

Study on Multinucleated Blastomere Formation in Mammalian Embryos and Further Developmental Competence

江頭, 昭義

<https://hdl.handle.net/2324/1544020>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 江頭 昭義

論文題名 : Study on Multinucleated Blastomere Formation in Mammalian Embryos and Further Developmental Competence

(哺乳動物の初期胚における多核形成とその後の発生能に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト生殖補助医療 (ART : assisted reproductive technology) は急速な発展を遂げ 2013 年の時点で、我が国の出生児の約 30 人に 1 人は ART 技術により出生していると報告されている。我が国におけるヒト ART では女性の晩婚化や高齢化が徐々に進み、より難治性の症例が増加しているのも事実である。ヒト ART においては、体外受精や顕微授精実施後の良好な妊娠率を得るために、胚を形態学的に評価し移植する。胚の発生速度が適正である胚、細胞のアポトーシスにより産生される fragmentation の割合が少ない胚、分割した割球の均一性を示す胚などを指標として評価する。その形態評価の中に、一つの細胞の中に複数個の核が確認される多核胚がある。多核胚はこれまでの報告では、移植には適さない胚として評価されている。しかし、治療をしても多核胚しか得られない、あるいは受精卵のほとんどが多核胚となる症例では、何度治療を繰り返しても妊娠に至らず、卵子提供などでこの問題点を解決する方法しか残されていない患者も散見される。しかしながら、現状わが国では卵子提供は認められておらず、このような患者を救う救済策を見つける必要がある。

多核胚に関しては ART におけるヒト胚で多くが報告されているが、マウス、ラット、ブタおよびウシなどの動物種でも観察され、胚の発生阻害等が報告されている形態異常の 1 種である。近年の Knock-out マウス、アフリカツメガエルおよび HeLa 細胞を用いた研究から、キネシンファミリーに属する Kid が減数分裂や細胞分裂時の紡錘体形成や染色体分離に作用し、細胞の多核形成に関与することが示唆されている。そこで本研究では、ヒト多核胚の特性を解析するとともに、成熟培養の段階より Kid の発現動態とその機能を明らかにすることにより、多核形成のメカニズムを解明し、ヒト ART の技術として応用することを目的とした。

第 2 章では、ART の現場においてヒト多核胚の発生能、染色体解析および妊孕性を調べ、その特性を解析した。多核胚は、女性の年齢が高くなるに従い採卵される受精卵に占める割合が有意に増加し、染色体解析では 60% に染色体異常を認めた。さらに、受精後 2~3 日目の初期胚 (2-8 細胞期胚) の新鮮胚移植における多核胚の妊孕性は、多核を認めない正常な胚と比較して有意に低率であった。培養 5 日および 6 日目における多核胚の胚盤胞期胚への発生率は、多核を認めない胚と比較して有意に低い値を示したが、培養した胚の 50% が胚盤胞期胚へと発生した。得られた胚盤胞期胚をガラス化凍結法にて凍結保存を実施後に、融解単一胚盤胞移植を実施した場合の妊孕性は、正常胚の妊孕性と比べて差を認めなかった。これらの結果から、多核胚は、高率に染色体異常が発生し、2~8 細胞期胚の移植では妊孕性が低いものの、体外培養を継続して得られた胚盤胞期胚は、正常胚と同等の妊孕性を有していた。本研究結果はヒト ART における多核胚の有効利用の手段の一つとなることが示唆された。

第 3 章では、多核胚の形成機構を明らかにするために、染色体凝集因子の一つである Kid に注目して、その発現動態と機能を解析した。はじめに、マウス卵子および初期発生過程における Kid の遺伝子およびタンパク発現をリアルタイム RT-PCR と免疫細胞化学的手法により発現動態を解析した。RT-PCR の結果、Kid 遺伝子は GV、MII 卵子および初期発生過程において認められた。免

疫細胞染色では、Kid タンパクは GV 卵子および初期胚の核内および MII 卵子の紡錘体上に発現していることが示された。次いで、マウス GV 卵子に Kid siRNA を導入してその遺伝子発現を抑制し、初期発生における Kid の機能解析を行った。リアルタイム RT-PCR にて Kid 遺伝子の発現量を解析した結果、Kid siRNA 導入により MII 卵子における Kid 遺伝子の発現が低下した。免疫細胞染色では、Kid siRNA 導入後は MII 卵子および初期発生過程での Kid タンパクの発現は検出されなかった。Kid siRNA 導入後の体外発生能を調べた結果、Kid siRNA 導入胚では多核胚の割合が有意に高い値を示し、培養 3 日目における 5 細胞期以上の胚および胚盤胞期胚への発生率は有意に減少した。これらの結果より、マウス胚における多核胚の形成およびその後の胚発生には Kid が重要な役割を持つことが明らかとなった。

以上の結果から、哺乳動物の初期胚における多核形成はその発生能および妊孕率を大きく低下させるが、多核胚でも胚盤胞期胚まで発生した胚の妊孕率は正常胚と差が無いことが明らかとなった。また、マウス胚における Kid の発現動態と機能解析により、Kid の欠損によって多核形成が誘起されることが明らかとなった。これらの研究成果は、多核胚の移植による産子作出の可能性を示したものであり、ART におけるヒト多核胚の妊孕率の改善に貢献するだけでなく、体外受精や顕微授精等の技術によって作出された実験動物および家畜の胚移植へも応用できるものとする。