

廃棄される未熟卵/異常受精卵による自己大量細胞質移植によるART治療成績の改善を目指した研究

東北大学病院 産婦人科 志賀 尚美

要 約

卵細胞質は膨大なミトコンドリアを有し、ミトコンドリアは初期胚発生過程のエネルギー産生を担う。高齢難治性不妊はミトコンドリアを含む細胞質の劣化がその一因とされている。そこで、本研究は細胞質機能改善を目的として新規の細胞質移植法である前核期大量細胞質移植法(ProNuclear stage Cytoplasmic Transfer: PNCT)を開発した。新鮮卵におけるPNCTは受精胚の胚発育を改善し、PNCT胚は移植により産仔へと発育、自然交配によってF2を作出できることから次世代の妊孕性も確認した。細胞質機能低下モデルとしての卵管内加齢卵を用いて検討した。卵管内加齢正常受精胚を同一周期に生じた加齢卵由来1PN胚細胞質をドナーとしたautologous PNCT(以下、aPNCTと略す)、新鮮卵由来1PN胚細胞質をドナーとしたheterologous PNCT(以下、hPNCTと略す)で胚発育の改善効果を検討したが効果を認めなかった。しかし、発育したPNCT胚盤胞は有意に高い胚呼吸量とATP量を示し、PNCTによるミトコンドリア機能の補完が考えられた。なお、異常受精胚の胚発生の検討にて、今回ドナー細胞質として用いた1PN胚に比較して3PN胚の胚盤胞率が高率であった。よって今後3PNをドナーとして選択することが効果改善に寄与する可能性が示唆された。PNCTは廃棄される異常受精胚をドナーとするため倫理的に受容されやすく、同個体から得られた正常受精胚と異常受精胚細胞質間でのaPNCTにおいては自己の細胞質を利用するのでミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミーを回避できる。今後3PN胚による追加検討により、PNCTは難治性不妊を克服する新たな治療法となりうる可能性が示された。

緒 言

現在のART治療において晩婚化と高齢難治性不妊の増加が課題である。今までのART治療は良好胚の選別により移植あたりの妊娠率の向上に寄与してきた。しかし良好胚が得られない高齢難治性不妊症例にその恩恵は少なく、生産数の絶対的増加には寄与していない。

卵細胞質は膨大なミトコンドリアを有し、ミトコンドリアは初期胚発生過程のエネルギー産生を担う。加齢に伴う難治性不妊はミトコンドリアを含む細胞質の劣化が一因とされている。申請者の指導医である立花らは、アカゲザルの卵子を用いて、成熟卵(MII期卵)における細胞質置換(Maternal Spindle Transfer: MST)法を開発した¹。MST法はミトコンドリア置換療法(Mitochondrial replacement therapy: MRT)として考慮され、英国では世界初の配偶子系列遺伝子治療として臨床試験が進行中である。MRT法は加齢に起因する細胞質機能の低下を若い健常な卵子の細胞質と置換することで改善する可能性が示唆される一方、他者由来の細胞質はミト

コンドリア遺伝子のヘテロプラスミー(2つ以上の異なるミトコンドリア遺伝子の混在)を生じる。

そこで、本研究においては廃棄される自己の卵子/異常受精卵の細胞質に着目し量的補完により機能改善すると仮説をたてた。そこで体外受精(IVF)周期で廃棄される異常受精胚の細胞質を用いた新規の細胞質移植法を確立し、その有効性と安全性の検証を行うことを目的とした。

方 法

マウス体外受精

東北大学倫理委員会認証(2016医動-302)のもとB6D2F1(BDF1)マウスを用いた。卵子は6-12週齢の♀マウスへのPMSG10IUの腹腔内投与と48時間後のhCG10IUの腹腔内投与の後、15-17週齢で卵管内排卵を確認して採取。卵管内加齢卵においてはhCGの腹腔内投与後、約24時間に卵管内排卵を確認して採取。精子は6~12週齢の♂マウスの精巢上体尾部精子を回収した。卵子前培養、精子前培養、媒精から2細胞期までの培養はTYH培地、2細胞期から胚盤

胞期まではKSOM培地、顕微操作にはM2培地、インキュベーター外のその他の操作にはmHTF、呼吸量測定にはSydney IVF Follicle Flushing Bufferをそれぞれ使用。体外受精は媒精後3時間で顆粒膜細胞をピペッティングにより機械的に除去。前核の判定は媒精後6-8時間に実施。受精後のマウス胚は1.5dpcにて2細胞期の観察を行い、最大4.5dpcまで培養を行って胚盤胞形成を観察した。

胚移植

ICR♀マウスのエストラスを確認して精管結紮♀マウスと同居させ、膣栓を確認した日を1day post-coitus (dpc)とした。2.5dpcに胚盤胞到達胚をICR♀マウスの子宮へ移植した。

