

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09772

研究課題名(和文)がんサバイバーの生殖補助医療におけるMRTの応用を目指した研究

研究課題名(英文) Study of utilization of MRT technique in assisted reproduction on cancer survivor

研究代表者

立花 眞仁 (Tachibana, Masahito)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30431571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モデル動物のマウスにおいては、極体が凍結融解に脆弱であり、凍結に先行して紡錘体形成する必要性があり、極体をドナー卵子へ移植するhPB1Tと自己の細胞質へ移植するaPB1T+単離紡錘体凍結の2つの方法を比較検討した。aPB1Tは過去に報告がなく、hPB1Tと比較したところ、卵子の再構築率はhPB1Tと比較して優位に高率であったが、受精後の胚発育は差を認めなかった。凍結融解の効率は、hPB1T法と極体を除去したMII卵子の組み合わせにおいて、MII卵子単独の場合と比較して凍結融解後に41%ポイント受精に寄与する卵子の増加に寄与し、移植可能な胚盤胞を17.4%ポイント増加させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本法は凍結卵子数に限定されるがんサバイバーの生殖補助医療において、患者の核遺伝子を継承した受精可能な卵子数と移植可能な胚盤胞数の増加に寄与する可能性が示され、卵巢機能低下難治性不妊症例の低採卵数を打破する可能性が示唆された。

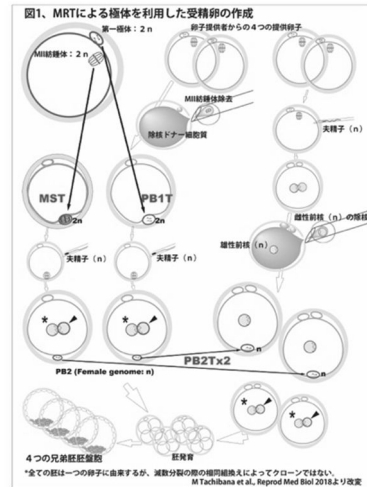
研究成果の概要(英文)：In the mouse model, 1st polar-body (PB) was prone to intolerance to freeze-thaw. Therefore, 1st PB must be transform to meiotic spindle prior to freezing, and we tested two protocols, i.e., the combination of PB removed MII and hPB1T or the combination of aPB1T and MST with isolated freeze-thaw MII spindle. Because aPB1T is novel procedure, we first compared both creation and development efficiencies to hPB1T. Although creation efficiency was superior in aPB1T, developmental competence was comparable to that of hPB1T oocyte. By comparison of both protocols in step-by-step in freeze-thaw procedure, the combination of PB removed MII and hPB1T was more optimal to achieving increased the number of oocytes to be fertilized and the number of blastocysts to be transferred. Compared with common oocyte freezing method, the combination of PB removed MII and hPB1T increased 41% oocyte availability for fertilization and 17.4% increased blastocyst for transfer.

研究分野：生殖生物学、がん生殖

キーワード：がん生殖 卵子凍結 核移植 細胞質移植

1. 研究開始当初の背景

長期生存が可能となったAYA世代のがんサバイバーにとって、妊孕性の問題は後のQOLを左右する重要な要素である。現在、未受精卵子凍結の期待値や生産性は凍結が行われた患者の年齢と数によって大きく異なる。ミトコンドリア遺伝病に対する配偶子系列遺伝子治療、すなわちミトコンドリア置換療法 (Mitochondrial replacement therapy: MRT) の一つであるPNT (Pronuclear transfer) 法は極体を雌性ゲノムとして用い、PB1/2T法は、通常は個体発生に寄与しない極体の雌性ゲノムが細胞質の供与を受けることによって個体に発生可能であることを示している。これは、一つの精母細胞が4つの成熟精子に到着するように、理論的には一つの卵子から4つのViableな胚を作成することが可能であることを意味する (Tachibana M et al., *Reprod Med Biol*) (図1)。また、卵子は巨大な細胞質を持つことから凍結が困難な細胞であり、ダメージを完全に排除することは困難である。つまり、がん生殖医療にとって鍵となる凍結技術は未だ不完全であり、細胞質にダメージを与え、生殖の機械は凍結された卵子数に限られる。



