

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08144

研究課題名(和文) 共焦点顕微鏡ライブイメージングによるウシ着床前期胚における染色体異常の理解

研究課題名(英文) Analysis of chromosome dynamics during embryo development

研究代表者

橋本 周 (Shu, Hashimoto)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：30570949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ受精卵の染色体の挙動を可視化したライブイメージングを行った。正常に受精したウシ受精卵の25%が第一有糸分裂で異常な細胞質分裂を起こした。14%の受精卵では父親由来と母親由来の染色体の融合が起こらず、それぞれの単為発生割球から構成される受精卵(両親性の単為発生卵)が生じることが明らかになった。ヒト受精卵においても同様に両親性の単為発生が生じていた。両親性の単為発生の原因として、核膜崩壊後各親由来の紡錘体がいったん別々に形成されることが原因の一つであり、両親性の単為発生卵では核膜崩壊時の雌雄両前核間の距離が広いことも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやウシを含めた哺乳類受精卵において、正常に受精したにも関わらず、父親由来と母親由来の染色体の融合が起こらず、それぞれの単為発生胚から構成される受精卵(両親性の単為発生卵)が生じる。これは雌雄両前核が乖離し、前核膜崩壊後のシンガミーを経ずに有糸分裂後期を開始することが原因である。その結果、受精卵は単為発生割球のみから構成され、正常な発生は望めない。雌雄両前核を卵細胞の中心に位置させ、両前核間の距離を短く保つために細胞骨格が重要な働きをする。分裂異常の機構を明らかにし、従来は正常な発生の望めない受精卵からの産子作成の道を開く。ヒトと同じ単胎動物であるウシの知見は生殖医療への応用にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Live imaging which enables us to observe chromosomal behavior in cells revealed that 14% of normally-fertilized ova underwent abnormal 1st mitosis without syngamy (bi-parental parthenogenesis) in cattle. Bi-parental parthenogenesis was observed in human. Separate dual spindle formation might cause bi-parental parthenogenesis probably due to longer distance between male and female pronuclei at the nuclear envelope breakdown.

研究分野：生殖工学

キーワード：異常分裂 初期胚発生 染色体異常 単為発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Steptoe と Edwards は、初めてヒトの体外受精 (IVF) で児を得た。現在、IVF 技術は不妊治療として普及している。ウシの IVF は Iritani ら (1977) が成功し、IVF による産子生産が報告され、家畜生産とその改良にも大きく貢献した。一方で、ヒト胚、ウシ胚は染色体異常を起こした細胞が多数含まれている。それゆえ、染色体異常細胞をいかに識別するか、そしてその出現を防ぐかが課題となっている。

可視光のみの顕微鏡をインキュベータに内蔵することが可能となり、着床前期胚の形態変化を記録できる (Hashimoto ら 2012)。我々はこの技術を利用して、ヒト胚の第一卵割から胚盤胞期に至る特徴的な形態変化を明らかにし、胚の分裂様式とそのタイミングから発育能力の高い胚を早期に選別できることを示した。同時期に、Sugimura ら (Plos One 2012) もウシ胚で同様のことを示した。その後、多数のグループから形態変化にもとづき胚の発育を予測できることが報告されている。しかし、可視光のみの顕微鏡では胚の、特に脂肪顆粒を多く含む家畜胚の細胞内の染色体の挙動、細胞内小器官を観察できない。また、形態良好な胚においても染色体異常細胞を含んでおり、IVF 技術による家畜生産効率の向上ならびに生殖医療技術の普及の妨げとなっている。

受精卵の染色体異常の発生時期として、配偶子形成と受精卵初期発生の二つに大別できる。配偶子形成に由来する染色体異常の主要なものとして卵母細胞の減数第一分裂における染色体分配エラーがあげられ、我々 (Sakakibara ら Nat Commun 2015) と英国のグループ (Zielinska ら 2015) は共焦点顕微鏡により卵母細胞における染色体分配エラーは弱まった染色体接着にあるという直接的証拠を示した。これは母体老化にともなう染色体接着因子コヒーシンの減少によるものと考えられる。一方で、初期胚における染色体異常の発生機構は細胞分裂の異常に起因すると考えられているが、その機構は十分に理解されていない。

## 2. 研究の目的

着床前期胚における染色体挙動を可視化し、染色体レベルでの異常現象を明らかにし、染色体異常を起こした胚細胞の特徴を検出する。

## 3. 研究の方法

共焦点顕微鏡ライブイメージングにより胚の染色体異常分裂の発生を検出する

Hashimoto らの方法 (Biol Reprod 2002) に従い、屠場由来ウシ卵巣より直径約 120  $\mu\text{m}$  の卵母細胞を回収し、IVF を行う。ヒストン H2B と赤色蛍光タンパク (mCherry) を融合したタンパクをコードした mRNA (H2B-mCherry)、End-binding protein 1 (EB1) と緑色蛍光タンパクを融合したタンパクをコードした mRNA (EB1-EGFP) をウシ胚に注入する。これらの RNA 注入受精卵の経時的な染色体 (H2B-mCherry) ならびに微小管 (EB1-EGFP) 画像を共焦点顕微鏡 (CV 1000, 横河電機) により 15 分間隔で取得する。紡錘体構造、分裂期の時間ならびに染色体挙動を追跡し、染色体レベルで受精卵の発育変化を評価する。

