

氏 名 ・ (本籍)	下田 勇輝 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第912号
学位授与の日付	平成28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	Time-lapse monitoring reveals that vitrification increases the frequency of contraction during the prehatching stage in mouse embryos (ガラス化凍結操作はマウス胚の前孵化段階での胚収縮の頻度を増加させる)
論文審査委員	(主査) 教授 大森 泰文 (副査) 教授 妹尾 春樹 教授 本山 悟

## 学位論文内容要旨

論文題目：Time-lapse monitoring reveals that vitrification increases the frequency of contraction during the pre-hatching stage in mouse embryos.

(ガラス化凍結操作はマウス胚の前孵化段階での胚収縮の頻度を増加させる)

申請者氏名 下田勇輝

### 研究目的

凍結解凍胚移植は1983年の報告 (Trounson A. et al.) から今日に至るまで、年々健児獲得症例が増え続け、生殖補助医療の中核を成すまでに発展した。近年では複数の胚移植による双胎リスクの軽減目的に、単一胚盤胞移植が推奨され、また、妊娠率の向上のため、複数の解凍胚からより良い胚を選択して移植する方法も一般的に行われるようになった。しかしながら、凍結解凍操作が胚の質に与える影響に関しては十分に解明されていない。

胚評価の観点からはタイムラプスシステムの進歩により、非侵襲的に胚の連続観察が可能となった。観察の難しかった胚発育の過程や胚盤胞収縮などの胚挙動が観察できるようになったため、新たな胚評価方法も提唱され始めている。

今回我々はタイムラプスシステムを用いてマウス胚における胚盤胞期の収縮運動を観察し、ガラス化凍結が与える影響および胚評価への有用性について検討した。

### 研究方法

当施設の動物実験倫理委員会の規則に則り、8-11週齢のC57BL6/J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。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、各回数を記録した。

タイムラプス観察は2細胞期から最長144時間、もしくは解凍から最長120時間を3-5分間隔で行った。この期間に明らかな細胞死や孵化完了が観察された時点で観察を終了した。

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。

得られたデータはSPBSを用いて統計学的に有意差検定を行った。

### 研究成績

胚盤胞到達から孵化開始までの平均時間は新鮮胚群で24.34時間、凍結解凍胚群で26.05時間と有意な差は認めなかった。

新鮮胚群において孵化未開始群で孵化開始群より総収縮、強収縮回数が有意に多く観察され(2.786 vs 2.375, 1.714 vs 0.569)、凍結解凍胚群では強収縮回数が有意に多く観察された(2.333 vs 1.167)。

孵化開始群の中では凍結解凍胚群が総収縮、強収縮、弱収縮回数のすべてにおいて新鮮胚群より有意に多く観察された(3.875 vs 2.375, 1.167 vs 0.569, 2.736 vs 1.806)。他方、孵化未開始群の中では総収縮回数のみが有意に多く観察された(3.722 vs 2.786)。

新鮮胚群、凍結解凍群ともに強収縮がなかった胚はそれぞれ96%、94%が孵化を開始しているのに対し、強収縮を1回でも認めた胚についてはそれぞれ50%、55%のみが孵化を開始した。孵化開始に対する強収縮の存在はオッズ比が23.00、12.85、また、95%信頼区間が5.05-104.80、2.87-57.63となった。

RT-qPCRでは計測したすべてのmRNAの発現量において有意差は認められなかったが、一部の胚において次のような挙動が観察された。Hspa1aおよびMylkは解凍直後に新鮮胚と比べて低発現となり、その後胚盤胞初期に高発現となったのちに徐々に発現が低下した。強収縮が認められた凍結解凍胚群ではAtpla1が高発現となっていた。

### 結論

Cryotop法によるガラス化凍結法は臨床的に胚の保存において非常に有用な方法ではあるが、胚盤胞期の収縮運動を増加させている。胚盤胞の収縮運動、特に強収縮は過去の報告から孵化において負の影響を与えるとされており(Niimura S)、今回の我々の検討でも孵化開始群より孵化未開始群で多く観察されている。

また、強収縮が起こった胚においては新鮮胚、凍結解凍胚の両群で孵化開始率が低いことが確認されたが、強収縮が起こっても、その約半数が孵化を開始できることも確認された。

強収縮の認められた胚の一部でAtpla1のmRNAが高発現であったことは、収縮後の胚の再拡張の際にNa-K ATPaseを介した能動輸送の増加とそれに伴うATP需要が増加していることを示唆していると考えられた。

今回の検討結果により、胚の収縮運動のタイムラプス観察は胚の質評価の一指標としては低侵襲で簡便に行うことのできる有用な手段であることが確認された。今後、臨床的に、胚周囲環境の評価やアシストハッチなどの適応判断などに応用できる可能性がある。

# 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 大森 泰文  
申請者： 下田 勇輝

論文題名：Time-lapse monitoring reveals that vitrification increases the frequency of contraction during the pre-hatching stage in mouse embryos（ガラス化凍結操作はマウス胚の前孵化段階での胚収縮の頻度を増加させる）

## 要旨

凍結解凍胚移植による生殖補助医療は年々増加の一途をたどっている。妊娠率向上のためにも、凍結胚の質的評価が必要であるが、凍結解凍操作が胚の質に与える影響は十分に知られていない。そこで、著者はマウスの新鮮胚と凍結解凍胚を2細胞期から孵化に至るまでタイムラプス撮影により観察し、両胚の挙動を比較した結果、胚盤胞収縮の頻度が凍結胚で有意に高いこと、強収縮を呈した胚の孵化に至る確率は強収縮のない胚に比べて半減することを見出し、胚盤胞収縮の頻度と強収縮の有無が胚の質を評価する指標になりうることを提唱した。さらに、著者は胚成熟の各時期における収縮関連因子の mRNA 量を RT-PCR 法で定量し、強収縮後に *Atp1a1* の発現量が増加することを見出し、強収縮後の再拡張が ATP の枯渇を招き、これにより孵化が完遂できない可能性を示唆した。

本論文の斬新さ、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

凍結解凍胚と新鮮胚の質的差異をその挙動から提示した論文はなく、今回タイムラプス撮影による詳細な観察を行うことで、2細胞期から孵化に至る過程における両胚

の挙動の違いが明確になった。さらに、胚盤胞収縮の程度や頻度を詳細に解析することで、胚盤胞収縮を指標にした胚の質的評価の有用性を初めて示すなど、様々な新規性を包含した論文となっており、斬新性は高いと考えられる。

### 2) 重要性

凍結解凍胚の使用が増加している現状を考えると、その質的評価の必要性は論を待たない。今回、著者が発見した胚盤胞収縮と孵化完遂率の逆相関は、胚の質的評価の指標となり得るものであり、これによる胚の選別は生殖補助医療の成功率を高めるのに寄与するものと思われる。

### 3) 研究方法の正確性

タイムラプス法による観察という、きわめて単純かつ確実な観察法によりデータを得たことにより、主観的要素の全くないデータとなっている。また、照明のノイズ効果を避けるために常時撮影を選択しなかったことも、データの信頼性を保証している。定量的 RT-PCR も定法にしたがって正しく施行している。さらにデータの統計学的解析およびその解釈も正しく行われている。データの信頼性は高いものと考えられる。

### 4) 表現の明瞭さ

研究の背景と目的、研究方法、実験結果の記載と図表の提示方法は簡潔明瞭で理解しやすい。また、考察も論理的に組み立てられているとともに、本研究において解明できなかった点や解釈が困難な点など、今後の課題に関しても丁寧に説明されており、全体として説得力のある表現となっている。

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。