

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10664

研究課題名(和文) 卵細胞質異常に起因する胚発生障害の治療法の開発に向けた基礎的検討

研究課題名(英文) Basic examination for the development of the cure for embryo development disorder due to ooplasm abnormality

研究代表者

深澤 宏子 (FUKASAWA, Hiroko)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：60362068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢卵の細胞質の機能異常のメカニズムを明らかにするために、マウスのMII卵を用いて、卵細胞質内のミトコンドリアの分布を新鮮卵と加齢卵のモデルとして採卵後24時間経過した 1-day-old 卵と比較した。新鮮卵ではミトコンドリアは紡錘体周囲へ集まるように分布の経時的変化が生じるが、1-day-old 卵ではミトコンドリアの分布に変化は生じなかった。このことが、1-day-old 卵の発生能の悪さの原因の1つになっている可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In aged oocyte, low developmental rate was reported to be associated with mitochondrial abnormal distribution. Thus using the metaphase II spindle injection (MESI) method, we investigate the relationship between the spindle and mitochondrial distribution in the murine MII oocyte. The MII spindle might be a determination factor of the mitochondrial distribution in the fresh MII ooplasm, but mitochondria were no longer redistributed in the 1-day-old ooplasm, implying that the redistribution potential of mitochondria might be related to the function of the MII oocyte.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：ミトコンドリア分布 紡錘体移植 胚発生

1. 研究開始当初の背景

1978年に世界初の体外受精-胚移植 (IVF-ET) による生児の英国からの報告、1992年に世界初の顕微授精 (ICSI) による生児のベルギーからの報告を画期として 1990年代後半より、世界的にこれら生殖補助医療 (ART) の臨床応用が急速に拡大した。ARTの開発以前には妊娠が不可能であった両側卵管閉塞、重症卵胞発育不全や乏精子症の症例においても児を得ることが可能となった。しかしながら、高齢の不妊症症例に対する治療の困難性が大きな問題となっている。すなわち、最近の我が国の晩婚化と女性の社会進出により、挙児を希望する年齢が高齢化し、その結果、不妊症症例の初診時の年齢も高齢化してきた。こうした高齢の不妊症症例の中には、すでに加齢に伴って卵子の質が低下しているため (加齢卵)、ICSI によって作出した受精卵が正常に胚発生できない症例が多く含まれる。

この加齢卵から得られた胚が発生障害をきたす原因は、主に、加齢卵の細胞質の機能異常によるものと考えられている。そのため、加齢卵由来の胚の発生障害を改善するためのさまざまな方法が試みられてきた。具体的には、1) 加齢卵の GV (germinal vesicle) 期の核体 (karyoplast) を若年ドナーから得た GV 卵から GV を除去した細胞質体の卵卵腔に留置し、電気融合を用いて再構築卵を作成し、加齢卵の発生能を改善するという試み、ならびに、若年女性の卵子から得たミトコンドリアを加齢卵の細胞質に注入して発生率を改善する試み、などである。しかしながら、こうした細胞質置換を行うと、ミトコンドリアのヘテロプラスミーが生じ、それが発育個体にいかなる影響を及ぼすのかが未知数であるので、現在のところ実用化には至っておらず、今後とも実用化にはかなり慎重であるべきものとする。また、最近進歩してきた凍結技術を用いて、未受精卵を凍結保存しておく、という方法論も提唱され試みられているが、凍結による未受精卵細胞質の物理的障害の問題が解決しているとは言えず、また、将来必要になるであろう個人を特定することは困難であることから、一般的な方法になるとは考えられない。

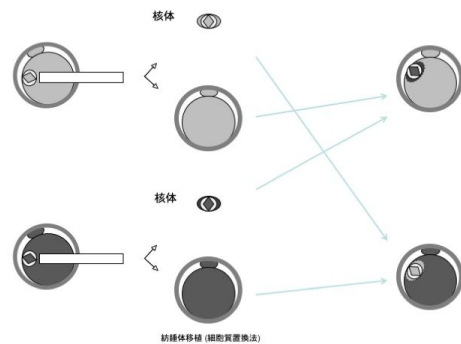
2. 研究の目的

加齢卵由来の胚の発生障害の主要原因は、加齢卵の細胞質の機能異常によるものと考えられてはいるが、その「機能異常」の具体的なメカニズムについてはほとんど解明が進んでいないというのが現状である。そうであるがゆえに、加齢卵由来の胚の発生障害にたいする治療法として細胞質置換しか考えられていないのである。この点、この加齢卵の細胞質の機能異常のメカニズムの解明が進めば、細胞質置換に依らないまったく新しい治療法の開発に結びつく可能性がある。そこで、研究代表者らは、新しい研究技術である

