

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791678

研究課題名(和文) マウス受精卵の第二極体における半数体ゲノムの安定性と発生運命

研究課題名(英文) Study on chromosomal stability and developmental potential of mouse second polar bodies

研究代表者

日野 敏昭 (HINO, Toshiaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10550676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PB2ゲノムの正常性を調査し、PB2の融合が混倍数性の原因となりうるか調査した。受精後放出されたPB2の多くは受精後72時間までDNA合成を完了せずS期の途中で留まっていたものの、アポトーシスを起こさずに生存していた。PB2を2細胞期の1割球に融合し混倍数性受精卵の作出を試みたところ、融合したPB2は割球の細胞周期に同調して核分裂を行い、3倍体細胞を含む混倍数性受精卵の形成に関与した。3倍体細胞は胚盤胞期で内部細胞塊や栄養膜に分化し、一部は胎盤組織に分化したことから、PB2融合が混倍数性の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The fusion of a second polar body (PB2) with one of the blastomeres during the cleavage stage has been considered as a causal mechanism underlying diploid-triploid mixoploidy in humans. In this study, we examined the genomic stability of mouse PB2s and whether the PB2s can participate in the generation of mixoploid embryos. Majority of the PB2s remained in the S phase of the cell cycle until 70 h after being emitted without undergoing apoptosis. When the PB2 was fused with one of the 2-cell blastomeres, the chromosomes of the PB2 were incorporated in the mitotic spindle of the blastomere, resulting in the formation of the 2n/3n mixoploid embryo. The 3n blastomeres had the ability to differentiate into the inner cell mass and the trophectoderm of blastocysts, and constituted the placenta tissue of the embryo at 11 days after fertilization. The findings suggest that the fusion of the PB2 with a blastomere is one of the causative factors of the formation of the mixoploid embryos.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学 第二極体 着床前診断 混倍数性

1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳動物の卵子は受精後に自身の染色体の半分を第二極体 (PB2) として細胞外に放出する。放出された PB2 は受精卵の発生に影響を与えることなく退化すると考えられているが、そのゲノムの正常性についてはこれまでほとんど検討されていない。一方、ヒトにおいて、受精後に放出された PB2 が 2 細胞期以降の割球の 1 つに融合することにより、2 倍体と 3 倍体の細胞を持った混倍数性の子供が生まれてくる可能性が報告されている。しかしながら、PB2 に由来する染色体が割球と融合した後どのような挙動を示すのか、また、発生過程でどのように遺伝子機能が活性化して組織や器官の形成に関わるのか不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、混倍数性の生成機序を解明するための基礎的データを提供することを目的として、まず、マウス PB2 における半数体ゲノムの安定性を調査する。続いて、混倍数性受精卵の作出と発生能を調査し、PB2 の融合が混倍数性の原因となりうるかについて検討する。

3. 研究の方法

体外受精法もしくは細胞質内精子注入法により作製した受精卵を用いて以下の実験を行った。

PB2 における半数体ゲノムの正常性

[実験 1] PB2 における DNA 合成の有無を調べるために、5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) を含む mCZB 培地で受精後 6 時間から 28 時間の受精卵を 30 分間培養し、BrdU の取り込みを免疫染色にて検出した。

[実験 2] PB2 におけるアポトーシスの有無を調べるために、受精後 24、48、および 72 時間の受精卵を用いて、アポトーシスの誘導に伴い発現するカスパーゼの免疫染色を行った。また、FITC 標識ヌクレオチドを用いた TUNEL 法により DNA 切断を検出した。

[実験 3] PB2 における染色体異常の有無を調べるために、受精後 4 - 6、24、48、および 72 時間の PB2 を不活化センダイウイルス (SV) を用いて未受精卵に融合し、早期染色体凝縮法により染色体を可視化して染色体分析を行った。

