

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890013

研究課題名（和文） 精子の受精前遺伝学的診断法への実験的アプローチ

研究課題名（英文） Experimental approach to sperm chromosome screening

研究代表者

渡部 浩之 (WATANABE HIROYUKI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90608621

研究成果の概要（和文）：予め遺伝学的構成を調べた精子から産仔を作出するために、雄性発生卵を利用して精子核DNAを複製・分割させた。二つの割球をそれぞれ未受精卵に融合させ、片方を遺伝学的診断に、残りを受精卵作出に供試した。これにより、産仔の産み分けが可能となり、精子の遺伝学的診断法を確立できた。またCalyculin Aにより、割球の遺伝学的診断が簡便化され、精子の受精前遺伝学的診断法の利便性を向上させた。

研究成果の概要（英文）：To produce offspring from pre-analyzed sperm, sperm DNA was replicated using androgenic embryos. Sister blastomeres from androgenic 2-cell embryos were individually fused to MII oocytes to analyze sperm chromosomes and to produce offspring with known male chromosome constitutions. Also, Calyculin A facilitated the procedure in chromosome analysis of blastomere. These results demonstrated that sperm chromosome screening was successfully established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：生殖工学・生殖補助技術・遺伝学的診断・染色体

## 1. 研究開始当初の背景

生殖補助技術を伴う不妊治療では、受精卵の染色体異常が頻発し、低い妊娠率の原因となっている。この問題を解決するには、胚移植前の分割卵の割球を単離し、遺伝学的診断を施す着床前診断が有効である。しかし、着床前診断は受精卵を操作するという点で侵襲的な方法であるだけでなく、一旦異常と判断された胚は移植されることなく廃棄され

るため、不妊患者へ強い精神的・金銭的負担は大きい。

そこで代替法として考えられるのが配偶子の受精前遺伝学的診断である。しかし、雄性配偶子である精子は完全に分化した半数体の細胞であるため、遺伝学的診断に供試した精子は媒精には利用できない。故に現在のところ、受精前の精子の遺伝学的診断を行うことは不可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、精子側に起因するほぼ全ての異常を迅速かつ精確にスクリーニングする手法としての『精子の受精前遺伝学的診断法』を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞融合を利用した早期染色体凝縮(PCC)による精子の受精前遺伝学的診断法の確立

精子核 DNA を人為的に複製させるために、除核した卵子に精子を顕微注入することで半数体の雄性発生卵を作出し、2細胞期まで発生させた。割球を単離後、不活化センダイウイルスを用いてそれぞれ未受精卵に融合させ、PCC を利用した遺伝学的診断(染色体分析)と賦活化による受精卵の作製に供試した。作出した受精卵は胚盤胞期までの発生を観察し、受容メスに移植した。

### (2) 受精前遺伝学的診断法の改良

上述の精子の受精前遺伝学的診断法の一連の操作では、計3個の未受精卵が必要となり臨床応用に適しているとは言い難い。全ての工程を1個の卵子で行うために、以下に記す実験を行い、改良法を検討した。

#### ① Calyculin A (Caly A)による薬剤誘導 PCCによる染色体分析の検討

顕微授精による通常の受精卵、賦活化による単為発生卵、除核卵に顕微授精した雄性発生卵から作出された2細胞期胚を10-20 nM Caly A で2時間処理することでPCCを誘導した。その後標本作製し、PCC誘導率を算出した。

#### ② 配偶子の受精前遺伝学的診断法の確立

未受精卵を、核を含む有核細胞片と核を含まない無核細胞片に二等分した。有核細胞片は賦活化により、無核細胞片は顕微授精により、それぞれ単為発生卵・雄性発生卵を作出し、2細胞期胚まで発生させた。それぞれの割球を単離後、単為発生卵と雄性発生卵の割球を融合させ、二倍体の受精卵を作出した。作出した受精卵は胚盤胞期までの発生を観察し、受容メスに移植した。また、残された割球はCaly AでPCCを誘導し、染色体分析に供試した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞融合を利用した精子の受精前遺伝学的診断法の概略を図1に示した。