生きた細胞内小器官、特に染色体と微小管形成を可視化することにより、どのように染色体異常が起こるのか、染色体異常を起こした細胞がどうなるのかを知ることが出来る。様々な深度の 2 次元画像を組み合わせ、3 次元画像を構築する。

3 次元画像データより、1 から 16 細胞における核膜崩壊から分裂中期紡錘体形成にいたる時間と染色体の挙動、分裂中期から娘細胞の核形成にいたる時間と染色体挙動、分裂様式 (正常に 2 割球に分裂したか、あるいは 3 割球以上に異常な細胞質分裂を起こしたか) を計測する。これらの因子が受精卵の発育能力ならびに染色体異常にどのように影響するか解析する。

## 4. 研究成果

ウシ受精卵の染色体と微小管を可視化し、着床前期の発生における染色体挙動を共焦点顕微鏡により記録し、特に細胞分裂の過程で染色体がどのような振舞いをするのか調べた。

体外受精後、雌雄両前核を有する 75 個の正常受精卵のうち 73 個 (97.3%) が第一有糸分裂を起こした。そのうち 55 個では正常な染色体分裂が観察されたが (75%)、18 個で異常な染色体分裂が観察された (25%)。また、そのうち 10 個が syngamy を経ずに分裂し (14%)、それらの大半が 1 細胞から 4 細胞となった (図 1)。8 個が syngamy を経たのち、lagging anaphase 等を起こし多核割球を形成した (11%)。正常な分裂を経た受精卵のうち、13 個が胚盤胞期まで発育した (24%)。前核膜消失までの時間は胚盤胞形成群で受精処理から 27 時間、正常分割群で 28 時間、異常分割群で 31 時間であり、分裂終了はそれぞれ 29 時間、30 時間、そして 50 時間であった。syngamy を経たのち異常分裂を起こして形成された多核を生じた割球は早期に細胞分裂を停止した。さらに syngamy を経ずに分裂した受精卵では核膜消失時の雌雄両前核間の距離が有意に大きかった (図 2)。

ウシ受精卵においてもヒト受精卵と同じような様式で細胞質ならびに染色体の異常分裂が生じることが明らかとなり、ヒト受精卵の異常分裂発生機構を理解する上でウシ受精卵が利用可能であることが示された。

この syngamy を経ない異常分裂胚は 8 から 16 細胞期までは順調に細胞分裂を繰り返し、可視

光のみの顕微鏡観察では正常な胚と識別することは難しかった。  
 また、染色体を可視化する卵母細胞の培養条件を変えた場合でも、あるいは RNA を注入するタイミングを体外受精前に変更しても同様の現象が生じることが確認された。このことから、RNA 注入操作等が異常な細胞質分裂を引き起こす可能性は低いと考えられた。