MESI (metaphase II spindle injection) 法を用いて加齢卵の細胞質の機能異常のメカニズムを、とくに、MII 卵細胞質内のミトコンドリアの分布の制御機構に焦点を絞って、解明することを目的として立案したものである。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア分布制御機構を検討するために、採卵した MII 卵のミトコンドリアを蛍光色素 (Mitotracker Green FM、Molecular Probe) にて染色して経時的に観察した。さらに染色した MII 卵から除核用ガラスピペットを用いて核体 (紡錘体と周囲の細胞質) と細胞質体とに分離し、得られた核体をマイクロインジェクション用ガラスピペットで細胞質体にインジェクションして得た再構築卵と、体細胞核移植を行った再構築卵、細胞質体におけるミトコンドリア分布を同様に観察した。この観察には同時に複数の卵子や胚を蛍光観察することが可能な time lapse 装置を用いた。



(2) 採卵した MII 卵、採卵後 24 時間経過した卵を 1-day-old 卵とし、それぞれのミトコンドリアを (1) と同様に蛍光色素で染色して経時的に観察した。

(3) MESI 法を用いて、新鮮 MII 卵と 1-day-old 卵の紡錘体を入れ替えた再構築卵を作成し、IVF にて受精させ、その後の胚発生を観察した。

(4) MESI 法を用いて、新鮮 MII 卵と 1-day-old 卵それぞれの紡錘体を細胞質内で移動させ、同様に観察した。

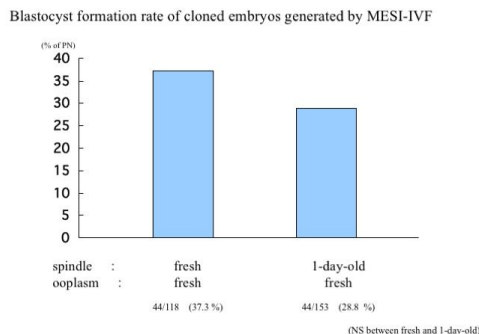
4. 研究成果

(1) MII 卵のミトコンドリアは、紡錘体周囲に集まるように分布が経時的に変化していた。さらに、紡錘体を除核した細胞質体を同様に観察したところ、ミトコンドリアの分布に経時的な変化はまったく見られなかった。ミトコンドリアの分布に影響を与える可能性があると思われる物質として、体細胞核である卵丘細胞核を紡錘体の代わりに細胞質体にマイクロマニピュレーションにて核移植したところ、紡錘体と同様に、体細胞核

周囲に集まるようにミトコンドリアの分布は変化した。このことから、ミトコンドリアの細胞質内での分布制御に紡錘体あるいは体細胞核が関わっていることが示唆され、それが無い状態ではミトコンドリア分布は変化しないことが考えられた。また、ミトコンドリアの分布の経時的变化はその後の発生に影響を与えるであろうことが予測され、ミトコンドリアの分布の経時的变化と胚発生能に関連があることが示唆された。

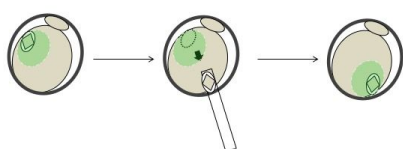
(2) ミトコンドリア分布の異常な卵細胞由来の胚の初期発生が障害されることが明らかとなっているため、その分布とその経時的变化を観察したところ、新鮮未受精卵と比較して、1-day-old 卵ではミトコンドリアの分布が異なることが明らかとなった。さらに 1-day-old 卵では、紡錘体除去卵と同様にミトコンドリア分布に経時的な変化が見られないことが明らかとなった。

