

氏名・(本籍)	小野 有紀 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1122 号
学位授与の日付	令和 6 年 9 月 27 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	Shape of the first mitotic spindles impacts multinucleation in human embryos (ヒト胚第一体細胞分裂紡錘体の形状は多核化と強く関連する)

論文審査委員	(主査) 八月朔日 泰和 教授
	(副査) 大森 泰文 教授 中山 勝敏 教授

学位論文内容要旨

研 究 成 績

Shape of the first mitotic spindles impacts multinucleation
in human embryos

(ヒト胚第一体細胞分裂紡錘体の形状は多核化と強く関連する)

申請者氏名 小野 有紀

研 究 目 的

近年導入されつつある着床前胚染色体異数性検査によると、ヒト胚の多くに染色体異数性を伴うモザイクが認められ、その発生原因は受精後の初期細胞分裂の過程に存在することが推定されている。ヒト受精卵の最初の体細胞分裂は、父方と母方のゲノムの融合を含むため、その後の体細胞分裂とは大きく異なる。親のゲノムは各前核核膜で分離され、分離されたゲノムは前核核膜崩壊後に紡錘体で融合して配列する。正確な最初の体細胞分裂は、遺伝的欠陥を防ぐために不可欠であることが予想されるが、以前の研究により、第一体細胞分裂中に細胞質の断片化や多核化などの多くの問題が発生することが示されている。これらは他の哺乳類の胚でも観察されるが、ヒトの胚での発生率は他の動物種の胚よりもはるかに高く、生殖補助医療 (ART) における着床不良と関連していると考えられている。

本研究では雌雄前核核膜消失後の第一有糸分裂に焦点を当て、ヒト前核期胚のライブセルイメージングを行った。ヒト胚に蛍光物質を発現する遺伝子を組み込んだ mRNA を注入し非生理的タンパク質を生成させることは、倫理的な問題があることから本研究では蛍光標識タンパク遺伝子の導入は行わず、DNA と紡錘体を形成するチューブリンを対象とした蛍光試薬を用いることで、ヒト初期胚の細胞内部のダイナミックな挙動を明らかにした。

研 究 方 法

受精卵の凍結保存中に治療を終結もしくは妊娠出産後に廃棄を希望し、研究利用に同意の得られた 2 前核期胚を融解して使用した。核および微小管に結合する蛍光標識プローブを用い、蛍光ライブセルイメージングを行った。31 個のヒト凍結融解 2 前核期胚を第一あるいは第二分裂終了まで観察した。ヒト胚の 3 次元 (3D) 視覚化は、Imaris ソフトウェアを使用した。最初の有糸分裂紡錘体の形状は、画像分析によって定量化され、ImageJ を使用して紡錘体のアスペクト比を計算した。

80%以上の胚 (n=25/31) が 2 細胞期で多核を呈した。第一体細胞分裂紡錘体の形態には様々なバリエーションがあり、アスペクト比 (縦横比) の低い紡錘体は、高い紡錘体と比較して 2 細胞段階で多核化する傾向を認めた。さらに多核を呈する第一体細胞分裂紡錘体の多くで、紡錘体極の不明瞭化が観察され、多核形成との強い関連を認めた (n=11/20)。しかし、2 細胞期で多核を有する胚の 50%以上が 4 細胞期では単核に修正された。次に免疫蛍光染色法を用いて、異なる形態の紡錘体における中心体の位置を調査した。γ-チューブリンを標識する抗体を用いて、紡錘体極の中心体の局在を観察した。紡錘体極が明瞭な高アスペクト比の紡錘体には 2 つの γ-チューブリン陽性の紡錘極があり、2 つの極は染色体に対して垂直な線上に並んでるのが観察された。一方、紡錘体極の不明瞭化を伴う紡錘体は 2 つの γ-チューブリン陽性の紡錘体極を認めたが、その位置は染色体に対して垂直線上に認められず、やや離れた位置に認めた。多極紡錘体はライブセルイメージングでは 3 つの紡錘体極を持つように視認されるが、実際には 2 つの γ-チューブリン陽性の紡錘体極しかなく、もう 1 つの極は γ-チューブリン院生の紡錘体極であった。

