアの機能不全を招き、引き続きSIRT1の活性化がミトコンドリアの分解と生合成を誘起する。レスベラトロールによるSIRT1の活性化も同様の効果が認められる。ミトコンドリアの分解にはプロテアソームやオートファジーが関与している。これらの過程を阻害するとミトコンドリアゲノム由来の細胞外DNAが減少、または増加するため、ミトコンドリアの分解機構と細胞外DNAの放出には関係性があると考えられるが正確な機序は不明である。またCCCP処理後のミトコンドリアの分解や生合成の活性化は加齢により低調になる。

背景は明らかではない。我々の実験では受精2日目から7日目までレスベラトロール添加培地で培養すると、胚発生率が改善されるだけでなく胚のATPの合成量が増え、逆に胚の脂質含量が減少する。これらの胚でも緩慢凍結後の生存性が改善するため、脂質減少が凍結に対する対抗性の改善と考察している²⁵⁾。また、マウス成熟卵子のガラス化液とその後の培養液にレスベラトロールを添加した試みでは、卵子の活性酸素量を減らす効果があることが報告されている²⁶⁾。一方でレスベラトロールが凍結融解後の胚のミトコンドリアにどのように働くのかについては報告が少ない。ウシの受精後7日目の胚盤胞期胚を緩慢凍結し、融解後レスベラトロール添加培地で培養すると胚の生存率が有意に改善する。さらに、融解後の胚に含まれるミトコンドリア数をミトコンドリアのゲノムのコピー数や膜蛋白のTOMM20で測定すると、レスベラトロール処理により有意に減少し、逆に培養培地中のmt-cfDNAの増加が観察されたため、レスベラトロール処理により凍結によって損傷を受けたミトコンドリアの除去が活性化したのではないかと推測している¹⁴⁾。初期胚を用いたガラス化胚の実験でも同様の事象が観察できる。受精後2日目の8細胞期のウシ胚をガラス化保存し、加温後レスベラトロールを添加した培地で培養すると、胚盤胞期胚への発生率が改善し、胚の活性酸素の含有量が減

り、割球あたりのミトコンドリアゲノムのコピー数や、ミトコンドリアのタンパク (TOMM20) 量が減少する。また、胚の培地中にmt-cfDNAの放出量が増加することも確認できた¹⁵⁾。レスベラトロールの効果について興味深い報告があり、Gaviriaら²⁷⁾はガラス化胚の培養液にレスベラトロールを添加する場合、添加するタイミングで胚のミトコンドリアの活性が2極化 (低調になったり、逆に活性化したり) することを示している。また、胚移植の現場では、融解後の胚を長期間の体外培養することはないため、凍結前にレスベラトロール処理した方が現場での応用が容易である。そこで、初期胚や胚盤胞期胚を用いてガラス化や緩慢凍結前にレスベラトロールで短時間前処理してその後を検討してみることにした。受精後1日目の分割胚をレスベラトロールで24時間前処理するとSIRT1の発現量が増える。この状態でガラス化保存すると、加温後にレスベラトロール処理した胚からの胚盤胞期胚への発生率が有意に改善し、この胚盤胞期胚は、含有するミトコンドリアゲノムのコピー数量が有意に増加していることが明らかになった。一方で、培地に放出されるmt-cfDNA量も同様に有意に増加することや、加温後1-2日目では処理された胚中の膜蛋白で推測したミトコンドリア量がいったん減少することから、レスベラトロールの前処理は、加温後にミトコンドリアの分解を促すと同