2. 研究の目的

これまでミトコンドリア遺伝病の配偶子系列遺伝子治療として開発されてきた種々のMRTを、凍結融解に起因する細胞質ダメージの回避と、移植可能な受精卵の増加によるがん生殖医療を前提とした凍結融解卵への応用、と低反応性卵巣に起因する卵子数の制限の打破、を目指す。

3. 研究の方法

マウス

東北大学動物実験専門委員会承認【2020医動-167-02 (2020MdA-167-02)】のもとC57/B6 (B6) およびB6D2F1 (BDF1) マウスを用いた。卵子は8~16週齢のマウスへの九道株式会社製CARD HyperOva®F.D. マウス過剰排卵誘起剤 (PMSG) 10IUの腹腔内投与と48時間後のhCG10IUの腹腔内投与の後、15~17時間で卵管内排卵を確認して採取。精子は8~16週齢のマウスの精巣上体尾部精子を回収した。卵子前培養、精子前培養、媒精から2細胞期までの培養はTYH培地を、2細胞期から胚盤胞期まではKSOM培地を、顕微操作にはM2培地を、インキュベーター外のその他の操作にはmHTFを使用した。胚移植用にはICRマウスを使用。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、膣を確認した日を1 day post-coitus (dpc)とした。移植は1.5dpcに2細胞期胚をICRマウスの子宮へ移植した。

PB1T (第一極体移植) 法、MST 法

顕微鏡は倒立顕微鏡【オリンパス (現エビデント) 社製IX73】、ナリシゲ社製油圧式マイクロマニピュレーター (MMO-4)、Hamilton Thorne社製レーザー穿孔システムXYClone、Hamilton Thorne社製紡錘体可視化システム (Oosight Meta Imaging system) を使用。顕微授精はPrimatech社製PMAS-CT150とMB-U、PNJ-T2空圧インジェクターを用いた。簡潔には、卵子卵丘細胞複合体 (COC) よりヒアルロニダーゼ処理で顆粒膜細胞を除去したマウスMII期卵は、5ug/ml濃度のサイトカラシンB (CB) 添加M2培地内、もしくはサイトカラシンD (CD) で操作をおこなった。PB1-Cytoplast、もしくはMII紡錘体-Cytoplast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。マニピュレーションディッシュはOosight使用可能な、ガラスボトムディッシュ、Wilco GWS t-5030、または、WPI FD5040を用いた。

MST (成熟卵紡錘体移植) 法

MST法の詳細は過去の文献にある (Tachibana M et al., *Nature* 2009)。簡潔には、卵子卵丘細胞複合体 (COC) よりヒアルロニダーゼ処理で顆粒膜細胞を除去したマウスMII期卵は、5ug/ml濃度のサイトカラシンB (CB) 添加M2培地内で操作をおこなった。Karyoplast-Cytoplast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。

卵子 (紡錘体) の凍結・融解

凍結は九道株式会社製CARD 1 M DMSO、DAP123凍結胚作成成用培地を使用し、KITAZATO社製のCryotopかCryotube (セラムチューブ) に凍結し、液体窒素で保存。融解は九道株式会社製のCARD 0.25M Sucrose凍結胚融解用培地を使用。

免疫染色

固定は1.6%パラホルムアルデヒド+100mM PIPES (pH7.0)+1mM MgCl₂+0.1% TritonX-100を用いて、室温で30分卵子を浸透。一次抗体はヒト抗セントロメア抗体 (ACA, Antibodies Incorporated, 15-234)、二次抗体はAlexa Fluor™ 546 Goat-anti-Human IgG (H+L) (Invitrogen)、もしくは抗-γ-チューブリン-FITC抗体 (マウスモノクローナル) (Sigma) を使用。核DNAはHoechst33342 (Sigma) で染色。共焦点レーザー顕微鏡はZeiss LSM780を使用し、画像解析ソフトはNIS-Elements Viewer ver5.21を使用。