PB2 融合による混倍数性受精卵の作出とその発生能

[実験 4] PB2 と割球の融合方法を検討するために、SV 法と電気融合 (EF) 法により、PB2 と 2 細胞期の割球の 1 つの融合操作を行った。1 時間後、PB2 と割球が確認された卵を mCZB 培地で培養し、胚盤胞期まで発生率を調べた。

[実験 5] 割球に融合した PB2 ゲノムの挙動を調べるために、分裂中期に達した融合卵の染色体を DAPI、紡錘体を FITC 標識抗体で染

色した。また、分裂後の融合卵の核を DAPI で染色して核の形態を観察した。更に、分裂後の融合卵の染色体分析も行った。

[実験 6] 3 倍体細胞の可視化のために、全身性に GFP を発現する GFP マウス由来の PB2 を、野生型マウス由来の 2 細胞期受精卵 (受精後 18 - 20 時間) の割球の 1 つに融合した。その融合卵を mCZB 培地にて培養し、2 細胞期 (受精後 28 時間)、4 細胞期 (受精後 48 時間)、桑実期 (受精後 72 時間)、胚盤胞期 (受精後 96 時間) に達した時点で 3 倍体細胞の局在を観察した。

[実験 7] 3 倍体細胞のその後の分化を調べるために、実験 6 と同様 GFP マウス由来の PB2 を用いて作製した胚盤胞期融合卵の内部細胞塊を抗 OCT4 抗体、栄養膜を抗 CDX2 抗体で免疫染色し、それぞれの GFP 蛍光の観察を行った。また、胚盤胞期融合卵を偽妊娠雌マウスに移植して、得られた胎齢 11 日の胚仔と胎盤の凍結切片を作製し、3 倍体細胞の局在を調べた。

4. 研究成果

PB2 における半数体ゲノムの正常性

[実験 1] 受精卵における BrdU の取り込みは受精からおよそ 4 時間後に始まり、12 時間後に確認されなくなった。一方、PB2 の BrdU の取り込みは受精卵より 2 時間遅く始まり (受精後 6 時間)、20 時間後には確認されなくなった。

[実験 2] 受精後 24、48、および 72 時間の PB2 におけるカスパーゼ陽性率はそれぞれ 2.9%、6.1%、および 7.5% と低い値を示し、TUNEL 陽性率は全ての時間において 0% を示した。

[実験 3] 受精後 4 - 6 時間では、PB2 の 99.2% が G1 期の染色体像 (図 1-a) を示した。分析の結果、構造的染色体異常と異数性の出現頻度はそれぞれ 1.7% と 1.3% と低値であった。一方、受精後 24、48、および 72 時間の PB2 の染色体像の多くは、著しく凝縮したひとつの塊として観察される S 期の像 (図 1-b) を示したため、染色体解析を行うことができなかった。

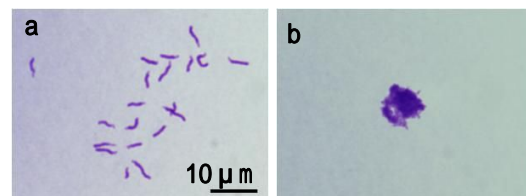


図 1 早期染色体凝縮の誘導により観察された G1 期染色体 (a) と S 期クロマチン塊 (b) の像

以上の結果から、多くの PB2 は受精後 72 時間までアポトーシスを起こさずに S 期の途中に留まっていることが明らかになった。

PB2 融合による混倍数性受精卵の作出とその

発生能

〔実験 4〕 2 細胞期における PB2 と割球の融合率は、SV 法で 93.8% (45/48)、EF 法で 90.4% (47/52) であった。胚盤胞期までの発生率は SV 法で 91.1% (41/45)、EF 法で 87.2% (41/47) であり、両方法の成績に有意な差は認められなかった。一方、時間当たりの融合卵作出効率は SV 法が EF 法よりはるかに高く、操作性の点で SV 法が優れていることが確認された。