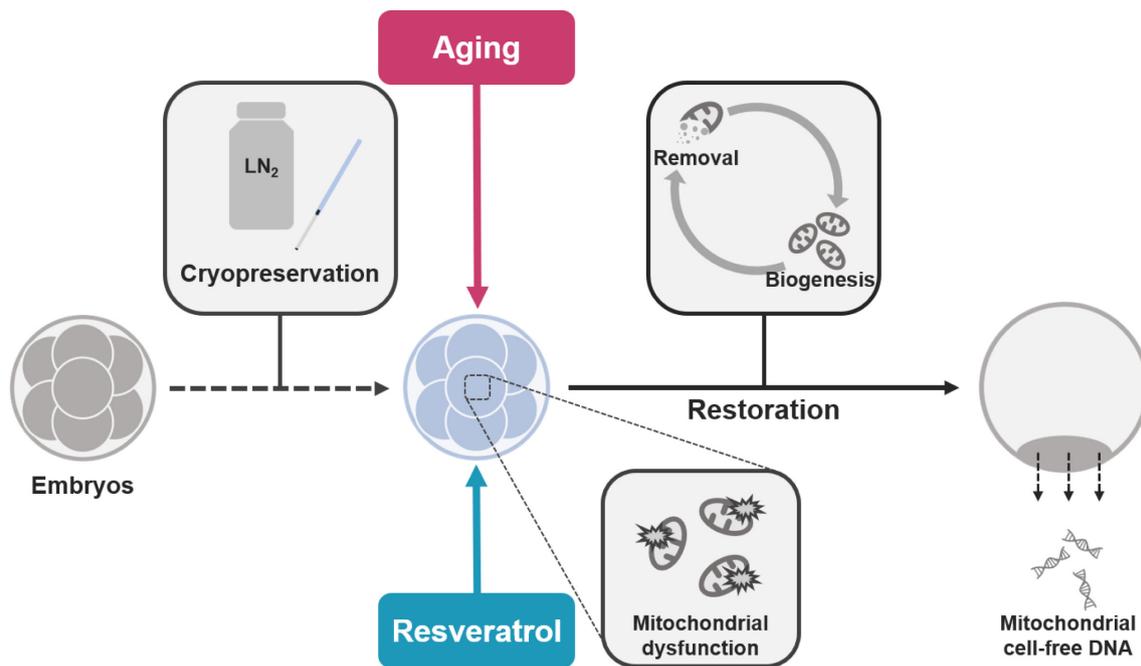


図2 凍結保存によるミトコンドリア機能障害とその回復プロセス

凍結によってミトコンドリアが障害を受ける。融解後これらのミトコンドリアは修復もしくは除去され、そのプロセスにはプロテアソームやマイトファジーなどが関与している。この回復プロセスは加齢によって低調になる。レスベラトロールは、ミトコンドリアの分解や合成を促す作用が有り、凍結胚を処理すると、胚の回復を助ける。このとき細胞外にミトコンドリアのゲノムに由来する細胞外DNAの放出が観察される。

時に新規合成を活性化させていると推測している²⁸⁾。また、授精処理後6日目または7日目の胚盤胞期胚を作成し、6もしくは24時間レスベラトロールで処理すると両者ともSIRT1の発現量が上昇し、この胚を緩慢凍結後、融解して培養すると、胚の生存率や脱出率が有意に改善した。さらに、融解後の胚の持つミトコンドリアゲノムのコピー数は、レスベラトロール処理によって増加する。この胚をレシピエントウシに移植すると、無処理の凍結胚より有意に高い受胎率が得られた²⁹⁾。これらのことから、凍結前後のレスベラトロール処理は胚の質を改善し、その効果がミトコンドリアの分解と合成の活性化と関係していると考えられる。しかし、現場での利用を考えると凍結する前にレスベラトロールで処理の方が現実的である。

残された課題

前述したが、加齢は卵子においてはミトコンドリアの障害に対する反応性を低下させる。加齢・若齢ドナーウシ卵巣から回収した卵子で初期胚を作成し、これをガラス化-加温処理後培養して胚盤胞期胚まで発生させると、両区で発生率は変わらないが、胚盤胞が持つミトコンドリア数が加齢ドナーに比べて若齢ドナーの胚で少なく、培地に含まれるmt-cfDNAは多い(投稿準備中)。新鮮胚の状態では、ミトコンドリア数は若齢ドナーの方が多く、培地中のmt-cfDNAが少ないことを考えると、障害を受けたときのミトコンド

リアの品質管理が加齢で変化していると考えられる。ウシでは加齢に伴い卵巣から回収した卵子のミトコンドリア数が減り、異常受精が増える³⁰⁾。この加齢ドナーウシの卵子では、体外成熟中にレスベラトロールで処理すると異常受精が有意に低下する³¹⁾。そこで、加齢ドナー胚を凍結前または後にレスベラトロールで処理したとき、若齢ドナー胚と同様にミトコンドリアの管理を介して質が改善されるのかは今後の課題である。これらの内容を図2に示す。

文献

- 1) Asada, Y., Tokoro, M., Sonohara, M., Fukunaga, N., Hattori, Y. and Hashiba, Y. (2019): Long-term outcomes of freeze-all strategy: A retrospective analysis from a single ART center in Japan. *Reprod. Med. Biol.*, 18, 173–179.
- 2) Zorov, D.B., Juhaszova, M. and Sollott, S.J. (2014): Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.*, 94, 909–950.
- 3) Wei-Xing Zong, W.X., Joshua, D., Rabinowitz, J.D. and White, E. (2016): Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell*, 61, 667–676.
- 4) Paul, B.T., Manz, D.H., Torti, F.M. and Torti, S.V. (2017): Mitochondria and Iron: current questions. *Expert. Rev. Hematol.*, 10, 65–79.
- 5) Pathak, T. and Trebak, M. (2018): Mitochondrial Ca²⁺ signaling. *Pharmacol. Ther.*, 192, 112–123.