STR解析

同一卵子由来の第一極体と紡錘体の由来を同定するため、リコンビネーションが生じにくい動原体近傍の STR マーカー (D1Mit411, Chr1, pos 12.62/D2Mit355, Chr2, pos 2.77/D3Mit149, Chr3, pos 1.96/D4Mit264, Chr4, pos 4.14/D5Mit1, Chr5, pos 8.00/D7Mit152, Chr7, pos 2.71/D10Mit213, Chr10, pos 9.75/D11Mit2, Chr11, pos 7.30/D13Mit16, Chr1, pos 12.62, Chr13, pos 7.26/D14Mit1, Chr14, pos 6.33/D15Mit13, Chr15, pos 1.84/D17Mit113, Chr17, pos 8.14/D18Mit19, Chr18, pos 3.02) を選択した。DNA 抽出から全ゲノム増幅は EN-REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen) で行った。DNA は実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターにて STR の受託解析を依頼。

ES 細胞

ES 細胞の樹立は Mulas らの報告に基づき、3.5~4 日の胚盤胞をフィーダー細胞 (MEF) 用いた 2i/LIF KnockOut™ DMEM に KSR (Knockout serum replacement) を添加した培養液を用いて樹立した (Mulas et al., Development 2019)。

統計

凍結融解における生存、免疫染色での正常紡錘体形成率、hPB1T と pPB1T の融合率、受精率、胚盤胞率の検討には 二乗検定、もしくは他群比較においては 二乗検定有意差をみとめたものを Holm の post-hoc 検定を用い、エクセルか EZR (EasyR) にて算出した。PB1T の再構築の効率については、各ステップを個々に評価し、最終的には凍結前の卵子の作成効率 (CEATING EFFICIENCY) と凍結融解後の生存率 (FREEZING EFFICIENCY)、ならびに発生率 (DEVELOPMENTAL EFFICIENCY) を加味した理論値としてパーセンテージで計算した。なお、PB1T における CEATING EFFICIENCY は、PB1T 操作完了 2 時間後に極体の融合が確認できた卵子を再構築成功卵とみなした。胚発生 (DEVELOPMENTAL EFFICIENCY) は ICSI 後生存卵子を分母として算出した。

4. 研究成果

マウス第一極体の凍結耐性と PB1T 法

まず、第一極体の凍結耐性を確認するため、極体の生存が確認できた MII 卵子を凍結融解した。それぞれ 116 個と 28 個の MII 卵子を Cryotube と Cryotop を用いて凍結融解し、卵子の生存と極体の生存を確認した。MII としての生存はそれぞれ、108 個 (93.1%) と 28 個 (100%) であったが、極体の生存は、それぞれ 16 個 (13.8%) と 3 個 (10.7%) であった。つまり、凍結方法の如何に関わらずマウス極体は凍結融解に対して非常に脆弱であり、卵子凍結融解を前提とした極体移植は、凍結前に行う必要があることがわかった。

図 3 に 2 つの PB1T 法の組み合わせを示す。一つはドナー卵子に PB1T を行う heterologous (h)PB1T を行った hPB1T 卵子と極体を除去した MII 卵子を凍結する方法である (図 3A)。もう一方は、紡錘体を除去して自己の細胞質に PB1T を行う autologous (a)PB1T を行った aPB1T 卵子と紡錘体を凍結しておき、使用時には紡錘体をドナー卵子に移植する MST 法を行い再構築する方法である (図 3B)。

