

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05468

研究課題名(和文) MST法による卵細胞質機能低下克服への挑戦：次世代への安全性の担保も目指して

研究課題名(英文) Challenge of overcoming recurrent IVF failure due to cytoplasmic dysfunction by MST: To secure safety in future generation

研究代表者

立花 眞仁 (TACHIBANA, Masahito)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30431571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質置換法の細胞質因子に起因する難治性不妊患者への応用を目指した。当初用いたMST法はマウスにおいては後の体外受精における受精、胚発生が十分ではなく、代替法として新規の技術である前核期大量細胞質移植法(PNCT)を開発した。PNCTは正常受精卵の胚発育を優位に改善し、妊孕性をもつ正常産仔に発生することが確認された。

一方、細胞質因子を想定した排卵後加齢卵を用いた検討では、改善効果が確認できず、その原因として使用するドナー細胞質については異常受精のなかでも精子が侵入した3前核胚が適していることがわかった。今後3前核期胚細胞質に限定したPNCTによる追加の検討が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発したPNCT法は廃棄される異常受精胚の細胞質機能に着目した。本法は自己の異常受精胚細胞質を利用する場合、ミトコンドリアのヘテロプラスミーの問題を解決し、配偶子系列の遺伝子改変を伴わない手技となる。一方、他者(若年者)の異常受精胚細胞質を用いる場合でも、廃棄される胚を利用するという点ではより倫理的である。本法は高齢難治性不妊治療における新たな治療戦略を提供する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to adopt cytoplasmic replacement technique for rescuing cytoplasmic dysfunction in ART. Our initial attempt of MST with mouse oocytes was inefficient due to low fertilization and impaired embryo development. Therefore, we explored and developed a new technique called ProNuclear phase Cytoplasmic Transfer (PNCT). PNCT enables exploit cytoplasm of abnormally fertilized zygote (1PN or 3PN), which normally discarded, and transfer large cytoplasm to perivitelline space of 2PN zygotes. PNCT significantly enhanced development of 2PN mouse zygotes to the blastocyst stage and yielded normal pups with confirmed their future fertility. However, we could not confirm improved embryo development when we applied PNCT to post-ovulatory aged oocytes. We revealed that 1PN cytoplasm was developmentally inferior to 3PN cytoplasm. Thus, we had to restrict to use of 3PN zygote as a source of cytoplasm donor for PNCT. Further study will clearly define usefulness of this technique.

研究分野：生殖生物学、生殖内分泌学、生殖遺伝学、産婦人科学、内視鏡手術

キーワード：生殖医学 卵細胞質 核移植 配偶子系列遺伝子治療 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、加齢に伴う低品質卵の要因として細胞質の劣化が注目されている。加齢による細胞質の劣化は、卵細胞質に存在する膨大なミトコンドリア(ミトコンドリア遺伝子)の遺伝子変異の蓄積や、機能低下と関連し、低品質卵の原因の一端を担っている。

研究代表者は、細胞質と細胞質に膨大に存在するミトコンドリアを置換するミトコンドリア置換療法(Mitochondrial Replacement Therapy: MRT)である MII 期細胞質置換(Maternal Spindle Transfer: MST)法を開発し、効率的なミトコンドリア置換が可能であることが示した。現在、MST 法と前核移植(ProNuclear Transfer: PNT)を用いたミトコンドリア遺伝病に対する治療は、2015 年に英国で世界初の配偶子系列遺伝子治療として臨床試験に入っている。MRT 技術は細胞質機能を改善することから不妊治療への応用が可能ではないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、臨床 IVF における細胞質因子に起因する低品質卵に着目し、MRT 技術である細胞質移植を用いた細胞質機能改善と臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

マウス体外受精

東北大学倫理委員会認証(2016 医動-302)のもと C57/B6 (B6) か B6D2F1 (BDF1)マウスを用いた。卵子は 6~12 週齢の マウスより採取。卵管内加齢卵においては hCG の腹腔内投与後、約 24 時間に卵管内排卵を確認して採取。精子は 6~12 週齢の マウスの精巢上体尾部精子を回収した。前核の判定は媒精後 6-8 時間に行い、受精後の胚は胚発育を観察した。