(3) もともと 1-day-old 卵は IVF を行っても受精せず、顕微授精を行っても発生しないが、1-day-old 卵の紡錘体を新鮮 MII 卵の細胞質体に移植した再構築卵に IVF を行うと、紡錘体も細胞質体も新鮮 MII 卵由来のコントロール群に比しても、有意差なく胚盤胞まで発生し、さらに 1-day-old 卵紡錘体由来の産仔も得られた。

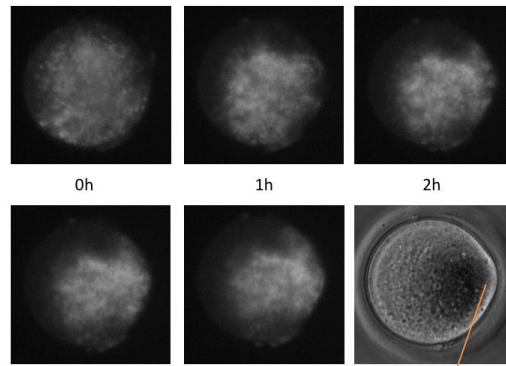


(4) 染色した新鮮 MII 卵と 1-day-old 卵の紡錘体を 180° 移動させてミトコンドリア分布の経時的变化を観察すると、新鮮 MII 卵では紡錘体を移動させても移動した紡錘体周囲に集まるようにミトコンドリア分布が変化したが、1-day-old 卵では分布の変化は生じなかった。

新鮮卵 180° 移動

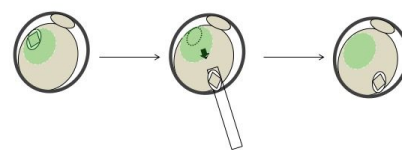


ミトコンドリアの分布は経時的に変化し、紡錘体周囲へ移動しているような現象が観察された。

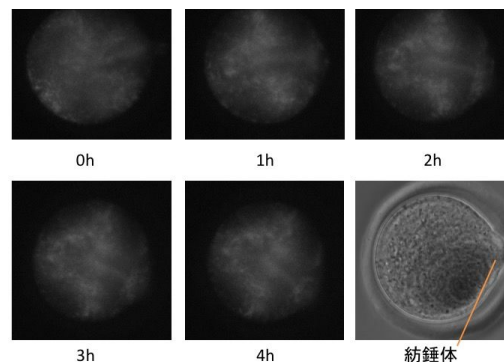


新鮮卵 180° 移動

1-day-old 卵 180° 移動



採卵後 24 時間が経過した卵細胞質内のミトコンドリア分布は経時的に変化しない。



1-day-old 卵 180° 移動

以上のことから、1-day-old 卵における発生能の低下は、紡錘体よりも、細胞質機能の低下が寄与するところが大きく、さらにその機能はミトコンドリア分布が経時的に変化するかと密接に関わっている可能性が示唆された。このことから、ミトコンドリア分布を変化させている機構を今後明らかにしていくことが、加齢卵の発生能低下のメカニズム解明に近づくものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- 1) 深澤宏子, 平田修司: 1-day-old 卵の紡錘体移植による産仔作出の試み. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 70 (2):, 2018.
- 2) 岡本遼太, 深澤宏子, 平田修司: 1-day-old 卵における細胞質内ミトコンドリアの動態. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 69 (2):,

2017.

3) 深澤宏子, 岡本遼太, 平田修司: MII 卵紡錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンドリア分布についての検討. 日本産科婦人科学会雑誌 査読無 67 (2): 728, 2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 深澤宏子, 平田修司: 1-day-old 卵の紡錘体移植による産仔作出の試み. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 2018 年 5 月 13 日 仙台国際センター(宮城・仙台市)

2) 岡本遼太, 深澤宏子, 平田修司: 1-day-old 卵における細胞質内ミトコンドリアの動態. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017 年 4 月 15 日 広島グリーンアリーナ(広島・広島市)

3) 深澤宏子, 岡本遼太, 平田修司: MII 卵紡錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンドリア分布についての検討. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 2015 年 4 月 11 日 パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 宏子 (FUKASAWA, Hiroko)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号: 60362608

(2) 研究分担者

平田 修司 (HIRATA, Shuji)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号: 00228785