結 論

私たちの研究では、最初の有糸分裂紡錘体に不安定性と不均一性があり、それが多核化と強く関連していることが示された。さらに中心体の位置は紡錘体の種類によって異なることを示した。以上の結果から精子と卵母細胞から受け継がれた中心体が紡錘体の不安定性を引き起こす可能性があることが示された。分裂期胚における紡錘体形成の根底にあるメカニズムを明らかにすることは、ヒトの補助生殖技術の成功率の向上に貢献すると考えられる。

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：小野 有紀

論文題名：英文 Shape of the first mitotic spindles impacts multinucleation in human embryos
(和訳) ヒト胚第一体細胞分裂紡錘体の形状は多核化と強く関連する

要旨

ヒト胚の多くに染色体異数性を伴うモザイクが認められ、その発生原因は受精後の初期細胞分裂の過程に存在することが推定されている。ヒト受精卵の最初の体細胞分裂は父方と母方のゲノムの融合を含むため、その後の体細胞分裂とは大きく異なる。親のゲノムは各前核核膜で分離され、分離されたゲノムは前核核膜崩壊後に紡錘体で融合して配列する。正確な最初の体細胞分裂は遺伝的欠陥を防ぐために不可欠であることが予想されるが、第一体細胞分裂中に細胞質の断片化や多核化などの多くの問題が発生することが示されている。これらの現象はヒト胚での発生率が他の動物種の胚よりもはるかに高く、生殖補助医療における着床不良と関連していると考えられている。本研究では雌雄前核核膜消失後の第一有糸分裂に焦点を当て、倫理的な問題のある遺伝子導入を行わず、DNA および紡錘体を形成するチューブリンのヒト初期胚の細胞内部におけるダイナミックな挙動についてライブセルイメージングで観察し、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申請者らのグループは探求してきたが、ヒト受精卵内部における正常および異常分裂における DNA や微小管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受精卵内部における分子動態が観察されてきたが、近年、蛍光プローベを用いたライブイメージングの簡便な方法が報告されている。本研究の斬新性は生殖補助医療において着床不良と関連していると考えられるヒト受精卵第一体細胞分裂異常に注目し、蛍光プローベを用いて正常および多核化における受精卵内部の DNA および紡錘体の形成と挙動を世界で初めて動的に解明し、さらに多

核化における紡錘体の形態と中心体が示す紡錘体極との関係を、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

申請者らのグループはこれまで、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 および微小管の挙動を観察し報告した。本研究ではその染色法を用い、ヒト受精卵に対して倫理的な問題のある遺伝子導入を行わず、ヒト初期胚の細胞内部における DNA および紡錘体のダイナミックな挙動をライブセルイメージングで観察し、今後のヒト生殖補助医療における初期胚の選別の重要性と受精卵内部での分子の挙動を明らかにした点が注目に値する。

3) 研究方法の正確性

ヒト受精卵の最初の体細胞分裂である第一体細胞分裂に注目し、正常分裂および多核化を伴った分裂においてライブイメージングを用い、多核を呈する割合、紡錘体の形態のバリエーション、紡錘体のアスペクト比（縦横比）の比較での多核化傾向の解析を形態学的並びに統計学的に正確に行っている。さらに、多核を呈する第一体細胞分裂紡錘体の多くで紡錘体極の不明瞭化が観察されて多核形成との強い関連を認めること、2細胞期で多核を有する胚の50%以上が4細胞期では単核に修正されることを、統計学的に正確に明らかにしている。固定標本を用いた解析でも紡錘体の形態と中心体の位置を免疫組織化学染色法を用いた形態学的解析、統計学的解析により正確に明らかにした。各実験におけるコントロール実験も適切に行っており、本研究における研究方法は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

ヒト受精卵の分裂において DNA と微小管の動態および中心体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える。

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。