〔実験 5〕 S V 法で割球と融合させた PB2 を 19 個観察したところ、PB2 の核は、分裂中期には染色体を形成して割球と同一の紡錘体に取り込まれ、赤道面に並ぶことが明らかになった(図 2)。また、分裂によって形成された融合割球の核の 80%以上が正常形態を示し、その他の融合割球は、大小さまざまな複数の微小核が割球内に混在する異常形態を示した。融合卵の染色体分析では、3 倍体の割球を持った融合卵が観察された(図 3)

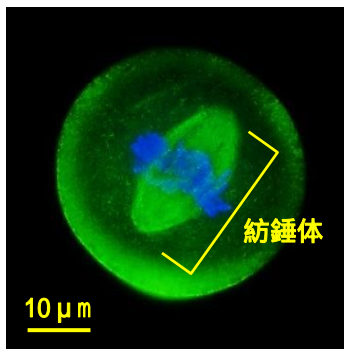


図 2 PB2 を融合した後、分裂中期紡錘体を形成した 2 細胞期の割球

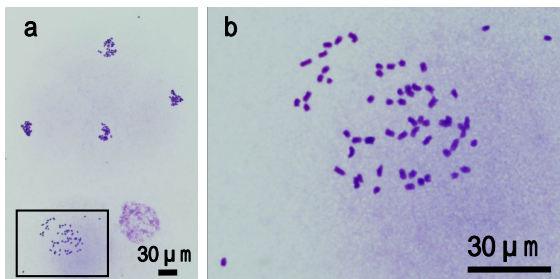


図 3 融合卵の染色体像

(a) 上部 4 つの割球は、PB2 の融合を行わなかった割球に由来し、下部 2 つの割球は、PB2 を融合させた割球に由来する。上部 4 つの割球はすでに 4 回目の分裂中期に達していた。下部 2 つの割球のうち、1 つが分裂中期に達しており 60 本の染色体(3 倍体)が観察された。(b) 四角で囲った領域の拡大図を示す。

〔実験 6〕 GFP マウス由来の PB2 を用いて作製した融合卵において、4 細胞期までは GFP 蛍光は認められなかったが(図 4 a、b)、桑実期と胚盤胞期ではそれぞれ 46%(18/39)と 50%(18/36)に GFP 蛍光が観察された(図 4 c、d)。

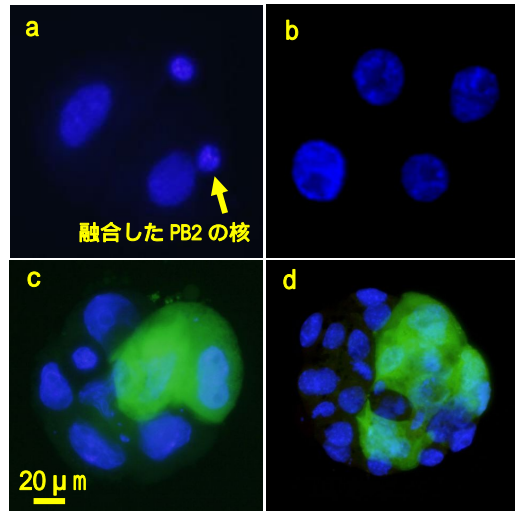


図 4 GFP 由来 PB2 を用いて作出した融合卵

(a) 2 細胞期。(b) 4 細胞期。(c) 桑実期。(d) 胚盤胞期。

〔実験 7〕 GFP 陽性であった 19 個の胚盤胞期のうち、2 個(10.5%)は内部細胞塊に(図 5-a、b、c、d)、15 個(78.9%)は栄養膜に(図 5-e、f、g、h)、残り 2 個(10.5%)は両方に蛍光が認められた。移植した 112 個の胚盤胞からは 12 個体の胚子が得られた。3 倍体細胞は胚子のいずれにも認められなかったが、1 例の胎盤においてのみ GFP 陽性細胞が観察された(図 6)。