前核期大量細胞質移植法 (pronuclear phase cytoplasmic transfer :PNCT)

IVF後前核期に観察し正常受精胚(2前核：2PN)と異常受精胚(1前核：1PN、3前核：3PN)に分類。2PN胚は極体の融合を防止するため、5ug/ml濃度のサイトカラシンB(CB)存在下で極体除去を行った。1PN、3PN胚からは、10ug/ml濃度のCB存在下で極体と前核を全て除去した細胞質体(Cytoplasm)を作成。約1/3-1/2の異常受精胚細胞質体を不活化センダイウイルスエベロープ(HVJ-E)へ短時間暴露

した後、正常受精胚の围卵腔へ移植することで細胞膜融合を誘導した。

ATP測定

胚盤胞到達胚はルシフェラーゼ発光法を用いたATP測定キットにてルミノメーターで測定した。測定値はスタンダードサンプルを用いた絶対定量値とした(nM)。

胚呼吸量測定

胚呼吸量測定装置は当科が開発したChip-sensing Embryo Respiration Monitoring system (CERMs)を使用(Kurosawa et al., Hum Reprod 2016)。胚盤胞到達胚を測定用プレートに静置し、自動化された測定プログラムによって溶存酸素勾配を計算し酸素消費量を算出した(fmol/s)。

結果

マウス前核期大量細胞質移植法(pronuclear phase cytoplasmic transfer :PNCT)の確立

媒精後6時間で前核の観察によって2PN胚と1、3PN胚を判別し、1、3PN胚をドナーとした移植法の確立を行なった。なお、同個体から得られた正常受精胚と異常受精胚細胞質間でのPNCTをaPNCT、異なる個体間におけるPNCTをhPNCTとした。内

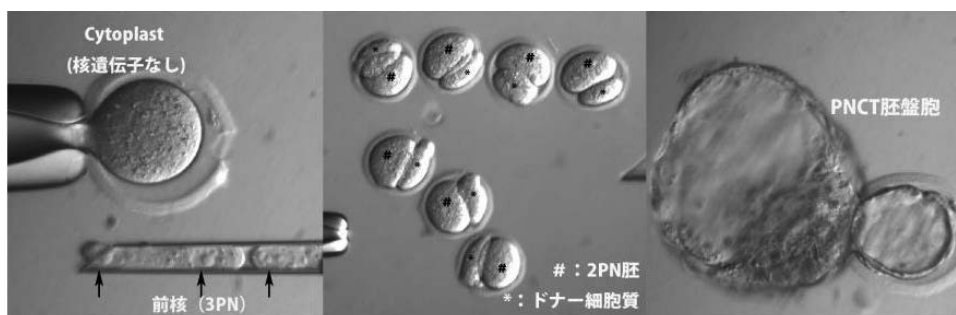


図1. 2段階操作によるPNCTとPNCT胚盤胞

(左) は小径ピペットによる極体と3PNの除核による核遺伝子Freeの細胞質体 (Cytoplasm) の作成を示す。(中央) は大径ピペットによる2PN胚围卵腔への大量のCytoplasmの移植直後を示す。15分後にはHVJ-Eの細胞膜融合によって細胞質は融合し、一つの巨大な2PN胚となる。(右) PNCT後に発育した孵化期胚盤胞を示す。

径15μmのピペットによる異常受精胚からの極体と前核の除去と正常受精胚からの極体の除去(HVJ-Eによる極体の再融合を予防するため)を行い、次に内径30μmのピペットによる大量の細胞質移植をおこなうという2段階操作を確立した(図1)。

新鮮受精卵(胚)におけるPNCTの効果

確立した2段階法を用いて新鮮胚(通常IVF胚)の検討を行なった。対照群64個とPNCT群93個における検討で、胚盤胞率(胚盤胞/2細胞)はそれぞれ76.2%、94.6%(p=0.032)とPNCT胚において有意に高かった(表1-A)。

表1-A. 新鮮受精卵におけるaPNCT

	Replication #	# of 2PN used	2-cell (%)	Blastocyst (%)
Control	8	58	42 (72.4)	32 (76.2)
Fresh aPNCT	8	93	74 (79.6)	70 (94.6)*

* 統計学的に有意差あり (p<0.05)

表1-B. 加齢卵モデルにおけるPNCT

	Rep #	Recipient	Donor	# of 2PN used	2-cell (%)	Blastocyst (%)
Aged Control	9	Aged 2PN	NA	183	169 (97.7)	82 (48.5)*
aPNCT	10	Aged 2PN	Aged 1PN	167	74 (79.6)	58 (43.6)*
hPNCT	9	Aged 2PN	Fresh 3PN	129	113(87.6)	46(40.7)*