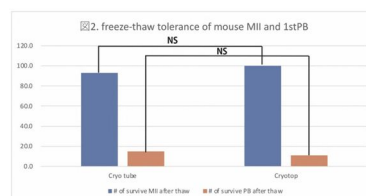
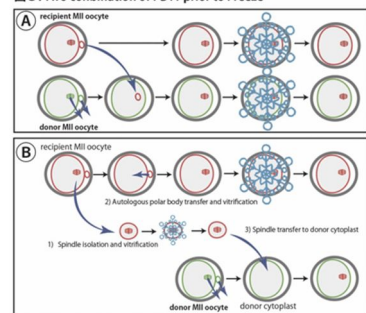


図 2. freeze-thaw tolerance of mouse MII and 1stPB

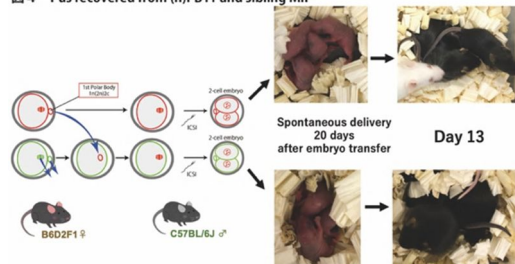
図 3. Two combination of PB1T prior to Freeze



第一極体移植による卵子再構築率と胚発生、産仔獲得

まず、凍結融解を行わない hPB1T を行って卵子再構築率、胚発生能、更に産仔獲得について確認を行った。MII 卵子 64 個に対して hPB1T を施行したところ、30 個に極体融合が確認され、再構築率は 46.9% (30/64) であった。うち 30 個に顕微授精を行ったところ、28 個が生存し、24 個が 2 細胞に发育し、受精率は 85.7% (24/28) であった。最終的に 15 個が胚盤胞に发育し、胚盤胞発生率は 53.6% (15/28) であった。hPB1T に供した卵子あたりでは 15/64 (23.4%) の胚盤胞発生率であった (表 1)。

図 4 Pus recovered from (h)PB1T and sibling MII



次に極体を除去した MII 卵子由来 2 細胞期胚と

hPB1T 卵子由来の 2 細胞期胚を、それぞれ 19 個と 11 個を代理母 ICR 偽妊娠マウスへ移植し、それぞれ 4 匹と 3 匹の産仔を獲得できることを確認した (図 4)。

hPB1T は過去に報告があるが、自己の極体を用いた aPB1T についての報告はない。そこで、自己の極体を移植した場合の再構築率、顕微授精による胚発生能、産仔獲得について検討した。88 個の MII 卵子に対して aPB1T を施行したところ、60 個に極体融合が確認され、再構築率は 68.2% であり、融合率は hPB1T と比較して有意に高率であった (P<0.05)。60 個に顕微授精を行い、59 個が生存。54 個が 2 細胞期胚に发育し、受精率は 91.5% (54/59) であり、最終的に 27 個が胚盤胞へと发育し、胚盤胞発生率は 45.8% (27/59) となった。aPB1T に供した卵子あたりでは 27/88 (30.7%) の胚盤胞発生率であり、受精と胚发育には hPB1T 胚と有意差がなかった (表 1)。

表 1 Efficiency and developmental rate of hPB1T and aPB1T

	# of replication	# of oocytes used	# of fused (%)	# of ICSI survived (%)	# of 2-cell (%)	# of Blastocyst (%)	total efficiency (%)
hPB1T	4	64	30 (46.9)	28 (93.3)	24 (85.7)	15 (53.6)	15/64 (23.4)
aPB1T	5	88	60 (68.2)	59 (98.3)	54 (91.5)	27 (45.8)	27/88 (30.7)
P value	NA	NA	0.0083	1	0.4057	0.4959	0.3241