- 6) Ma, L., Chen, G., Li, W., Kepp, O., Zhu, Y. and Chen, Q. (2020): Mitophagy, Mitochondrial Homeostasis, and Cell Fate. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 24, 8: 467.
- 7) Moussa, M., Shu, J., Zhang, X. and Zeng, F. (2014): Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci. China, Life Sci.*, 57, 903–914.
- 8) Muthukumar, K., Kamath, M.S., Mangalaraj, A.M., Aleyamma, T., Chandy, A. and George, k. (2013): Comparison of clinical outcomes following vitrified warmed day 5/6 blastocyst transfers using solid surface methodology with fresh blastocyst transfers. *J. Hum. Reprod. Sci.*, 6, 59–64.
- 9) Moussa, M., Shu, J., Zhang, X.H. and Zeng, F.Y. (2014): Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci. China. Life. Sci.*, 57, 903–914.
- 10) Wang, X., Zhang, X., Qin, Y., Hao, D. and Shi, H. (2012): Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 29, 883–889.
- 11) Maris, E., Ferrieres-Hoa A., Gala, A., Coffy, A., Vintejoux, E., Ranisavljevic, N. and Hamamah, S. (2019): Comparison of birth weights of children born after slow frozen embryo replacement versus fresh embryo transfer. *Gynecol. Obstet. Fertil. Senol.*, 47, 305–310.
- 12) Dalcin, L., Silva, R.C., Paulini, F., Silva, B.D.M., Neves, J.P. and Lucci, C.M. (2013): Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*, 67, 137–145.
- 13) Dai, J., Wu, C., Muneri, C.W., Niu, Y., Zhang, S., Rui, R. and Zhang, D. (2015): Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. *Cryobiology*, 71, 291–298.
- 14) Hayashi, T., Kansaku, K., Abe, T., Ueda, S. and Iwata, H. (2019): Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. *Anim. Sci. J.*, 90, 849–856.
- 15) Hara, T., Kin, A., Aoki, S., Nakamura, S., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2018): Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *PLoS One*, 13, e0204571.
- 16) Altshuler-Keylin, S. and Kajimura, S. (2017): Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci. Signal.*, 10, eaai9248.
- 17) Pickles, S., Vigié, P. and Youle, R. J. (2018): Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr. Biol.*, 28, R170–R180.
- 18) Yoshii, S.R., Kishi, C., Ishihara, N. and Mizushima, N. (2011): Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 286, 19630–19640.
- 19) Kansaku, K., Munakata, Y., Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2018): Mitochondrial dysfunction in cumulus-oocyte complexes increases cell-free mitochondrial DNA. *J. Reprod. Dev.*, 64, 261–266.
- 20) Itami, N., Shiratsuki, S., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2015): Mitochondrial biogenesis and degradation are induced by CCCP treatment of porcine oocytes. *Reproduction*, 150, 97–104.
- 21) Kansaku K., Takeo, S., Itami, N., Kin, A., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata H. (2017): Maternal aging affects oocyte resilience to carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone -induced mitochondrial dysfunction in cows. *PLoS One*, 12, e0188099.
- 22) Scarpulla, R.C. (2008): Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.*, 88, 611–638.
- 23) Sato, D., Itami, N., Tasaki, H., Takeo, S., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2014): Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. *PLoS One*, 9, e94488.
- 24) Salzano, A., Albero, G., Zullo, G., Neglia, G., Abdel-Wahab, A., Bifulco, G., Zicarelli, L. and Gasparrini, B. (2014): Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 51, 91–96.
- 25) Abe, T., Kawahara-Miki, R., Hara, T., Noguchi T., Hayashi T., Shirasuna, K., Kuwayama T. and Iwata, H. (2017): Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol. *J. Reprod. Dev.*, 63, 455–461.
- 26) Wang, Y., Zhang, M., Chen, Z. and Du, Y. (2018): Resveratrol promotes the embryonic development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. Anim.*, 54, 430–438.
- 27) Gaviria, S.M., Morado, S.A., Herrera, A.L., Betancur, G.R., Álvarez, R.A.U., Zuluaga, J.E. and Cética, P.D. (2019): Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 31, 521–528.
- 28) 伊藤 洵・久保穂乃佳・中村慎佑・岩田尚孝 (2020) : ガラス化前のレスベラトロール処理がミトコンドリアとウシ胚発生に及ぼす影響. *J. Mamm. Ova. Res.*, 37, 23–30.
- 29) Hayashi, T., Ueda, S., Mori, M., Baba, T.Y., Abe, T. and Iwata, H. (2018): Influence of resveratrol pretreatment on thawed bovine embryo quality and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology*, 106, 271–278.
- 30) Iwata, H., Goto, H., Tanaka, H., Sakaguchi, Y., Kimura, K., Kuwayama, T. and Monji, Y. (2011): Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 23, 424–432.
- 31) Takeo, S., Kawahara-Miki, R., Goto, H., Cao, F., Kimura, K., Monji, Y., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2013): Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events. *Mol. Reprod. Dev.*, 80, 508–521.