胚移植

ICR マウスのエストラスを確認して精管結紮 マウスと同居させ、膣栓を確認した日を 1day post-coitus (dpc)とした。2.5dpc に胚盤胞到達胚を ICR マウスの子宮へ移植した。

MST 法

MST 法の詳細は過去の文献にある(Tachibana Et al., Nature 2009)。マウス MII 期卵は、5ug/ml 濃度のサイトカラシン B (CB) 添加 M2 培地内で紡錘体を置換。Karyoplast-Cytoplasm の融合には不活化センダイウィルスエンベロープ (HVJ-E) を使用した。

前核期大量細胞質移植法 (pronuclear phase cytoplasmic transfer : PNCT)

IVF 後前核期観察後の正常受精胚(2 前核: 2PN) と異常受精胚(1 か 3 前核: 1PN or 3PN) に分類。正常受精胚(2PN) よりは極体の融合を防止するため、5ug/ml 濃度の CB 存在下で極体除去を行う。異常受精胚(1PN or 3PN) からは、10ug/ml 濃度の CB 存在下で極体と前核を全て除去した核遺伝子フリーの細胞質体(Cytoplasm)を作成。約 1/3~1/2 の異常受精胚細胞質体を HVJ-E へ短時間暴露した後、正常受精胚の卵胞腔へ移植する。

ATP 測定

測定は胚盤胞到達胚をルシフェラーゼ発光法を用いた ATP 測定キットにてルミノメーターで測定した。測定値はスタンダードサンプルを用いた絶対定量値とした(nM)。

胚呼吸量測定

胚呼吸量測定装置は当科にて開発した Chip-sensing Embryo Respiration Monitoring system (CERMs)を使用(Kurosawa et al., Hum Reprod 2016)。測定値は酸素消費量として計算(fmol/s)。

4. 研究成果

マウス MST

B6 マウス未受精卵を用い、8 周期 83 個の卵子を用いて MST を施行した。マウスにおいても既報と同様 95.2% (89/93) で細胞質置換が可能であった。しかしながら、IVF を用いた 2 細胞発生率は 20% (15/89) と低率であり、受精卵の胚盤胞到達率は 33.3% (5/15) と低率であった。また、置換ではなく、MII 期卵への他の卵子からの細胞質の付与も検討したが、やはり受精以後の発生が低率であった。この原因として近郊型マウスの使用と顕微受精の必要性が考えられた。

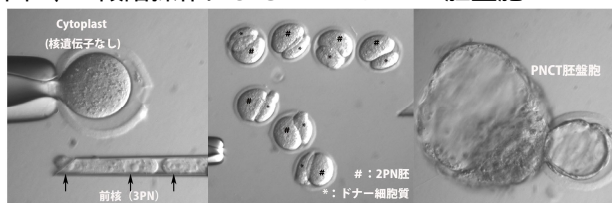
マウス前核期待料細胞質移植法 (pronuclear phase cytoplasmic transfer : PNCT) の確立

そこで、受精確認の際に廃棄される異常受精胚(1 か 3 前核: 1PN or 3PN) 細胞質に着目した。媒精後 6 時間で詳細な前核の観察によって正常受精胚(2PN) と異常受精胚(1 か 3 前核: 1PN or 3PN) を診断し、異常受精胚細胞質をドナーとした移植法の確立を行なった。なお、同一個体から得られた正常受精胚と異常受精胚細胞質間での PNCT を aPNCT (autologous PNCT) とし、異なる個体間における PNCT を hPNCT (heterologous PNCT) とした。

まず、顕微操作 10 回、使用前核期胚 156 個を使用し、まず内径の異なるピペットで直接ドナー細胞質の単離と移植を試みたが、細胞質の破綻が約 6 割に生じた。そこで、卵子を交雑種の BDF1 へ変更し、まず内径 15 μ m のピペットによる異常受精胚からの極体と前核の除去と正常受

