

氏 名 ・ (本籍)	富樫 嘉津恵 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 898 号
学位授与の日付	平成 27 年 9 月 24 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	Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos (ギャップジャンクション阻害剤はマウス受精胚の内細胞塊の発育挙動に影響し、胚盤胞の虚脱と再膨張を頻回にする)
論文審査委員	(主査) 教授 羽瀧 友則 (副査) 教授 高橋 勉 教授 佐々木 雄彦

学位論文内容要旨

論文題目 Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos

(論文題目の和訳) ギャップジャンクション阻害剤はマウス受精胚の内細胞塊の発育挙動に影響し、胚盤胞の虚脱と再膨張を頻回にする。

申請者氏名 富樫嘉津恵

研究目的

日本初の体外受精児の誕生から 30 年経ち、晩婚化や女性の社会進出に伴い生殖補助医療による生児は 2011 年には 32 人に 1 人まで増加した。しかし、体外受精・胚移植が胚に与える影響・現象に関しては詳細が十分には明らかになっていない。

近年、継時的かつ非侵襲的に胚の培養を観察するタイムラプス解析が胚培養に活用され、タイムラプス解析による胚の発育挙動に関して、様々な現象が報告された。

一方で、コネキシン 43 と多能性マーカーである Nanog の発現に関連性が報告され、ギャップジャンクションによる割球間の直接連絡は胚発育に影響すると推察されるものの、ギャップジャンクション阻害剤が胚に与える動的影響については結論が出ていない。

今回我々は、タイムラプス観察システムを導入することで、胚培養中のギャップジャンクション阻害剤添加が胚発育挙動に与える影響を動的に解析した。

研究方法

当施設の動物実験倫理委員会の規則に則って、8-12 週齢の ICR マウスに PMSG/hCG 刺激の上で自然交配し、腔栓を確認した雌個体の卵管を灌流して 2 細胞期胚を採取した。CZB 培地を基本培地として DMSO0.1%添加培地 (対照群) と DMSO0.1%で溶解した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内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。統計処理は SPSS を用いて行った。

研究成績

胚培養 72 時間と 96 時間で比較した胚盤胞到達率 (胞胚腔形成率) は、対照群 87.5% vs. 90.9%, オレアミド添加群で各 88.9% vs. 100%, 84.8% vs. 90.9%, 81.3% vs. 90.9%, 7-5.0% vs. 72.7% ($p=0.0223$) と、オレアミド 50 μ M 添加群で有意に胚盤胞到達率が低下した。1- μ heptanol 添加群で 91.8% vs. 100%, 87.5% vs. 90%, 83.7% vs. 100%, 66.0% vs. 100% ($p=0.00125$) で、 μ heptanol 10mM 添加群では有意に胚盤胞到達率が低下した。ギャップジャンクション阻害剤添加による濃度依存性の低下傾向を認めた。しかし培養時間の延長によって対照群と同等の胚盤胞到達率を得た。

ギャップジャンクション阻害剤添加群では、対照群に比べて第 2 割から第 3 割までの時間胞胚腔形成までの時間、透明帯脱出までの時間が有意に延長した。

ヒトで報告されている strand 現象が、ギャップジャンクション阻害剤を添加した体外培養マウス胚においても観察された。胞胚腔形成後に胞胚腔の 30% を超える虚脱は DMSO0.1%添加培地で平均 1.6 回、DMSO0.1%で溶解した oleamide50 μ M 培地で平均 4.5 回、1-heptanol 培地で 5.5 回であった。胞胚腔の完全虚脱は DMSO0.1%添加培地で平均 0.35 回、DMSO0.1%で溶解した oleamide50 μ M 培地で平均 0.52 回、1-heptanol 培地で 0.75 回であった。ギャップジャンクション阻害剤添加群では胞胚腔形成後に胞胚腔の 30% を超える虚脱が有意に増加し、完全虚脱も有意に増加した。

結論

今回の検討で特筆すべきは、見尾らがヒト凍結融解胚において報告した '*strand 現象*' と内細胞塊の分離を、マウス胚にて有意に高頻度に観察したことである。これまでに '*strand 現象*' はヒト凍結融解胚の体外培養において、内細胞塊の奇異な挙動と分離に伴って報告され、一卵性双胎の発生機序の 1 つの可能性として示唆されている (Y.Mio, et al. 2014)。