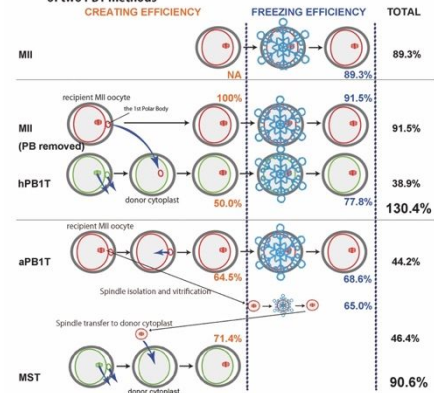
凍結融解 PB1T 効率の比較

hPB1T と aPB1T+MST における各ステップにおける効率を比較検討した (図 5)。

hPB1T においては、PB 除去 MII 卵子と hPB1T 卵子のペアが作出される。PB 除去 MII 卵子 59 個 (CREATING EFFICIENCY = 100%) の凍結融解を行ったところ、54 個の MII 卵子が回復可能 (FREEZING EFFICIENCY = 91.5%) であり、CREATING EFFICIENCY × FREEZING EFFICIENCY (1.0 × 0.915) は 91.5% であった。ペアとなる hPB1T 卵子は 80 個の MII 卵子に対して hPB1T を施行したところ、極体融合が確認された凍結可能な再構築卵は 40 個であり CREATING EFFICIENCY は 50% であった。次に hPB1T 卵子 36 個に対して凍結融解を行ったところ、28 個の hPB1T 卵子が回復可能 (FREEZING EFFICIENCY = 77.8%) であり、CREATING EFFICIENCY × FREEZING EFFICIENCY (0.5 × 0.778 = 0.389) で 38.9% であった。よって、PB 除去 MII 卵子と hPB1T 卵子のペアの合計の CREATING EFFICIENCY × FREEZING EFFICIENCY (91.5 + 38.9%) は 130.4% であった。

次に、aPB1T+MST のペアについて検討した。141 個の卵子に対して紡錘体除去と aPB1T を施行したところ、凍結可能な紡錘体確認された再構築卵は 91 個であり CREATING EFFICIENCY は 64.5% であった。70 個の aPB1T 卵子に対して凍結融解を行ったところ、48 個の hPB1T 卵子が回復可能 (FREEZING EFFICIENCY = 68.6%) であり、CREATING EFFICIENCY × FREEZING EFFICIENCY (0.645 × 0.686 = 0.442) で 44.2% であった。MST に関しては紡錘体の凍結融解と MST による再構築のステップが含まれる。40 個の紡錘体を凍結融解したところ、26 個の紡錘体を回復可能であり FREEZING EFFICIENCY は 65% であった。77 個の除核した卵子に、凍結融解紡錘体を MST したところ、55 個で再構築が確認でき CREATING EFFICIENCY は 71.4% であった。よって、MST の FREEZING EFFICIENCY × CREATING EFFICIENCY (0.65 × 0.714 = 46.4) は 46.4% であった。よって、aPB1T 卵子と MST 卵子の凍結融解ペアの合計の CREATING EFFICIENCY × FREEZING EFFICIENCY (44.2% + 46.4%) は 90.6% であった。なお、対照の未操作 MII 卵子の FREEZING EFFICIENCY (117/131 = 0.893) は 89.3% であった。

図 5. Comparison of creating efficiency and freeze-thaw tolerance of two PBT methods



凍結融解 PB1T 卵子由来胚の発育能の比較

次にそれぞれの凍結融解胚の胚発育を DEVELOPMENTAL EFFICIENCY として検証した。凍結融解 MII 卵子、凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子、凍結融解 aPB1T 卵子と凍結融解紡錘体による MST 卵子に対して ICSI を行った、受精率と胚盤胞発生率を表 2 に示す。凍結融解 MII 卵子、凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子、凍結融解 aPB1T 卵子と凍結融解紡錘体による MST 卵子の受精率はそれぞれ、90.3% (56/62)、93.5% (43/46)、87.5% (21/24)、61.4% (43/70)、78.5% (51/65) であった。凍結融解 MII 卵子、凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子、凍結融解 aPB1T 卵子と凍結融解紡錘体による MST 卵子の胚盤胞発生率はそれぞれ、75.8% (47/62)、71.7% (33/46)、50.0% (12/24)、14.3% (10/70)、61.5% (40/65) であった。