* 全て統計学的に有意差なしns (p>0.05)

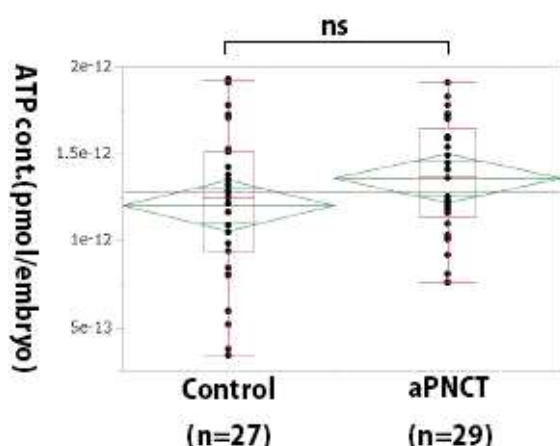


図2. ATP定量(fresh aPNCT)

PNCT胚の着床後発生、産仔の妊孕性、ATP産生

胚盤胞到達aPNCT胚を同期したICRマウス子宮へ移植した。左右の卵管に6個のaPNCT胚盤胞を移植し、2匹の健全な産仔(♂1匹、♀1匹)を獲得した。3週後に母獣より隔離し、自然交配にてF2産仔の出産を確認した。胚盤胞到達aPNCT胚のATP産生を測定し対照群とPNCT胚において胚当たりのATP含量はそれぞれ 1.20 ± 0.073 pmol/embryoと 1.36 ± 0.07 pmol/embryoであり、有意差は認めないものの高い傾向を認めた(図2)。

加齢卵子モデルにおけるPNCT

次に加齢卵子モデルによるPNCTの効果を検討した。加齢卵子モデルとして排卵後卵管内加齢卵子モデルを用いた。まず、卵管内加齢卵子を用いたIVFを行ったところ、加齢卵子正常受精胚(2PN)の胚盤胞率は48.5%と新鮮胚(通常IVF胚)の76.2%と比較して有意に低かった(P=0.0285)。そこで、卵

管内加齢卵子を用いたIVFにおいて異常受精胚細胞質をドナーとするaPNCTを10周期167個の加齢卵2PN胚に対して行った。卵管内加齢卵の1PN胚でのaPNCTによる2細胞率は79.6%(133/167)、胚盤胞到達率は43.6%(58/133)でありaPNCTによる胚発生の改善効果は認めなかった(p>0.05)。新鮮胚の1PN胚をドナーとしたhPNCTにおいても2細胞率は87.6%(113/129)、胚盤胞率は40.7%(46/113)といずれも改善効果を認めなかった(p>0.05)(表1-B)。

加齢卵モデルにおけるaPNCTによる胚呼吸量とATP含量

胚盤胞到達胚の質を検証する目的で、胚盤胞において呼吸量とATP含量を検証した。ATP含量は加齢卵2PN胚由来の胚盤胞と加齢卵3PN胚由来aPNCT胚盤胞における胚当たりのATP含量はそれぞれ 1.17 ± 0.061 pmol/embryoと 1.33 ± 0.072 pmol/embryoであり、加齢卵aPNCT胚盤胞において有意に高かった(p=0.0461)(図3-A)。胚盤胞当たりの胚呼吸量は加齢卵子2PN胚由来の胚盤胞と加齢卵aPNCT胚盤胞においてそれぞれ 3.33 ± 0.79 fmol/sと 4.96 ± 3.62 fmol/sであり、加齢卵aPNCT胚において有意に高かった(p=0.0258)(図3-B)。

考察

本研究において細胞質機能改善を目的として新規の細胞質移植法である前核期大量細胞質移植法(ProNuclear stage Cytoplasmic Transfer: PNCT)を開発した。臨床において異常受精胚は一定の割合で存在し培養を継続すると胚盤胞へ到達することが

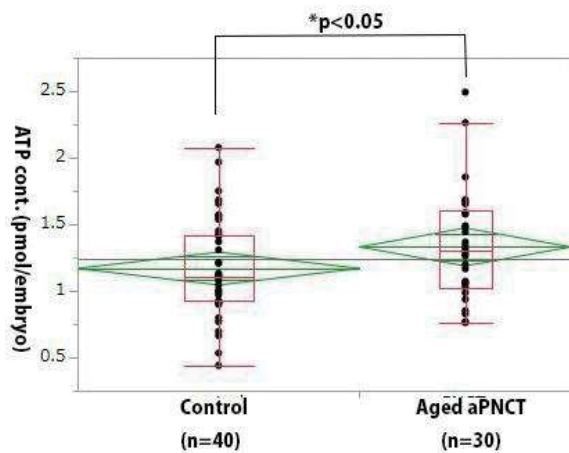


図3-A. ATP定量(aged aPNCT)