ギャップジャンクション阻害剤の添加培養が胚の発育挙動に与える影響に関する先行報告はない。胚の発育に関するギャップジャンクション機能について様々な知見が報告されているが、今回我々が実施した動的解析から、ギャップジャンクションと内細胞塊の分離、そして胞胚腔虚脱の関連性が示唆された。

発育遅延には多数の原因が挙げられるが、ギャップジャンクションの障害が発育遅延の一因であるとの仮説から、胚のギャップジャンクション機能の改善によって妊娠予後の改善につながる可能性がある。

学位論文(博士一甲)審査結果の要旨

主査: 羽瀨 友則

申請者: 富樫 嘉津恵

論文題名: Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos

(ギャップジャンクション阻害剤はマウス受精胚の内細胞塊の発育挙動に影響し、胚盤胞の虚脱と再膨張を頻回にする)

要旨

晩婚化や女性の社会進出に伴い生殖補助医療は一般化したが、体外受精-胚移植が胚に与える影響・現象に関しては詳細が十分には明らかになっていない。ギャップジャンクションによる割球間の直接連絡は胚発育に影響すると推察されるものの、ギャップジャンクション阻害剤が胚に与える動的影響については結論が出ていない。

本研究では、タイムラプス観察システムを導入することで、胚培養中のギャップジャンクション阻害剤添加が胚発育挙動に与える影響を動的に解析した。

ギャップジャンクション阻害剤として、oleamide と 1-heptanol を用いた。oleamide 培地 (5、10、20、50 μ M)、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観察した。E4.5 (embryonic day 4.5) と E5.5 (embryonic day 5) で比較した。

E5.5 に比較して、E4.5 において、上記のギャップジャンクション阻害剤により embryonic blastocyst 形成は阻害された。Oleamide 投与によって、2nd cleavage から embryonic blastocyst 形成までの時間は有意に延長した (P=0.013)。Oleamide 投与によって、expanded blastocysts の虚脱が頻回に認められた (P=0.0001)。免疫組織学的検討により、Nanog 陽性細胞は inner cell mass に分布していた。

結論として、ギャップジャンクションは、blastocyst 形成、expanded blastocysts の虚脱、inner cell mass の形成に重要な役割を果たすと考えられた。

1) 斬新さ

- ① 世界に先駆けて、タイムラプス観察システムを導入することで、胚培養中のギャップジャンクション阻害剤添加が胚発育挙動に与える影響を動的に解析した。
- ② ギャップジャンクション阻害剤投与によって、**embryonic blastocyst** 形成までの時間が延長すること（阻害）、**embryonic blastocyst** 形成までの時間は有意に延長することを示した。
- ③ ギャップジャンクションは、**blastocyst** 形成、**expanded blastocysts** の虚脱、**inner cell mass** の形成に重要な役割を果たすことを示した。

2) 重要性

胚の発育に関するギャップジャンクション機能について様々な知見が報告されているが、本研究で施行された動的解析から、ギャップジャンクションと **inner cell mass** の分離、そして **expanded blastocysts** の虚脱の関連性が示唆された。

胚の発育遅延には多数の原因が挙げられるが、ギャップジャンクションの障害が発育遅延の一因であるとの仮説から、胚のギャップジャンクション機能の改善によって妊娠予後の改善につながる可能性があり、今後の生殖医療や生殖補助医療に重要な知見を与えた。

3) 研究方法の正確性

本研究は、マウスの胚細胞採取、胚培養、タイムプラス解析、蛍光免疫染色、ヒト **blastocysts** の培養観察、等、標準的で確固とした方法に準じて行われており、正確性や妥当性に問題は無いと判断される。

4) 表現の明瞭さ

抄録、背景、対象と方法、結果、考察、結論、表、図など簡潔で明瞭に記載されている。さらに、すでに学術雑誌に英文論文として掲載受理されており、学位論文として校正、表現など問題ない。

以上、本論文は学位を授与するに十分値する内容と判定された。