よって、最終的に凍結に供した卵子から期待される最終的な胚盤胞獲得が期待されるとして割合は CREATING EFFICIENCY × FREEZING EFFICIENCY × DEVELOPMENTAL EFFICIENCY であり、凍結融解 MII 卵子、凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子、凍結融解 aPB1T 卵子と凍結融解紡錘体による MST 卵子はそれぞれ、67.7%、65.6%、19.5%、6.3%、28.5% であり、凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子において合計 85.1% で最も高率であった。

表 2 DEVELOPMENTAL EFFICIENCY of various thawed oocytes

definition	Type of oocytes	n	2-cell (%)	Blastocyst (%)
control	Freeze-thaw Intact MII	62	56 (90) ^a	47 (76) ^a
MI I+hPB1T	Freeze-thaw MI I (PB removed)	46	43 (94) ^a	33 (72) ^a
	Freeze-thaw hPB1T	24	21 (88)	12 (50) ^a
aPB1T+MST	Freeze-thaw aPB1T	70	43 (61) ^b	10 (14) ^b
	Freeze-thaw MST	65	51 (79)	40 (62) ^a

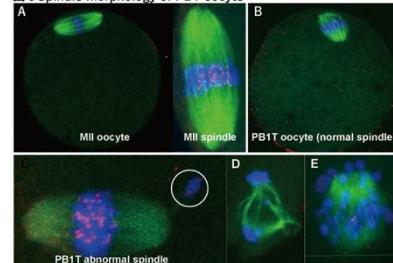
同じ列内の異なる小文字アルファベットは、相互に有意差 (p < 0.05) があることを示す。

PB1T 由来紡錘体の形態評価

除核 MII 卵子へ導入された極体は強制的に M 期に入る。そこで、MI I 卵子の第 2 減数分裂紡錘体と極体由来の紡錘体の形態学的比較検討を行った。MI I 期卵子の紡錘体は検討を行った 21 個全てが、中央に染色体が整列し、セントロメアが中央に並んだ正常形態を示した (図 6A&B)。紡錘体の正常形態率は極体由来の紡錘体 (図 6B、21/27: 77.8%) と比較して有意に多かった (P < 0.05)。

これに対し、PB1T 由来の紡錘体は検討を行った 27 個中 6 個 (22.2%) が異常形態を示し、染色体の一部が紡錘系から離れ、紡錘体外にあるもの (図 6C、circle 内)、早期分離を伴う形態異常 (図 6D)、紡錘系の形成異常を伴う染色体の未整列 (図 6E)、など様々な形態異常を示した。

図 6 Spindle morphology of PBT oocyte



ペアの MII 卵子と hPB1T 卵子からの ES 細胞樹立
 対となる MII 卵子と hPB1T 卵子由来の胚盤胞からの
 ES 細胞の樹立を試みた。19 個のペアに対して ICSI を
 行ったところ、MII 卵子と hPB1T 卵子はそれぞれ、13
 個 (68.4%) と 18 個 (94.7%) が生存し、うち 9 個
 (69.2%) と 8 個 (61.5%) が胚盤胞へと発生した。こ
 のうち、ペアで胚盤胞に発育したものが、3 ペアであ
 った。MII 卵子と hPB1T 卵子由来の胚盤胞 9 個と 8 個
 をフィーダー細胞に播種し、ES 細胞の樹立を試みたところ、それぞれ 3 個 (33.3%) と 4 個
 (50%) に ES のコロニー形成を認めた (図 7 bar=10um)。しかしながら、ペアでの樹立には至
 らなかった。