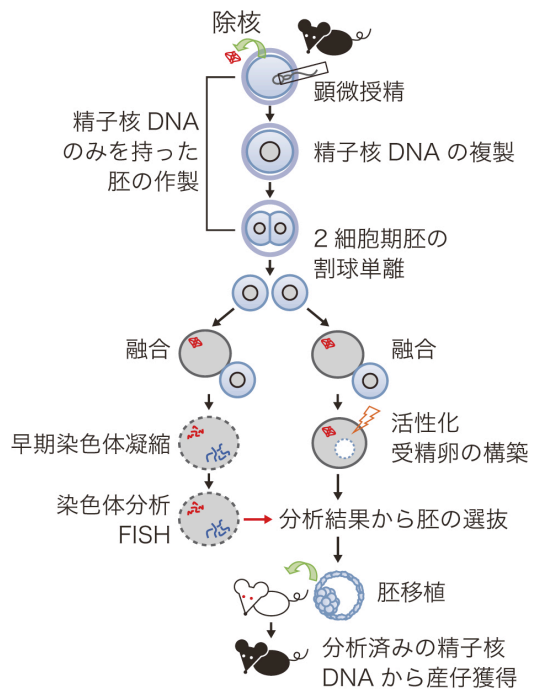


図1. 細胞融合を利用した PCC による精子の受精前遺伝学的診断法の概略

まず除核卵に顕微授精することで作出した雄性発生卵の遺伝的構成について検討した。雄性発生卵(2細胞期)の割球を単離し、未受精卵に融合させたところ、98.8%が正常に融合した。融合後、2時間培養しPCCを誘導後、染色体分析に供試した。2細胞期・雄性発生卵の割球間の染色体構成は、90.4%(正常:81.7%、異常:8.7%)で一致していた。一方、9.6%は割球間の染色体構成が一致しなかったが、これは顕微授精時に発生した不安定型染色体異常によるものと推察された。これらの結果から、細胞融合によるPCCは割球の染色体分析に有効であり、2細胞期・雄性発生卵の割球が、精子の受精前遺伝学的診断法に利用可能であることが示された。

次に、2細胞期・雄性発生卵の割球と未受精卵を融合させ、得られた受精卵の発生率を観察した。得られた受精卵の85.4%が2細胞期に、53.8-63.6%が胚盤胞期まで発育した。これらの胚を受容雌に移植したところ、42.9%が着床し、22.6%が胎仔まで正常に発育した。

また、ロバートソン型転座を保有する雄マウスから精子を回収し、2細胞期・雄性発生卵を作出し、一つの割球を細胞融合を利用し

た PCC により染色体分析、残りの割球から受精卵を作出・産仔を得たところ、確実に転座を検出することができ、正常核型を持つ個体とロバートソン転座を持つ個体の産み分けを期待通りに行うことができた。以上の結果から、細胞融合を利用した PCC による精子の受精前遺伝学的診断法の確立に成功した。また既報から、本法は遺伝子レベルの診断にも応用可能であることが予測できた。

(2) 精子の受精前遺伝学的診断法の利便性を向上させるために、以下の二つの実験を行った。

① 細胞融合を利用した PCC による染色体分析の欠点は、分析に未受精卵子を使用しなければならないことである。これを克服するために、薬剤 (Caly A) により PCC を誘導する方法を検討した。

顕微授精による通常の受精卵、賦活化による単為発生卵、除核卵に顕微授精した雄性発生卵から作出された 2 細胞期胚を 10-20 nM Caly A で 2 時間処理したところ、通常の受精卵では、Caly A の濃度に関わらず効率よく PCC を誘起できた (10 nM: 83.1%, 20 nM: 100%)。一方で単為発生卵と雄性発生卵では、20 nM Caly A による PCC 誘導率はそれぞれ 92.2% と 100% であったが、10 nM Caly A ではそれぞれ 44.2% と 32.4% で十分な PCC 誘導率を得ることができず、PCC を誘起できたとしても凝集が不十分なものが観察された。以上の結果から、割球の染色体分析において、細胞融合を利用した PCC の代替法として Caly A を用いた PCC が有効であることが示された。