精胚からの極体の除去 (HVJ-E による極体の再融合を予防するため) を行い、次に内径 30 μm のピペットによる大量の細胞質移植をおこなうという 2 段階操作をおこなったところ、再構築胚は胚盤胞へ発育した (図 1)。

図 1、2 段階操作による PNCT と PNCT 胚盤胞



(左)は小径ピペットによる極体と3前核の除核を示す。(中央)は大径ピペットによる 2PN 胚周囲卵腔への大量の Cytoplasm の移植直後を示す。HVJ-E によって細胞質は融合し、一つの巨大な 2PN 胚となる。(右) PNCT 孵化期胚盤胞

新鮮受精卵 (胚) における PNCT の効果

2 段階法を用いて新鮮胚 (通常 IVF 胚) における aPNCT を検討した。対照群は aPCNT 群同様に CB 暴露を行った。2 周期、対照群 64 個と PNCT 群 93 個における検討にて、胚盤胞率 (胚盤胞 / 2 細胞) はそれぞれ 76.2% と 94.6% ($p=0.032$) と PNCT 胚で優位に高かった。(表 1)

表 1、新鮮受精卵における aPNCT

	Replication #	# of 2PN used	2-cell (%)	Blastocyst (%)
Control	8	58	42 (72.4)	32 (76.2)
Fresh aPNCT	8	93	74 (79.6)	70 (94.6)*

* 統計学的に優位差あり ($p<0.05$)

PNCT 胚の着床後発生、産仔の妊孕性、ATP 産生

胚盤胞到達 aPNCT 胚を同期した ICR マウス子宮へ移植し、2 匹の健全な産仔 (1 匹、1 匹) を獲得した。3 週後に母獣より隔離し、自然交配にて F2 産仔の出産を確認した (図 2)。

胚盤胞到達 aPNCT 胚の ATP 測定は、対照群と PNCT 胚においてそれぞれ 1.20 ± 0.073 と $1.36 \pm 0.07 \text{ pmol/embryo}$ であり、統計学的な優位差は認めないものの高い傾向をみとめた (図 3)。

図 2, PNCT 産仔

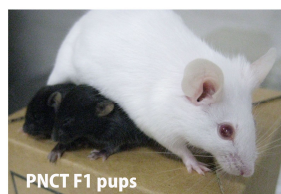
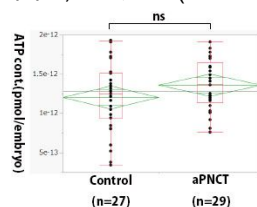


図 3, ATP 定量 (fresh aPNCT)



加齢卵子モデルにおける PNCT

排卵後卵管内加齢卵子モデルを用いて検討した。加齢卵子正常受精胚 (2PN) の胚盤胞率は 48.5% と新鮮胚 (通常 IVF 胚) の 76.2% と比較して優位 ($P=0.0285$) に低かった。

次に卵管内加齢卵子 IVF で、同一個体からの異常受精胚細胞質をドナーとする aPNCT を 10 周期 167 個の加齢卵 2PN 胚に対して行った。卵管内加齢卵異常受精胚はほとんどが 1PN 胚であったため、ドナー胚として 1PN 胚を使用した。加齢卵同士での aPNCT による 2 細胞率は 79.6% (133/167) で胚盤胞到達率は 43.6% (58/133) であった ($p>0.05$)。次に新鮮胚 (通常 IVF 胚) の異常受精胚 (1PN 胚使用) 細胞質を用いた hPNCT を行った。9 周期 129 個の加齢卵 2PN 胚に対して、新鮮胚 (通常 IVF 胚) の異常受精胚細胞質 (1PN) をドナーとした hPNCT を施行した。1 細胞率と胚盤胞率は、それぞれ 87.6% (113/129)、40.7% (46/113) といずれも改善効果を認めなかった ($p>0.05$)。結果のまとめを表 2 に示す。