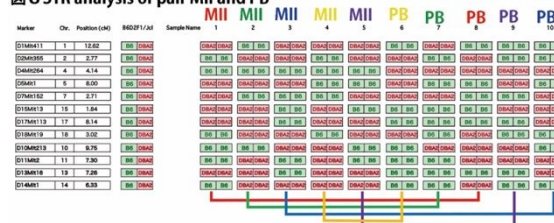
図 7 ES cells derived from MII and hPB1T oocytes



兄弟胚の証明

極体と MII 紡錘体は第一減数分裂前期の相
 同組み換えを経て 1n2C(2n) の遺伝子セット
 を分かち合う。そこで、一つの卵子に由来
 していることを確認するには相同組み換え
 を起こしにくいセントロメア近郊の STR マ
 ーカーセットを用いることにより、同定可
 能であるかの検証を行った。既知の 5 組の
 卵子と極体のペアを WGA にて増幅し、プ
 ラインドで 1 2 の STR マーカーにて解析を
 行ったところ、全てにおいて照合した既知の
 ペアと合致していることが確認された (図 8)。

図 8 STR analysis of pair MII and PB



モデル動物としてマウスを使用したが、まず凍結融解を前提としなければならないがん生殖
 医療における応用についてマウスにおいては極体の凍結耐性の問題があきらかとなり、その打
 破が課題であることが明らかとなった。元来紡錘体の状態で凍結した場合には、その正常性は
 問題ないことが未受精卵凍結、紡錘体移植 (Tachibana et al., Nature 2013) から明らかとな
 っているため、2 つの組み合わせ (極体除去 MII 卵子と hPB1T 卵子を凍結する方法と、aPB1T
 と紡錘体を凍結しておき、使用時に凍結融解紡錘体による MST 卵子を作成する方法) による極
 体ゲノムのレスキューの可能性を検証した。まず hPB1T と aPB1T の作成効率を検証した。2 つ
 の手技において、PB1T の効率は、それぞれ 46.9% と 68.2% であり、aPB1T が hPB1T と比較して有
 意に再構築率が高いことが明らかとなった。しかしながら、その後の胚発生率は同等であり、
 治療に供した卵子から最終的に胚盤胞を得る率は、それぞれ 23.4% と 30.7% であり、有意差を認
 めなかった。この結果、凍結融解を要さない、通常の生殖補助医療における卵子数の増加を期
 待した場合には hPB1T を用いるわけなので、MII 卵子 2.1 個あたり 1 個受精に寄与する卵子を
 増加させることが可能であり、MII 卵子 4.3 個あたり 1 個移植可能な胚盤胞が増加すると考え
 られた。また、hPB1T 由来の産仔も既報 (Wakayama T et al., BOR 1998, Wang T et al., Cell
 2014) と同様に獲得できることが確認された。

次に、凍結融解を経た場合の各治療ステップにおける効率を検証した。凍結融解極体除去 MII
 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子の組み合わせにおいては、受精に寄与できる卵子の作成効率は 91.5
 + 38.9% であり、130.4% であった。つまり、凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子を
 行うことによって、受精に寄与できる卵子を 41% ポイント増加させることが明らかとなった。

また、融解後の MII 卵子、凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子、凍結融解 aPB1T
 卵子と凍結融解紡錘体による MST 卵子の受精率の検討では、凍結融解 aPB1T 卵子、凍結融解紡
 錘体による MST 卵子において低率であった。この原因としては、一部サイトカラシン D を含む
 培地での操作を行ったものが含まれており、サイトカラシン D を用いると極体の破損の減少と
 融合率の上昇には寄与するが、胚発生を阻害することが示唆された。これは、既報の大量細胞
 質移植法 (ProNuclear-stage cytoplasmic transfer; PNCT) の検討でも同様の知見がえられてお
 り (Fujimine-Sato A et al., JMS2021)、サイトカラシン D の細胞毒性が原因と考えられた。
 凍結融解極体除去 MII 卵子と凍結融解 hPB1T 卵子の胚盤胞発生率はそれぞれ、71.7% (33/46) と
 50.0% (12/24) であり、凍結卵子あたり 17.4% ポイント移植可能な胚盤胞が増加する。