② 次に精子の受精前遺伝学的診断法の一連の操作を、計 1 個の未受精卵子で行う方法を検討した。また、精子側だけでなく卵子側の遺伝学的診断も行えるか否かを検討した (図 2)。

成熟卵子を二等分した有核細胞片と無核細胞片から、賦活化・顕微授精により、それぞれ単為発生卵・雄性発生卵を作出し、2 細胞期まで発生させた。それぞれの割球を単離後、単為発生卵と雄性発生卵の割球を融合させ、2 倍体の受精卵を構築したところ、24 時間後には 75.2% が分割し、50.3% が胚盤胞まで発育した。これらの胚は胎仔まで発育した。また、雄性発生卵・単為発生卵に関わらず、残された割球は Caly A 誘導 PCC により染色体分析を行うことができた。以上の結果から、精子の受精前遺伝学的診断法の一連の操作

を、計 1 個の未受精卵子で行うことが可能となり、さらに予め染色体分析を行った 1 個ずつの精子と卵子から産仔を獲得する「配偶子の受精前遺伝学的診断法」の確立に成功した。

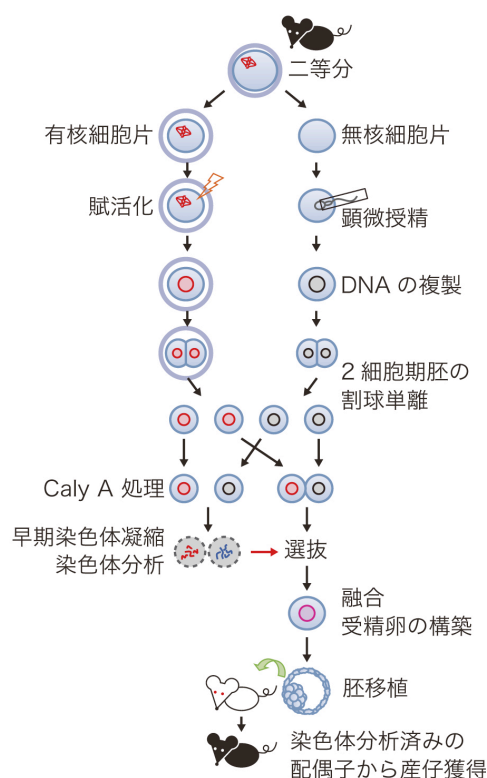


図 2. Caly A を利用した PCC による配偶子の受精前遺伝学的診断法の概略

## 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)

- ① H. Watanabe, H. Kusakabe, H. Mori, R. Yanagimachi, H. Tateno, Production of offspring after sperm chromosome screening: an experiment using the mouse model, Human Reproduction, 査読有, Vol. 28, No. 2, 2013, pp. 531-537. DOI:10.1093/humrep/des388 <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/modules/xoonips/detail.php?id=23136143>

[学会発表] (計 4 件)

- ① 渡部 浩之、立野 裕幸、Calyculin A を用いた早期染色体凝集法によるマウス初期胚割球の染色体分析、第 105 回日本繁殖生物学会、2012 年 09 月
- ② 渡部 浩之、日下部 博一、森 英紀、柳町 隆造、立野 裕幸、精子の受精前遺伝学的診断法への実験的アプローチ、第 104 回

日本繁殖生物学会、2011年09月

- ③ H. Watanabe, H. Suzuki, Y. Fukui, H. Tateno, Excessive pre-treatment of mouse spermatozoa with DNA non-interacting agents causes zygotic chromosomal damage, International Meeting for Evolution of Reproductive Biology and Task of Frontiers: Trajectory and Prospects of IVF, Stem Cell and Epigenetic Studies, 2011年09月
- ④ H. Watanabe, R. Yanagimachi, H. Tateno, Production of mouse offspring derived from pre-analyzed paternal genome: Experimental approach to sperm genetic screening (SGS), 44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2011年7-8月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 浩之 (WATANABE HIROYUKI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90608621