

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09820

研究課題名(和文) ヒト未成熟卵から単為発生胚にいたる動的解析と個体加齢および染色体分配異常の関連性

研究課題名(英文) Dynamic Analysis of the Transition from Human Immature Oocytes to Parthenogenetic Embryos and the Association with Individual Aging and Chromosomal Distribution Abnormalities

研究代表者

白澤 弘光 (Shirasawa, Hiromitsu)

秋田大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60598019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト未成熟卵に対する体外成熟培養後に得られた成熟卵においては、その後単為発生刺激プロセスにおいて前核が発現してから消失するまでの持続時間に着床前胚発育と関連した特徴が認められることが初めて明らかになった。一般的な不妊治療における顕微授精後の前核の発現および消失のタイミングと異なっており、体外成熟培養過程における第1極体発現のタイミングや、第1極体発現から単為発生刺激までに要した時間との関連も示唆された。ヒト配偶子・胚において、体外成熟培養、単為発生における着床前胚発育まで連続して動的挙動を解析した報告はこれまでなく、ヒト胚における加齢性変化を検討する際に有益な成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト個体加齢による卵子老化において、染色体分配異常の増加は不妊治療における成績低下の大きな理由である。一方で妊孕性温存における卵子凍結は近年需要が増す中、個体加齢に加えたin vitro agingの影響に関しては検討が不十分であった。

第1極体放出という核成熟と、細胞質成熟の時間的乖離が、単為発生後の前核の挙動にどう影響するかを検討し、胚発育との関連を評価した初めての研究であり、今後の卵子老化研究の一助となる。

研究成果の概要(英文)：For the first time, it has been clarified that in mature oocytes obtained after in vitro maturation culture of human immature oocytes, there are features associated with pre-implantation embryonic development in the duration from the appearance to the disappearance of the pronucleus in the subsequent parthenogenetic stimulation process. This is different from the timing of the appearance and disappearance of the pronucleus after ICSI in general infertility treatment, and it also suggested a connection with the timing of the first polar body expression during the in vitro maturation process, and the time required from the first polar body expression to parthenogenetic stimulation.

There have been no reports to date that continuously analyze the dynamic behavior from in vitro maturation to pre-implantation embryonic development in parthenogenesis in human gametes and embryos. The results obtained are beneficial for examining age-related changes in human embryos.

研究分野：生殖医学

キーワード：体外成熟培養 単為発生 ヒト配偶子 着床前胚発育 タイムラプスモニタリング 動的挙動 第1極体

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒト卵子、ヒト胚を用いた研究は、研究マテリアル確保のハードルから、国内外において、その実施が限られている。その中で、ヒト未成熟卵子に対する体外成熟培養 (in vitro maturation, IVM) は多嚢胞性卵巣症候群に対する臨床的使用のほかは、その意義が未だ確立しておらず、また、タイムラプスモニタリングを用いた動的挙動解析についても国内外で報告が極めて限られているのが現状である。しかし、卵巣組織凍結において、卵子凍結も併用する combined procedure は近年報告が増加しており、ovarian tissue oocyte in vitro maturation (OTO-IVM)として実施され、IVMの有用性は増している。しかし、不妊症における実地臨床で多用されているタイムラプスモニタリングは、ヒト未成熟卵子を用いたIVMや、妊孕性温存時のOTO-IVMの際には使用報告が乏しく、IVM過程における動的挙動解析報告は極めて限られていた。

ヒト卵子、ヒト胚において、ヒト個体の加齢性変化は卵子凍結として不妊治療成績の低下に直結する大きな課題である。しかし、研究目的にヒト胚を作成するハードルは高く、国内外においてヒト胚を用いた動的挙動解析は、不妊症臨床における非侵襲的な解析に限られている。研究マテリアルを通して、第1減数分裂、第2減数分裂における染色体分配異常など、卵成熟過程のエラーについて検討は行われ、コヒーシタンパクの発現などとの関連が報告されている。このようなヒト個体加齢性変化は重要であるが、同時に排卵後加齢や、IVMおよび培養過程におけるin vitro agingも着床前胚発生、異数性発生に関連を用いる要因であると考えられるが、ヒト配偶子・胚において、IVMから着床前胚発育における一連の動的挙動解析はこれまで施行されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究課題ではヒト配偶子としてヒト卵子を用いて、未成熟卵子から成熟胚に至る過程における第1極体放出のタイミングおよび、ヒト胚のモデルとして単為発生胚を用いて前核発現から消失までの持続時間をduration of pronucleus presence (DPP)として、それぞれの動的挙動の関連および、着床前発育との関連を検討し、胚発育に影響を与える因子を抽出することを目的とした。これらの知見は不妊治療の臨床におけるIVM由来配偶子の質評価につながるほか、妊孕性温存時のOTO-IVMなどの際における培養室業務管理(laboratory management)にも新たな知見を与え得ると考えた。

