

氏名・(本籍)	岡部 基成 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1107 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	An approach for live imaging of first cleavage in mouse embryos using fluorescent chemical probes for DNA, microtubules, and microfilaments (DNA、微小管および微小繊維に対する蛍光プローブの、マウス胚第一卵割のライブイメージングへの応用)
論文審査委員	(主査) 八月朔日 泰和 教授 (副査) 沼田 朋大 教授      森 菜緒子 教授

# 学位論文内容要旨

## 論文題目

An approach for live imaging of first cleavage in mouse embryos using fluorescent chemical probes for DNA, microtubules, and microfilaments

(論文題目の和訳)

DNA、微小管および微小繊維に対する蛍光プローブの、マウス胚第一卵割のライブイメージングへの応用

申請者氏名 岡部基成

## 研究目的

哺乳類では、初期胚発生の過程で染色体や細胞骨格の動的な形態変化が起こり、正常な細胞分裂が進まない場合には、染色体異数性などの異常が発生します。そういった異常分裂の際に、細胞内で染色体や細胞骨格がどのような挙動を示しているかを知るために、従来は mRNA を胚に注入することや、固定標本を作製し染色することで観察されてきた。近年、ヒト初期胚に DNA および微小繊維をターゲットとした蛍光プローブを用いたライブイメージングが報告されており、mRNA を注入する方法と比較し簡便さが利点として挙げられ、今後さらに報告が増えると考えられる。細胞分裂の際には、微小管も重要な因子として知られており、既報に加え微小管も併せて可視化することで、より多くの情報が得られると考えた。今回、DNA、微小繊維および微小管を、マウス初期胚の第一分裂において可視化することを目的として実験を行った。

## 研究方法

体外受精により得られたマウス受精卵を培養し、顕微鏡で二前核が観察された時点で凍結し、実験に用いた。マウス胚を解凍後、DNA、微小繊維、微小管それぞれをターゲットにした、市販の蛍光プローブを添加した培養液に浸漬し、共焦点顕微鏡で 2 細胞になるまでを観察した。観察による胚への影響を検討するため、共焦点顕微鏡での観察群の他に、蛍光プローブを含んだ培養液に浸漬したのみの群と、培養液のみの群でも、前核膜の崩壊から 2 細胞期までの到達時間、および 4 細胞期以降の胚発育率を通常のタイムラプスインキュベーターで観察し比較した。

## 研究成績

雌雄前核の崩壊とともにクロマチンが凝集し染色体が形成され、微小管がそれらを取り囲むように出現した。微小管による紡錘体の形成と染色体の赤道面への整列後の分離、また分離時に中心体を取り囲むような微小繊維からなる収縮環が形成される一連の挙動が、観察されたほとんどすべての胚で明瞭に可視化された。いくつかの個体において、異なった細胞成分の挙動が観察された。その中には、既報で lagging chromosome として報告されていたものと同様の現象も見られた。観察によるレーザー曝露の影響と考えられる、観察後の胚発育の低下を認めしたが、2 細胞期および 4 細胞期の到達率には有意差を認めなかった。観察群とコントロール群において、前核膜崩壊から 2 細胞期までの時間に有意差は認めなかった。

## 結論

蛍光標識物質を含んだ培養液に胚を浸漬させるのみの簡便かつ遺伝子操作を伴わない方法でマウス胚の第一卵割における DNA、微小繊維、微小管の挙動を観察することができた。この方法は遺伝子操作を伴わず、ヒトへの応用も容易であると考えられる。ヒト胚はマウスに比べ多様な細胞分裂挙動を示し、その細胞内挙動が可視化されることで、細胞生物学的な知見が得られ、生殖補助医療の発展に寄与すると考えられる。

# 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：八月朔日 泰和

申請者：岡部 基成

論文題名：英文 An approach for live imaging of first cleavage in mouse embryos using fluorescent chemical probes for DNA, microtubules, and microfilaments  
(和訳) DNA、微小管および微小繊維に対する蛍光プローブの、マウス胚第一卵割のライブイメージングへの応用

## 要旨

哺乳類では初期胚発生の過程で染色体や細胞骨格の動的な形態変化が起こり、正常な細胞分裂が進まない場合には、染色体異数性などの異常が発生する。そのような異常分裂の際に、細胞内で染色体や細胞骨格がどのような挙動を示しているかを知るために、従来は mRNA を胚に注入することや、固定標本作製し染色することで観察されてきた。近年、ヒト初期胚に DNA および微小繊維をターゲットとした蛍光プローブを用いたライブイメージングが報告され、mRNA を注入する方法に比較して簡便であるため、今後さらに報告が増えると考えられた。また、細胞分裂の際には微小管も重要な因子として知られている。本研究では受精卵の分裂において DNA、微小繊維のみならず微小管の動態を可視化し、顕微鏡下で観察される正常および異常分裂における各構造の細胞内での挙動を観察、考察を行った。

本研究の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

これまで良好胚を選別する方法を著者らのグループは探求してきた。しかし、顕微鏡下での選別が主であり、正常および異常分裂における細胞内部の DNA、微小管、微小繊維の動態は明らかではなかった。従来は mRNA を胚に注入することや、固定標本作製して染色することで観察されてきたが、蛍光プローブを用いたライブイメージングの簡便な方法が開発された。本研究の斬新性はその蛍光プローブを用いて、正常および異常分裂における受精卵内部の DNA、微小管、微小繊維の動態を世界で初めて解明したことにあると考えられる。

### 2) 重要性

蛍光標識物質を含んだ培養液に胚を浸漬させるのみという簡便かつ遺伝子操作を伴わない方法で、マウス胚の第一卵割における DNA、微小管、微小繊維の挙動を観察している。この方法は遺伝子操作を伴わず、ヒトへの応用も容易であると考えられる。ヒト胚はマウスに比べ多様な細胞分裂挙動を示すため、その細胞内挙動が可視化されることで細胞生物学的な知見が得られ、今後の生殖補助医療における基礎的知見として注目に値する。

### 3) 研究方法の正確性

正常および異常分裂において、DNA、微小管、微小繊維の挙動の可視化を非常に明瞭に行っている。正常では雌雄前核の崩壊とともにクロマチンが凝集し染色体が形成され、微小管がそれらを取り囲むように出現すること、微小管による紡錘体の形成と染色体の赤道面への整列後の分離、また分離時に中心体を取り囲むような微小繊維からなる収縮環が形成されるといった一連の挙動が明瞭に可視化されている。一方、異常分裂においては正常分裂と異なる細胞成分の挙動が観察されたことも報告している。共焦点レーザー顕微鏡での観察群の他に、蛍光プローブを含んだ培養液に浸漬したのみの群と、培養液のみの群でも、前核膜の崩壊から2細胞期までの到達時間、および4細胞期以降の胚発育率を通常のタイムラプスインキュベーターで観察し比較するなど、コントロール実験も適切に行っている。定量的解析は統計学的検討を行っており、客観的な評価法で正確性があると考えられる。

### 4) 表現の明瞭さ

受精卵の分裂において DNA、微小管、微小繊維の動態を可視化するための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。