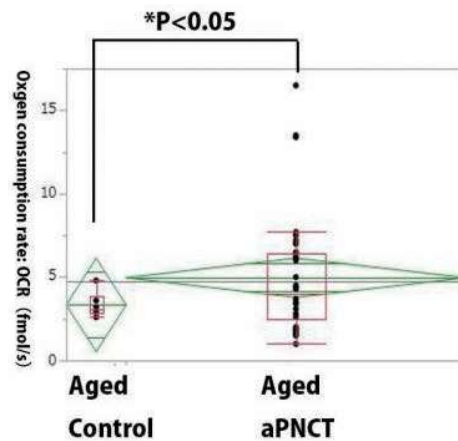


図3-B. 胚呼吸量(aged aPNCT)

ある。つまり、核の倍数性の異常と細胞質機能は必ずしも一致せず、これら異常受精胚の細胞質も胚発生をサポートする機能(ミトコンドリア機能)を有していると考えられる。このことから、廃棄される異常受精胚の細胞質を量的補完源として利用する着想に至った。

新鮮卵におけるPNCTは受精卵の胚発育を改善することが明らかとなり、PNCT胚は移植により産仔へと発育し、自然交配によってF2を作出できることから次世代の妊孕性も問題ないと考えられた。この技術の応用目的は加齢による細胞質機能低下を改善することであることから卵管内加齢モデルを用いた検討を行なった。卵管内加齢卵は新鮮卵に比して受精率が低く、受精後の胚盤胞率も低率である。今回卵管内加齢正常受精胚に対して1PN胚をドナーとしたaPNCT(加齢卵由来)およびhPNCT(新鮮卵由来)において、胚盤胞におけるミトコンドリア機能の補完は認めるものの、胚発育を改善するには至らなかった。胚操作を行わない新鮮卵の異常受精胚の胚発育は3PN(66.6%)が2PN胚(70.0%)と遜色なく、いずれも1PN胚(6.7%)より有意に胚盤胞率が高率であった($P<0.05$)。1PN胚がMaturation promoting factor (MPF)低下による単為発生であるのに対し、3PN胚の場合には精子が導入するSperm factorによって十分な細胞質の活性化が得られる。細胞質機能の補完にはミトコンドリアの量的質的補完以外に、この精子による卵細胞質活性化の違いが1PN胚と比較して2PNと3PN胚の胚盤胞到達率が高くなる要因と考えられる。よって、PNCTのドナーとしては3PN胚を用いた検証が望まれる。

本研究では、PNCTによる廃棄される受精卵を用

いた新たな生殖補助医療技術の可能性を示した。特にaPNCTは自己の細胞質であることからミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミー回避につながるためより好ましいが、若いカップルに生じた異常受精卵細胞質の供与を受けるhPNCTでも新規の採卵や受精卵の破壊を伴わずより倫理的な手技であると思われる。今後の3PN胚による検討により胚盤胞率の改善が得られれば、本法は難治性不妊症を克服する新規治療法として期待される。

参考文献

1. Tachibana, M. et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461, 367-372, doi:nature08368 [pii]10.1038/nature08368 (2009).

Abstract

The deterioration of cytoplasm including mitochondria is one of the reasons for infertility due to advanced age. In this study, we developed a novel cytoplasmic transfer method, ProNuclear stage Cytoplasmic Transfer (PNCT), to improve cytoplasmic function. PNCT is ethically acceptable because it exploits discarded abnormally fertilized embryos as donors. Further, autologous PCNT (aPNCT) between normal and abnormal fertilized embryos obtained from the same individual avoids issue of mitochondrial DNA mixture (i.e., heteroplasmy). Initial PNCT with fresh 2PN eggs showed significantly improved blastocyst development compared to non-manipulated controls, and PNCT embryos yielded fertile offspring. Next, we examined whether PNCT could improve the cytoplasmic dysfunction of postovulatory aged eggs using either aged autologous 1PN (aPNCT) or fresh 1PN cytoplasm (heterologous PNCT: hPNCT). While developed aPNCT blastocyst exhibited higher ATP content and respiratory function compared to controls, the fertilization rate and blastocyst rate did not improve by aPNCT nor hPNCT. However, developmental competence of abnormally fertilized non-manipulated embryos showed that 3PN embryos were comparable to 2PN embryos, whereas 1PN was lower than that of 2PN and 3PN. Thus, it is speculated that 3PN embryos may be more suitable as a cytoplasm donor in PNCT. While further study using 3PN embryos is needed, PNCT may have potential benefit for patient with recurrent IVF failure due to cytoplasmic deficiency.