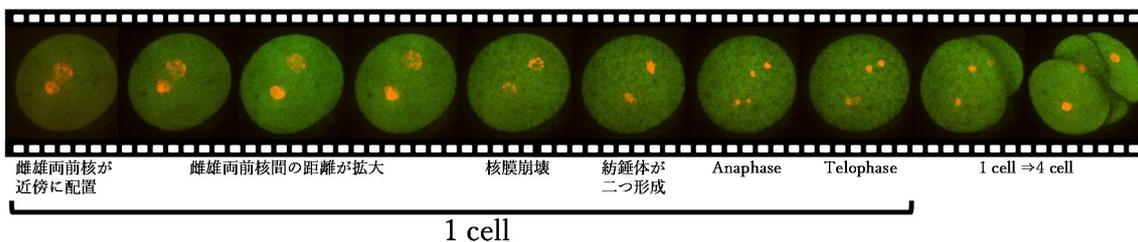


図 1. Syngamy を経ずに 1 細胞から 4 細胞となった異常分裂胚

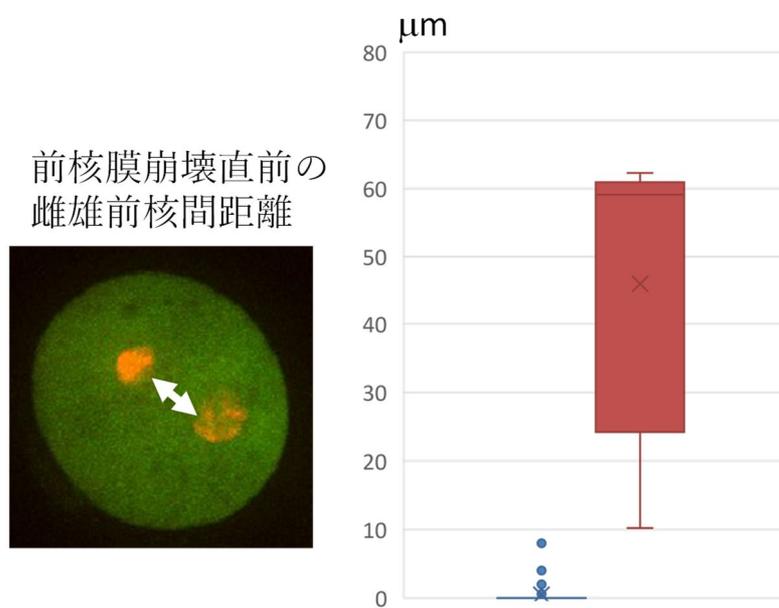


図 2. 前核膜消失時の雌雄両前核間の距離

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Shuhei Yoshida, Sui Nishiyama, Lisa Lister, Shu Hashimoto, Tappei Mishina, Aurélien Courtois, Hirohisa Kyogoku, Takaya Abe, Aki Shiraiishi, Meenakshi Choudhary, Yoshiharu Nakaoka, Mary Herbert, Tomoya S. Kitajima | 4. 巻<br>11            |
| 2. 論文標題<br>Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>2652    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41467-020-16488-y  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Shu Hashimoto, Masaya Yamanaka, Takayuki Yamochi, Hisataka Iwata, Ryouka Kawahara-Miki, Masayasu Inoue & Yoshiharu Morimoto  | 4. 巻<br>9             |
| 2. 論文標題<br>Mitochondrial function in immature bovine oocytes is improved by an increase of cellular cyclic AMP   | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>5167    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-019-41610-6  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Yamochi T, Hashimoto S, Yamanaka M, Nakaoka Y, Morimoto Y  | 4. 巻<br>63            |
| 2. 論文標題<br>Optimum culture duration for growing oocytes to attain meiotic and fertilization competence.  | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>J Reprod Dev   | 6. 最初と最後の頁<br>591-595 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1262/jrd.2017-110.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Kitano Y, Hashimoto S, Matsumoto H, Yamochi T, Yamanaka M, Nakaoka Y, Fukuda A, Inoue M, Ikeda T, Morimoto Y   | 4. 巻<br>29            |
| 2. 論文標題<br>Oral administration of l-carnitine improves the clinical outcome of fertility in patients with IVF treatment.   | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Gynecol Endocrinol   | 6. 最初と最後の頁<br>1-5     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/09513590.2018.1431769   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shu Hashimoto  |
| 2. 発表標題<br>L-carnitine restores mitochondrial function of human embryos decreased with female donor age |
| 3. 学会等名<br>European Society of Human Reproduction and Embryology (国際学会)                                 |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>橋本 周                                 |
| 2. 発表標題<br>1. cAMP値の上昇によるウシG2期卵母細胞のミトコンドリア機能の亢進 |
| 3. 学会等名<br>第 64 回日本生殖医学会学術講演会（招待講演）             |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>橋本 周                |
| 2. 発表標題<br>給餌条件がマウスの生殖能力に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会      |
| 4. 発表年<br>2019年                |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>橋本 周                       |
| 2. 発表標題<br>ウシ受精卵における第一有糸分裂における染色体分配異常 |
| 3. 学会等名<br>第112回日本繁殖生物学会              |
| 4. 発表年<br>2019年                       |

## 〔図書〕 計3件

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>橋本 周                       | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>医学書院                       | 5. 総ページ数<br>376 |
| 3. 書名<br>高齢不妊診療ハンドブック：卵子と胚のミトコンドリア機能 |                 |

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>橋本 周、中野 達也、中岡 義晴、森本 義晴 | 4. 発行年<br>2017年 |
| 2. 出版社<br>金原出版                   | 5. 総ページ数<br>120 |
| 3. 書名<br>産婦人科の実際：多核出現胚の染色体挙動の観察  |                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Morimoto Y, Hashimoto S, Yamochi T, Goto H, Amo A, Yamanaka M, Inoue M            | 4. 発行年<br>2017年 |
| 2. 出版社<br>Springer Nature   | 5. 総ページ数<br>366 |
| 3. 書名<br>Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes: 1.Mitochondria of the oocyte |                 |

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

大阪市立大学大学院医学研究科臨床医学専攻 リプロダクティブサイエンス研究所  
<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/reproduction/>

## 6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)  | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 北島 智也<br><br>(Kitajima Tomoya)<br><br>(00376641) | 国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究セン<br>ター・チームリーダー<br><br><br><br>(82401) |    |