表 2、加齢卵モデルにおける PNCT

	Rep #	Recipient	Donor	# of 2PN used	2-cell (%)	Blastocyst (%)
Aged 2PN	9	Aged 2PN	NA	183	169 (97.7)	82 (48.5)*
aPNCT	10	Aged 2PN	Aged 1PN	167	74 (79.6)	58 (43.6)*
hPNCT	9	Aged 2PN	Fresh 1PN	129	113 (87.6)	46 (40.7)*

* 全て統計学的に有意差なし ns ($p>0.05$)

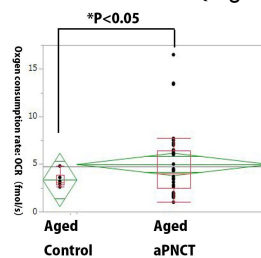
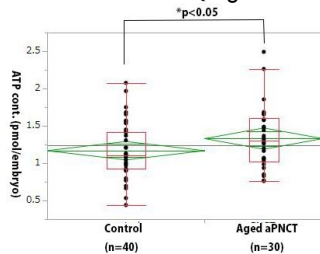
加齢卵モデルにおける aPNCT による胚呼吸量と ATP 含量

加齢卵 aPNCT 胚盤胞において ATP 含量と胚呼吸量を検証した。ATP 含量は加齢卵胚盤胞と加齢卵 aPNCT 胚盤胞における胚当たりの ATP 含量はそれぞれ 1.17 ± 0.061 と $1.33 \pm 0.072 \text{ pmol/embryo}$ であり、加齢卵 aPNCT 胚盤胞において優位に高い結果であった ($p=0.0461$) (図 4)。胚呼吸量は加齢卵子胚盤胞と加齢卵 aPNCT 胚盤胞においてそれぞれ $3.33 \pm 0.79 \text{ fmoI/s}$

と 4.96 ± 3.62 fmol/s であり、加齢卵 aPNCT 胚において優位に高かった (図 5、 $p=0.0258$)、

図 4、ATP 定量 (aged aPNCT)

図 5、胚呼吸量 (aged aPNCT)



異常受精胚の発生能

加齢卵正常受精胚に対する細胞質移植が奏功しなかったため、異常受精胚そのものの発生能を検討した。この際の 2PN 胚は CB への暴露を行っていない。新鮮卵と卵管内加齢卵における 3PN と 1PN の割合はそれぞれ 6.4% (新鮮 3PN) と 23.5% (新鮮 1PN) と 3.9% (加齢 3PN) と 46.0% (加齢 1PN) であり、加齢卵は新鮮卵に比較して異常受精が多く (49.9%)、かつ 1PN が多かった。胚盤胞率は、新鮮胚では 1PN 胚 (6.7%) が 2PN 胚 (70.0%) と比較して優位に低く ($p<0.0001$)、3PN 胚は 66.6% と 2PN と遜色がなかった (表 3)。次に、加齢卵の検証では胚盤胞率は若干 3PN 胚の方が高いものの、1PN 胚も 3PN 胚も正常受精胚 (2PN) と比較して優位に低かった (表 3)。

表 3、正常受精胚 (2PN) と異常受精胚 (1PN/3PN) の発生能の比較

	Rep #	# of embryos	2-cell (%)	Blastocyst (%)
Fresh 2PN	11	313	306 (97.8%)	208 (70.0%) ^a
Fresh 1PN	10	183	163 (89.1%)	11 (6.7%) ^a
Fresh 3PN	6	23	21 (91.3%)	14 (66.6%)
Aged 2PN	9	183	169 (97.7%)	82 (48.5%) ^{b,c}
Aged 1PN	10	476	374 (78.6%)	12 (3.2%) ^b
Aged 3PN	5	50	37 (74.0%)	4 (10.8%) ^c

a, b, c : 統計学的に優位差あり ($p<0.05$)