3. 研究の方法

研究マテリアルとしては、8例の子宮体癌手術症例における非刺激下摘出卵巣から回収した63個の未成熟卵子を用いた。63個の卵子から変性した5個の卵子を除外し、計58個の卵子に対してIVMを実施した。IVMにより第1極体を放出した卵子は成熟卵子として、その割合をmaturation rateとして検討した。IVM過程はタイムラプスモニタリングを用いて観察し、IVM開始から第1極体放出のタイミングを記録し、24時間以内に放出した早期群(early群)と、24時間以降の後期群(late群)に分けて検討した。

成熟卵子に対してはカルシウムイオノファおよび6-DMAPを用いて単為発生刺激を行った。単為発生刺激後は120時間タイムラプスモニタリング下に培養を継続し、前核発現から消失までの持続時間をDPPとして記録し、着床前胚発育との関連を検討した。着床前胚発育については、2細胞以上、8細胞以上、morula以上に分類して検討を行った。

単為発生由来胚については、培養後に蛍光免疫染色を行い、微小管、染色体、Oct-4、Cdx2をそれぞれ染色し発現を確認した。

IVM後の単為発生胚と比較するため、不妊治療臨床においてICSIを実施し、その後の胚発育をタイムラプスで観察した65名のデータを用いた。

4. 研究成果

IVMによるmaturation rateは55.2%(32/58)であり、32個の成熟卵子の内17個(53.1%)は24時間以内、15個(46.9%)は24時間以降に第1極体を放出した。

32個の成熟卵子に対して単為発生刺激が行われ、15個は2細胞以上への卵割を認めたが前核が確認できなかった。5個の卵子は卵割を認めなかった。2細胞以上へ卵割を認めた単為発生由来胚のDPPは 14.7 ± 7.4 時間であった。着床前胚発育が7細胞以下であった単為発生由来胚のDPPは 13.6 ± 5.9 時間、8細胞以上の胚は 17.3 ± 5.9 時間であった。卵割を認めなかった

5つの胚のDPPは 20.7 ± 7.6 時間であった。IVMにおけるearly群は 14.4 ± 6.5 時間、late群は 15.1 ± 8.2 時間で有意差を認めなかった。

単為発生刺激により8細胞以上に卵割を認めた4つの胚において、early群は0%、late群は40%(4/10)であり、有意にlate群で高い結果であった($p < 0.025$)。

ICSIによって2細胞以上に卵割を認めた胚において、DPPは 19.6 ± 5.9 時間であり、単為発生由来胚と比較して有意に延長を認めた($p < 0.018$)。着床前胚発育が7細胞以下であった胚はDPPが 23.6 ± 7.6 時間であり、単為発生胚の7細胞以下より有意に延長を認めていた($p < 0.001$)。また、ICSIにより8細胞以上に発育した胚のDPPは7細胞以下より有意に短縮していた($p < 0.001$)。