今回、紡錘体の形態評価も行った。MII 卵子においては、すべて正常形態と正常な極性を保っ
 ており、染色体数 20 に合致する 40 個のセントロメア抗体シグナルを確認できた。しかしなが
 ら、PB1T 由来紡錘体においては、正常形態率は有意に低く、正常形態でも極性の乱れがあり、
 卵細胞膜からの軸が平行ではないものを認めた。また、一部は染色体の異常分離につながる形
 態異常をみとめた。これは、サルやヒトにおいて MII 紡錘体を移植する MST においては認めら
 れなく (Tachibana et al., Nature 2009&2013)、紡錘体の極性をもつ、げっ歯類特有のもの
 である可能性も示唆される。一方、紡錘体周囲には紡錘体形成やその後の受精に始まる核の初
 期化、胚性遺伝子活性化において必須の mRNA や蛋白を有している可能性も示唆され、今後検討
 の原因解明が望まれる。

今回のリミテーションとして、一つの卵子に由来するペアでの ES 細胞樹立や産仔獲得について
 は、残念ながら研究期間内に得ることは出来なかったが、ES 細胞の樹立と ES 細胞により 1 つ
 の卵子を起源とする証明法は前述の通り予備実験が完了している。現在は ES 細胞の継代による
 解析に足る細胞数の確保は引き続き行っている。よって、論文投稿時には、そのペアでの ES 細胞
 樹立の可否と相同性、相違性について一定の見解が得られるものと期待される。また、当初
 予定していた卵巣組織凍結 融解移植による回復卵子を用いた検討には至らなかった。この点
 は次の課題として検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 平賀 裕章, 立花 眞仁	4. 巻 29
2. 論文標題 臨床応用へ向けた最先端研究 核移植技術のがん・生殖医療への応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 特集：受精と胚発生をめぐる話題	6. 最初と最後の頁 43-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34449/J0015.29.02_0004-0008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤峯 絢子, 立花 眞仁	4. 巻 35
2. 論文標題 遺伝カウンセリング・出生前診断 ミトコンドリア病と配偶子系列遺伝子治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 遺伝子医学MOOK 【ミトコンドリアと病気】	6. 最初と最後の頁 177-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 立花眞仁
2. 発表標題 ミトコンドリア置換法 - 原理と技術、前臨床試験
3. 学会等名 第20回ミトコンドリア学会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 MASAHITO TCHIBANA
2. 発表標題 Mitochondria in Health and Aging, Mitochondrial replacement by nuclear or spindle transfer
3. 学会等名 ASPIRE2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 立花 眞仁
2. 発表標題 細胞質置換/移植による卵細胞室機能低下克服への挑戦
3. 学会等名 第38回日本受精着床学会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 平賀 裕章, 立花 眞仁, 菅原 淳史, 八重樫 伸生
2. 発表標題 マウスにおいて紡錘体を除去したMII期卵に第一極体を自家移植する方法の検討
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 平賀裕章、菅原淳史、高橋藍子、佐藤壮樹、高橋友梨、虎谷惇平、横山絵美、志賀尚美、渡邊善、八重樫伸生、立花眞仁
2. 発表標題 卵子凍結における卵子ゲノムの保存の挑戦 -第一極体自家移植による極体ゲノムの凍結融解ダメージ回避の試み
3. 学会等名 第59回東北生殖医学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 立花眞仁
2. 発表標題 核移植が切り開く近未来のART
3. 学会等名 第320回青森県臨床産婦人科医会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Masahito Tachibana	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 716
3. 書名 Clinical Bioenergetics 1st Edition (chapter 16)	

1. 著者名 菅原淳史、立花眞仁	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 526
3. 書名 妊孕性温存の全て	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	志賀 尚美 (Shiga Naomi) (20595558)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	渡邊 善 (Watanabe Zen) (40722567)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------