考察とまとめ

今回、細胞質機能改善を目的として新規の細胞質移植法である前核期大量細胞質移植法 (ProNuclear stage Cytoplasmic Transfer: PNCT) を開発した。当初使用した MST 法はマウスにおいては低い IVF での受精率と発生率から効率的に研究を進めることができなく、当教室での PIEZO 顕微授精の準備が整っていないことから PNCT に絞った開発と研究をおこなった。

臨床において異常受精胚は一定の割合で存在し、特に 3 前核胚は通常多倍体であり臨床上移植されることはない。対して 1 前核胚は体外受精においては前核の融合や一方の早期消失、もしくは遅延などの可能性があり臨床での生児の獲得の報告はあるものの第一選択とはならない。これらの異常受精胚も胚盤胞への発生や胚性幹細胞の樹立が報告されており、核の倍数性の異常と細胞質機能とは必ずしも相関せず、これら異常受精胚の細胞質にも胚発生をサポートするに十分な機能 (もしかするとミトコンドリア) を有していると考えられる。

また、MRT 技術の臨床 IVF への応用には 2 つのハードルが存在する。一つは若い健常者から卵子/胚の提供を要するという倫理的な問題である。二つ目には 2 種のミトコンドリア遺伝子が混同するヘテロプラスミーである。PNCT は廃棄される異常受精胚を用いることから、より倫理的である。更に、自己の細胞質を利用する aPNCT はヘテロプラスミーを回避できる。しかしながら、hPNCT においては他の MRT 同様ヘテロプラスミーは回避できない。

新鮮卵における PNCT は受精卵の胚発育を優位に改善することが明らかとなり、PNCT 胚は産仔へと発育し、次世代の妊孕性も確認された。よって PNCT は、加齢による細胞質機能低下を改善への応用が期待された。しかしながら、卵管内加齢卵による検討では、異常受精胚細胞質をドナーとした aPNCT でも、新鮮卵異常受精胚をドナーとした hPNCT においても胚発育を改善しなかった。原因として、卵管内加齢卵の異常受精胚はそのほとんどが 1PN であり、1PN 胚が 3PN 胚に比較して胚盤胞率が低いことに起因していると考えられた。卵管内加齢卵の 1PN 胚は単位発生が原因であり、後の胚発育サポートに必要な細胞質の活性化を欠く。一方 3PN は多精子受精に起因すると考えられ、Sperm factor による十分な細胞質の活性化が得られる。この差が胚盤胞率の差と考えられ、PNCT のドナーとしては 3PN 胚が適していると考えられた。

一方、興味深いことに胚盤胞到達胚においては胚呼吸量や ATP 含量が優位に高く、胚盤胞の細胞質機能（ミトコンドリア機能）の面では改善効果が得られている可能性が考えられた。今後はドナーを 3PN 胚に限定した hPNCT により結論を導き出し論文発表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. **Tachibana M**, Kuno T, Yaegashi N. Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos. *Reprod Med Biol. Reprod Med Biol.* 査読有、2018 Sep 19;17(4):421-433、doi: 10.1002/rmb2.12230. eCollection 2018
2. **立花眞仁**、成熟卵紡錘体置換 (MST) 法を用いた配偶子系列遺伝子治療確立へ向けて、日本産科婦人科学会雑誌、第 69 巻、第 11 号、ACTA OBST GYNEC JPN Vol. 69, No. 11, pp. 2241-2251, 2017, DOI なし、査読なし
3. **立花眞仁** 『核移植 (ミトコンドリア移植) と研究倫理』 『メディカルエシックス』 54 2017/6 月刊行 pp41-61 医学系大学倫理委員会連絡会議、DOI なし、査読なし
4. **Naomi Shiga**, **Masahito Tachibana** and Nobuo Yaegashi, Challenges Towards Establishing Germline Gene Therapy for Inherited Mitochondrial Diseases, *Journal of Mammalian Ova Research*, 査読有、巻: 32 (2) 2016: 89-99, DOI: <http://dx.doi.org/10.1274/jmor.33.89>