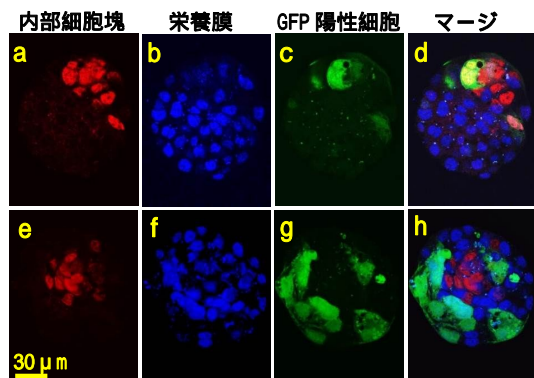


図 5 GFP 由来 PB2 を用いて作出した胚盤胞期融合卵の、内部細胞塊(a、e)と栄養膜(b、f)の分染像

上 4 つの写真は、GFP 蛍光(c)が内部細胞塊に分布していた融合卵、下 4 つの写真は、GFP 蛍光(g)が栄養膜に分布していた融合卵を示す。(d)と(h)はそれぞれ(a)、(b)、(c)および(e)、(f)、(g)を重ね合わせた図を示す。

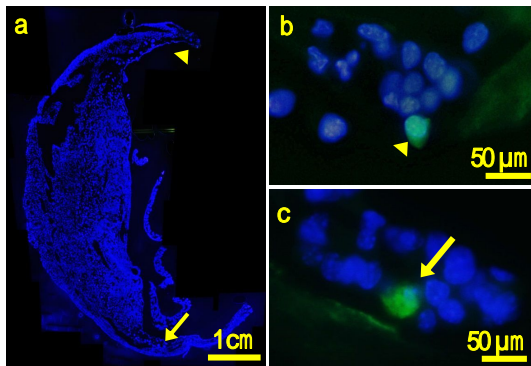


図 6 GFP 陽性細胞の確認された 11 日齢の胎盤の凍結切片像

(a) 胎盤の全体像。(b) 図(a)の矢頭が指す領域の拡大図を示す。(c) 図(a)の矢印が指す領域の拡大図を示す。3 倍体細胞の存在を示す緑色蛍光がそれぞれ確認された。核は DAPI で染色した。

以上の検討結果から、2 細胞期における PB2 と割球の融合には操作性の点で SV 法が適していること、融合した PB2 は割球の細胞周期に同調して核分裂して 3 倍体細胞を形成することが明らかになった。さらに、3 倍体細胞は胚盤胞期で内部細胞塊や栄養膜に分化し、一部は胎盤組織に分化したことから、PB2 融合が混倍数性の原因となる可能性が示唆された。

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 1 件)

Hino T., Kusakabe H., Tateno H., Chromosomal stability of second polar bodies in mouse embryos, J Assist Reprod Genet, 査読有り、30 巻、2013、91-98

〔学会発表〕(計 5 件)

日野 敏昭、日下部 博一、立野 裕幸、マウス第二極体ゲノムに由来する混倍数性受精卵のゲノム動態とその発生能、第 55 回 日本卵子学会、2014 年 5 月、兵庫県神戸市

日野 敏昭、日下部 博一、立野 裕幸、マウス第二極体に由来する混倍数性受精卵のゲノム動態、第 58 回 日本生殖医学会 学術講演会・総会、2013 年 11 月、兵庫県神戸市

日野 敏昭、日下部 博一、立野 裕幸、マウス受精卵の第二極体における半数体ゲノムの安定性の検討、第 28 回 動物生殖工学会、2012 年 12 月、東京都白金区

日野 敏昭、日下部 博一、立野 裕幸、How long does the second polar body of

the mouse-fertilized egg retain genetic stability ?、64th Annual Meeting of the American Society of Reproductive Medicine、San Diego、CA
日野 敏昭、日下部 博一、立野 裕幸、マウス受精卵における第二極体ゲノムの安定性の検討、財団法人染色体学会 第 63 回年会、2012 年 10 月、北海道旭川市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日野 敏昭 (HINO TOSHIAKI)

旭川医科大学・医学部生物学教室・助教

研究者番号：10550676

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし