

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462549

研究課題名(和文) ヒト体外培養系での胚内部細胞塊分裂の実体検証：より生理的な胚盤胞培養系の基礎検討

研究課題名(英文) Inner cell mass division during human blastocyst formation in vitro culture system.

研究代表者

寺田 幸弘 (Terada, Yukihiro)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10260431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物胚の体外培養系での連続観察(タイムラプス撮影)にてはじめて確認された胚盤胞形成期における内部細胞塊様の細胞の不自然な分離に関する検討である。

この挙動が凍結融解後の胚に多く認められること(JRD, 2016)、ギャップジャンクションの機能阻害下においても認められること(JARG, 2015)を明らかにした。さらにこの挙動が認められた胚はその発育能が低い可能性が考えられた。これらの検討によりヒト体外受精の臨床に普遍的に導入されている凍結融解操作が胚発育挙動およびその質に影響を与えていることが明らかになった。さらに、胚発育の連続観察により胚評価の新しい科学的な指標が派生する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study is an examination about the unnatural separation of the inner cell mass cells during human in vitro blastocyst formation. This phenomenon was found by continuous observation by timelapse cinematography in the in vitro culture system of the mammalian embryo. This behavior was frequently observed in embryos after the freeze thaw (JRD, 2016), also frequently observed under condition with the functional inhibitor of the gap junction (JARG, 2015). Furthermore, the embryo which this behavior was found was thought to have low the developmental potential. These findings suggested that human embryo freeze thaw have influence on embryonic development behavior and the quality of embryos. The new scientific indicator of the embryo evaluation will be developed by the continuous observation/evaluation of the embryonic development.

研究分野：産婦人科学

キーワード：ヒト胚 胚発育 胚内部細胞塊分裂 胚凍結 胚盤胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト配偶子、初期胚を体外で育む体外受精などの生殖補助技術は不妊症に対する主たる治療法として確立し、本邦においても年間20万件の同技術が臨床の場で施行されている。一般治療のレベルまで普及した同技術であるが、体外で配偶子、初期胚を培養することがヒト生命に及ぼす影響は未だ明らかになっていない点もある。約15年前に「ヒト胚盤胞用培養液」が開発、販売され比較的長期間(1週間程度)ヒト胚の体外培養が可能になり世界中の臨床の場に導入されているが、胚盤胞まで培養した胚を使用すると一卵性双胎の発症率が上昇することが報告もされている。近年の体外培養機器の精度向上により胚発育を連続動画で観察することが可能になった。胚盤胞までの体外でのヒト胚発育の連続観察によると胞胚腔形成時に内部細胞塊(ICM)はあたかも細胞間で糸を引きあうように(ストランド現象)分裂し、形態的には2個の内部細胞塊をもつ胚盤胞が形成されることが極めて高い頻度で観察された。この観察結果はその世界的先駆けである見尾ら(Mio AJOG, 2006)はじめとして、我々を含めた諸家により報告されている。我々の予備的な検討によると観察した体外培養ヒト胚盤胞の約30%にこのような現象が認められている。胚盤胞を用いた体外受精周期での一卵性双胎の発症率はこれほど高率ではない。しかし、この現象は最近開発されたヒト胚発育の連続的な観察により、従来想定されていなかった一見不自然なヒト命の誕生の挙動が現行の体外培養系で生じている可能性を示している。

2. 研究の目的

近年可能になったヒト胚発育の連続観察によると、長期体外培養下では胚盤胞形成時に内部細胞塊が複数に分裂することが多くの胚で認められる(Mio Am J ObGyn 2006 他報告多数)。この一見奇異なヒト胚の挙動の原因や得られる同一胚に複数観察される形体的内部細胞塊の性状は不明である。本研究ではその現象が発生するメカニズムと分離した内部細胞塊の性状を胚細胞マーカーや細胞接着、融合に関与する分子の発現を中心に解析し明らかにする。それらより、現行のヒト胚の長期体外培養系における内部細胞塊分裂の本質を明らかにし、生殖補助技術の施行に必須であるヒト胚体外培養の効率化と安全性の向上に資することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

マウス2細胞期胚を採取し、ギャップジャンクション阻害剤 oleamide 培地(5, 10, 20, 50 μ M), DMSO0.1%で溶解したギャップジャンクション阻害剤 1-heptanol 培

地(0.1, 1, 5, 10mM)の3系、計10群を用いて発育試験を行った。次に、同3系の発育挙動について、それぞれタイムラプスインキュベーターを用いて発生の様子を3分毎に撮影し、観察した。タイムラプス解析から胞胚腔形成後に胞胚腔が虚脱する回数を計測し、3系を比較した。胚の内細胞塊の分離を伴う現象に関しても解析し比較した。比較として当院で体外受精胚移植を施行した患者より同意を得た廃棄胚を、当院倫理委員会の承認と日本産婦人科学会の承認のもとに実験試料としてタイムラプス解析した。蛍光免疫染色を用いて胚のタンパク発現を評価した。

マウス2細胞期胚を採取した。8細胞期まで培養したのち、無作為に新鮮胚群と凍結解凍胚群に分けCryotop法を用いてガラス化凍結を施した。両群とも胚盤胞期から孵化開始までの収縮回数を記録した。孵化開始できない胚については各群の平均孵化開始時間までを観察期間とした。収縮は強収縮と弱収縮を定義し、各回数および内部細胞塊の分離の有無を記録した。胚の収縮と関連すると考えられる蛋白群をコードするmRNAの発現を調べるため、8細胞期胚盤胞初期、胚盤胞形成から20時間後の胚10個からRNAを採取した。凍結解凍群の胚盤胞形成20時間後については強収縮の有無についても分類した。採取したRNAを増幅させ、RT-qPCRを行って、比較検討した。

4. 研究成果

哺乳動物胚の体外培養系での連続観察(タイムラプス撮影)にてはじめて確認された胚盤胞形成期における内部細胞塊様の細胞の不自然な分離に関する検討である。この挙動が凍結融解後の胚に多く認められた。胚収縮に関するmRNAの検討では強収縮が認められた凍結解凍胚群ではAtp1a1が高発現となっていた。(JRD, 2016)、ギャップジャンクションの機能障害下においても認められることを明らかにした。分離されたように観察されるそれぞれの内部細胞塊の細胞のそれぞれ胚性マーカーは陽性であった(JARG, 2015)。以上よりこの挙動が認められた胚はその発育能が低い可能性が考えられた。これらの検討によりヒト体外受精の臨床に普遍的に導入されている凍結融解操作が胚発育挙動およびその質に影響を与えていることが明らかになった。さらに、胚発育の連続観察により胚評価の新しい科学的な指標が派生する可能性が考えられた。

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6件)

(英文)すべて査読あり

- ① Shimoda Y, Kumagai J, Anzai M, Kabashima K, Togashi K, Miura Y, Shirasawa H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y: Time-lapse monitoring reveals that vitrification increases the frequency of contraction during the pre-hatching stage in mouse embryos. *J Reprod Dev.* 62(2)187-193(2016)
- ② Shirasawa H, Kumagai J, Sato E, Kabashima K, Kumazawa Y, Sato W, Miura H, Nakamura R, Nanjo H, Minamiya Y, Akagami Y, Terada Y: Novel method for immunofluorescence staining of mammalian eggs using non-contact alternating-current electric-field mixing of microdroplets. *Scientific reports.* 5:15371(2015)
DOI10.1038/srep15371
- ③ Togashi K, Kumagai J, Sato E, Shirasawa H, Shimoda Y, Makino K, Sato W, Kumazawa Y, Omori Y, Terada Y. Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos. *J Assist Reprod Genet.* 32:969-976. (2015)
Doi: 10.1007/s10815-015-0479-1
- ④ Shirasawa H, Yoshioka T, Sawada K, Terada Y: Repeated recombinant activated factor VII administration in a patient with congenital factor VII deficiency undergoing modified radical hysterectomy: a case report. *Haemophilia.* 20(1)e101-103(2014)
DOI:10.1111/hae.12312
- ⑤ Shirasawa H, Kumagai J, Sato W, Kumazawa Y, Sato N, Terada Y: Retrieval and in vitro maturation of human oocytes from ovaries removed during surgery for endometrial carcinoma: a novel strategy for human oocyte research. *J assist reprod genet.* 30(9):1227-1230(2013)
DOI:10.1007/s10815-013-0040-z

(和文)すべて査読あり

- ① 富樫嘉津恵、熊谷仁、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、金森恭子、佐藤朗、児玉英也、寺田幸弘: 40歳以上の体外受精による妊娠症例の周産期予後に関する検討. 秋田県産科婦人科学会誌 20: 3-7 (2015)

[学会発表] (計6件)

- ① Shirasawa H, Kumagai J, Sato E, Kumazawa Y, Sato W, Togashi K, Terada Y (2015) Novel rapid immunofluorescence staining method for the murine egg using the non-contact alternating current electric field mixing of the microdroplet. International federation of Fertility Societies/Japan Society for reproduction Medicine International Meeting(国際学会). 4月26日~29(横浜)
- ② Togashi K, Kumagai J, Sato E, Shirasawa H, Sato W, Kanamori K, Kumazawa Y, Kabashima K, Kodama H, Terada Y (2015) Gap junction inhibitor induced aberrant inner cell mass behavior in pre-implantation mouse embryos. International federation of Fertility Societies/Japan Society for reproduction Medicine International Meeting(国際学会). 4月26日~29(横浜)
- ③ 富樫嘉津恵、白澤弘光、佐藤亘、金森恭子、熊澤由紀代、熊谷仁、児玉英也、寺田幸弘 (2015) キャップジャンクションの機能障害はマウス胚で‘strand現象’を惹起する. 第67回日本産科婦人科学会 4月10日~12(横浜)
- ④ 白澤弘光、熊谷仁、富樫嘉津恵、佐藤亘、熊澤由紀代、井原基公、宇都宮裕貴、八重樫伸生、寺田幸弘 (2015) 卵胞液の施設間輸送方法の改善が摘出卵巣由来のヒト未成熟卵子に対する体外成熟培養結果へ与える影響に関する検討. 第67回日本産科婦人科学会 4月10日~12(横浜)
- ⑤ 富樫嘉津恵、佐藤恵美子、椛嶋克哉、下田勇輝、白澤弘光、佐藤亘、熊澤由紀代、熊谷仁、児玉英也、寺田幸弘 (2015) キャップジャンクション阻害剤存在下では胞胚腔の虚脱が増加する. 第56回日本卵子学会 5月30日~31日(栃木)
- ⑥ 白澤弘光、佐藤恵美子、熊谷仁、富樫嘉津恵、下田勇輝、佐藤亘、熊澤由紀代、井原基公、宇都宮裕貴、八重樫伸生、寺田幸弘 (2015) ヒト卵胞液の大学病院間輸送方法および輸送後の体外成熟培養結果に関する検討. 第67回日本産科婦人科学会 4月10日~12(横浜)

[図書] (計2件)

- ① 志賀尚美、宇都宮裕貴、黒澤大樹、菅沼亮太、福井淳史、高橋俊文、阿部宏之、寺田幸弘、八重樫伸生 (2015) 金原出版. 産婦人科の実際 1213-1217
- ② 佐藤亘 (2015) 医学書院. 今日の治療方針 1200-1201

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田幸弘 (TERADA, Yukihiro)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10260431

(2) 研究分担者

権嶋克哉 (KABASHIMA, Katsuya)

秋田大学・医学系研究科・技術系補佐員

研究者番号：30615422

(3) 研究分担者

熊谷仁 (KUMAGAI, Jin)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60333936

(4) 研究分担者

熊澤由紀代 (KUMAZAWA, Yukiyo)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70400504