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 発生工学研究から派生する生殖補助医療研究と新規治療開発の可能性、学会等名: 第 19 回日本生殖工学会、発表年月日: 2019 年 2 月 16 日 (招待講演)
2. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 核移植が切り開く近未来の ART、学会等名: 第 9 回日本・がん生殖医療学会、発表年月日: 2019 年 2 月 10 日、共催セミナー講師
3. 発表者: 藤峯絢子、**立花眞仁**、久野貴司、東恵子、高橋藍子、田中恵子、井ヶ田小緒里、横山絵美、志賀尚美、渡邊善、八重樫伸生、発表表題: 前核期細胞質移植による細胞質機能改善の試み、学会名: 第 56 回東北生殖医学会学術講演会、発表年月日: 2018 年 10 月 20 日
4. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 発生工学がつなく生殖医療と再生医療、学会等名: 第 63 回日本生殖医学会学術講演会、発表年月日: 2018 年 9 月 7 日 (予定であったが、震災で中止となり後日 web 形式となった)、シンポジウム 5 再生医療と生殖医療の接点
5. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: ミトコンドリア遺伝病伝搬防止への取り組み～配偶子系列遺伝子治療の幕開け～、学会等名: 第 59 回日本卵子学会学術集会、発表年月日: 2018 年 5 月 27 日、シンポジウム「ミトコンドリア研究の最前線」
6. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 配偶子系列遺伝子治療の展望～胚で診断、胚で治す時代は近い?、学会等名: 生殖医療技術者のためのリカレントセミナー: 仙台セミナー、発表年月日: 2018 年 3 月 4 日、セミナー講師 (招待講演)
7. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: ミトコンドリアと PGD/PGS、学会等名: 第一回ブラウンテクノロジーセミナー ART 新技術をめぐる展望と課題 PGD/PGS の海外最新知見を考える、発表年月日: 2017 年 12 月 2 日、セミナー講師 (招待講演)
8. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 生殖医療とミトコンドリア、学会等名: 第 31 回平成不妊研究会、発表年月日: 2017 年 11 月 30 日、研究会講師 (招待講演)
9. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: ミトコンドリア遺伝病に対する核移植を用いた遺伝子治療の試み、学会等名: 第 9 回新生児科指導医教育セミナー、発表年月日: 2017 年 8 月 19 日、セミナー講師 (招待講演)
10. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 成熟卵紡錘体置換 (MST) 法を用いた配偶子系列遺伝子治療確立へ向けて、学会等名: 第 69 回日本産科婦人科学会学術集会、発表年月日: 2017 年 4 月 15 日、シンポジウム
11. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 生殖医療を取り巻く状況 ・母系遺伝ミトコンドリア病の核移植、学会等名: 第 2 回ミトコンドリア病研究患者公開フォーラム、発表年月日: 2017 年 2 月 25 日
12. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: 核移植 (ミトコンドリア移植) と研究倫理、学会等名: 第 54 回医学系倫理審査委員会連絡会議、発表年月日: 2016 年 12 月 2 日
13. 発表者名: **立花眞仁**、発表表題: Weeding out inherited mitochondrial disease-配

偶子系列遺伝子治療の幕開け-、学会等名：第19回 IVF 学会、発表年月日：2016年10月2日

14. 発表者名：立花真仁、発表表題：Lunch time ceminer ; Applications of laser objectives in novel assisted reproductive technologies、学会等名：第34回受精・着床学会、発表年月日：2016年9月15日

15. 発表者名：立花真仁、発表表題：紡錘体置換法による配偶子系列遺伝子治療とミトコンドリア遺伝子の継承、学会等名：第47回精子研究会、発表年月日：2016年6月4日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学リプロダクションホームページ、研究紹介

http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/patient/rep_research.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：志賀 尚美

ローマ字氏名：(SHIGA, Naomi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：20595558

研究分担者氏名：渡邊 善

ローマ字氏名：(WATANABE, Zen)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助手

研究者番号(8桁)：40722567

研究分担者氏名：井原 基公

ローマ字氏名：(IHARA, Motomasa)

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁)：50403506

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。