胚発育は、DPPが短すぎるか長すぎると負の影響を受けることが明らかになった。単為発生活性化においてDPPが短い場合、胚の発育は進まないことから、DPPは第一極体の放出のタイミングと同様に、単為発生活性化の結果を決定する重要な要素であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shirasawa Hiromitsu, Kumazawa Yukiyo, Sato Wataru, Takahashi Kazumasa, Togashi Kazue, Terada Yukihiro	4. 巻 116
2. 論文標題 A STUDY ON THE NECESSITY OF TIME LAPSE MONITORING FOR IN VITRO MATURATION IN COMBINED PROCEDURE AT THE TIMING OF OVARIAN TISSUE CRYOPRESERVATION	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fertility and Sterility	6. 最初と最後の頁 e162 ~ e162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fertnstert.2021.07.438	査読の有無 有
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 Takahashi Harunori, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Hirakawa Takeo, Hasegawa Hisataka, Shitara Akihiro, Iwasawa Takuya, Togashi Kazue, Makino Kenichi, Shirasawa Hiromitsu, Miura Hiroshi, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Consistency between chromosomal status analysis of biopsied human blastocyst trophectoderm cells and whole blastocyst cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 444 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12400	査読の有無 有
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 Shitara Akihiro, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Takahashi Harunori, Iwasawa Takuya, Onodera Yohei, Makino Kenichi, Miura Hiroshi, Shirasawa Hiromitsu, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246438 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246438	査読の有無 有
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 Fujishima Akiko, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Hirakawa Takeo, Iwasawa Takuya, Togashi Kazue, Maeda Eri, Shirasawa Hiromitsu, Miura Hiroshi, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Live visualisation of electrolytes during mouse embryonic development using electrolyte indicators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246337 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246337	査読の有無 有
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 白澤 弘光、熊澤 由紀代、寺田 幸弘	4. 巻 75
2. 論文標題 合併増大号 今月の臨床 生殖医療の基礎知識アップデート-患者説明に役立つ最新エビデンス・最新データ 一般不妊治療 特定の不妊原因に関する検査・治療 子宮内膜ポリープに対する治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1409210231	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 Shirasawa Hiromitsu, Kumazawa Yukiyo, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Sato Wataru, Ono Natsuki, Togashi Kazue, Makino Kenichi, Waga Masato, Sato Naoki, Terada Yukihiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Kinetics of meiotic maturation in oocytes from unstimulated ovaries and duration of pronucleus presence and preimplantation development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 F&S Science	6. 最初と最後の頁 124 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xfss.2020.09.004	査読の有無 有
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 Fujishima Akiko, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Hirakawa Takeo, Iwasawa Takuya, Togashi Kazue, Maeda Eri, Shirasawa Hiromitsu, Miura Hiroshi, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Live visualisation of electrolytes during mouse embryonic development using electrolyte indicators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246337	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Shitara Akihiro, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Takahashi Harunori, Iwasawa Takuya, Onodera Yohei, Makino Kenichi, Miura Hiroshi, Shirasawa Hiromitsu, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246438	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiromitsu Shirasawa , Yukiyo Kumazawa , Wataru Sato , Kazumasa Takahashi, Ph , D , Kazue Togashi , Yukihiro Terada
2. 発表標題 A STUDY ON THE NECESSITY OF TIME LAPSE MONITORING FOR IN VITRO MATURATION IN COMBINED PROCEDURE AT THE TIMING OF OVARIAN TISSUE CRYOPRESERVATION
3. 学会等名 ASRM 2021 Scientific congress & expo
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白澤弘光 熊澤由紀代 佐藤亘 富樫嘉津恵 尾野夏紀 藤島綾香 寺田幸弘
2. 発表標題 施設ホームページから得た医学的・社会的卵子凍結の実施有無 および凍結コストに関する比較検討
3. 学会等名 第12回日本がん・生殖医療学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白澤弘光
2. 発表標題 本邦におけるAYA世代を中心とした、がん生殖医療の実際とこれから
3. 学会等名 第61回日本卵子学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白澤弘光
2. 発表標題 体外成熟培養から着床前胚発育過程におけるタイムラプスイメージング評価の意義
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiromitsu Shirasawa, Yukiyo Kumazawa, Wataru Sato, Yukihiro Terada
2. 発表標題 Novel approach for collecting human immature oocytes for reproductive research by vaginal ovaries transportation 1 hour after major vessel clipping in laparoscopic surgery
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiromitsu Shirasawa, Yukiyo Kumazawa, Wataru Sato, Kazumasa Shirasawa, Yukihiro Terada
2. 発表標題 The timing of the release of the first polar body predicts the cleavage rate after parthenogenetic activation for human oocytes obtained by in vitro maturation
3. 学会等名 American Society for Reproductive Medicine (ASRM) 2019 Scientific Congress and Expo (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	熊澤 由紀代 (Kumazawa Yukiyo) (70400504)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	
研究分担者	佐藤 亘 (Sato Wataru) (10726441)	秋田大学・医学部附属病院・助教 (11401)	
研究分担者	高橋 和政 (Takahashi Kazumasa) (60791910)	秋田大学・医学部附属病院・技術系スタッフ (11401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	安西 実武貴 (Mibuki Anzai) (70770444)	秋田大学・医学部附属病院・技術系スタッフ (11401)	

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