

# ライブセルイメージングを用いたヒト胚初期分裂のフラグメント形成機構の解明

Central spindle instability drives fragmentation in human embryos

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 機能展開医学系 産婦人科学講座 小野 有紀

## 要約

体外受精におけるヒト胚の細胞質フラグメントは、受精後の第一体細胞分裂で頻繁に観察される。胚盤胞到達率低下や染色体異常との関連が報告される一方、その発生メカニズムは未だ不明である。本研究では、研究用に提供されたヒト2前核期胚を用い、DNA・微小管・アクチンを化学蛍光プローブで標識し、遺伝子操作を必要としない非侵襲ライブイメージングにより、中央紡錘体の挙動とフラグメント形成の関係を定量化した。第1分裂では中央紡錘体の「分裂面での固定（アンカリング）」が不安定な胚が多く、分裂溝の陥入部位が中央紡錘体軸から逸脱する（溝-中央紡錘体ミスアラインメント距離  $d$  が増大）ほど、フラグメントが増加した。また中央紡錘体の総移動距離が大きい胚ほど、中央紡錘体のミッドボディ形成に向けた凝集（コンパクション）が遅延し、重度のフラグメントを形成する傾向を認めた。さらに、第1分裂では複数の収縮環（アクチン環）形成や収縮環形成の起点となるシグナルタンパクである RhoA の局在が赤道面に限局しない所見がみられ、中央紡錘体由来の空間的なシグナル制御不全が示唆された。対照的に第2分裂では中央紡錘体は安定化し、コンパクションは早く、フラグメント形成の頻度が低く、単一の収縮環を形成する傾向にあった。以上の知見は、正確な細胞質分裂における中央紡錘体の安定した固定の重要性を強調するものである。本研究は、中央紡錘体由来のシグナル伝達とフラグメント形成の機序を解明するとともに、ヒト胚第1分裂特有の分子的脆弱性が初期発生に及ぼす影響について重要な洞察を与える。

## 緒言

ヒトの初期胚発生は、さまざまな分裂エラーが生じやすい過程であり<sup>1</sup>、その中でも細胞質フラグメント（fragmentation）の形成は最も顕著な特徴の一つである<sup>2</sup>。フラグメントとは、割球間に生じる核を持たない細胞質の断片であり、重度のフラグメント形成を伴う胚は、胚盤胞到達率や発育能が低下し、異数性のリスクが増大することが報告されている<sup>3</sup>。このため、臨床上の不妊治療における胚移植の際には、重度のフラグメントは胚選択マーカーとして広く利用されている。しかし、この現象がヒト胚の細胞分裂過程においてどのような細胞学的・分子学的メカニズムで発生するのかについては、未だ不明な点が多い。

タイムラプスインキュベーターを用いた観察では、フラグメントは細胞質分裂時の分裂溝に沿って、あるいは透明帯と細胞膜の間の perivitelline threads (PTs) 付近から発生することが示唆されている<sup>4</sup>。

しかし、PTs を除去した胚でもフラグメントが生じることから、胚内部の固有のメカニズムの関与が疑われてきた。近年のマウス胚を用いた研究では、紡錘体の固定（アンカリング）不全がアクトミオシン皮質の異所的な収縮を誘発し、フラグメント形成を促進することが示唆されている。ヒト胚においても同様の機序が働いているかを検証するためには、生きた胚の内部構造を可視化するライブイメージングが不可欠であるが、研究に供されるヒト受精卵の希少性から、こうした詳細な解析は限定的であった。

我々はこれまでに、化学蛍光プローブを用いてヒト胚のDNAと微小管を非侵襲的に可視化する手法を開発してきた<sup>5</sup>。この手法により、第1分裂時における紡錘体形態の不均一性が多核化と関連していることを明らかにしたが、同時に染色体分離時に形成される「中央紡錘体（central spindle）」の動態にも大きなバリエーションがあることを観察した。中央紡錘体は、細胞質分裂を駆動するシグナル分子

(RhoA など) を集積させる重要なプラットフォームであり、最終的にはミッドボディへとコンパクション (凝集) して細胞分離を完了させる。本研究では、ヒト第1分裂における中央紡錘体の不安定な固定が細胞質分裂シグナルを乱し、異所的な分裂溝や複数の収縮環形成を介してフラグメントを引き起こすという仮説を立て、その定量的検証を試みた。

## 方法

### 1. 倫理的配慮および胚の準備

本研究は秋田大学 (承認番号1090-2)、日本産科婦人科学会 (登録番号75)、浅田レディースクリニック (承認番号2022-13) の承認を得て、文書同意のもと実施した。動物実験は秋田大学の承認 (a-1-0409) に基づいた。研究に使用されたヒト胚は、不妊治療の結果不要となり、患者の自由意思による書面同意を経て研究用に提供された廃棄予定の2前核期 (2PN) 胚である。対照群として、マウス (ICR系およびB6D2F1系) から得られた2PN胚を用いた。

### 2. 非侵襲的ライブイメージング

ヒトおよびマウス胚のDNA、微小管、アクチンを可視化するため、化学蛍光プローブ (SPY505-DNA、SPY650-tubulin、SPY555-actin) を用いた標識を行った。これらのプローブは遺伝子操作を必要とせず、胚への毒性が極めて低い。標識後の胚は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM980, Zeiss) を用い、10分間隔で撮影した。

### 3. 画像解析と定量的評価

フラグメントの程度は、明視野画像から胚全体に対するフラグメント領域の面積比 (%) として算出した。また、中央紡錘体の動態を解析するため、Imarisソフトウェアを用いて中央紡錘体の中心点を3Dトラッキングし、分裂溝形成開始からミッドボディ形成 (コンパクション) までの総移動距離と所要時間を測定した。さらに、分裂溝の陥入部位と中央紡錘体軸とのズレを「ミスアラインメント距離・ $d$  ( $\mu\text{m}$ )」として定義した。ミスアラインメント距離 $d$ は、中央紡錘体の中点から分裂溝を結ぶ直線への垂線の長さとして算出した (図1c)。アクチン環の数についても、定義されたスコアリング基準に従って計測した。

### 4. 免疫染色

細胞質分裂の主要な制御因子であるRhoAの局在を評価するため、固定した胚に対して抗RhoA抗体

および抗 $\alpha$ -tubulin抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した。

## 結果

### 1. 分裂溝のミスアラインメントとフラグメント形成の相関

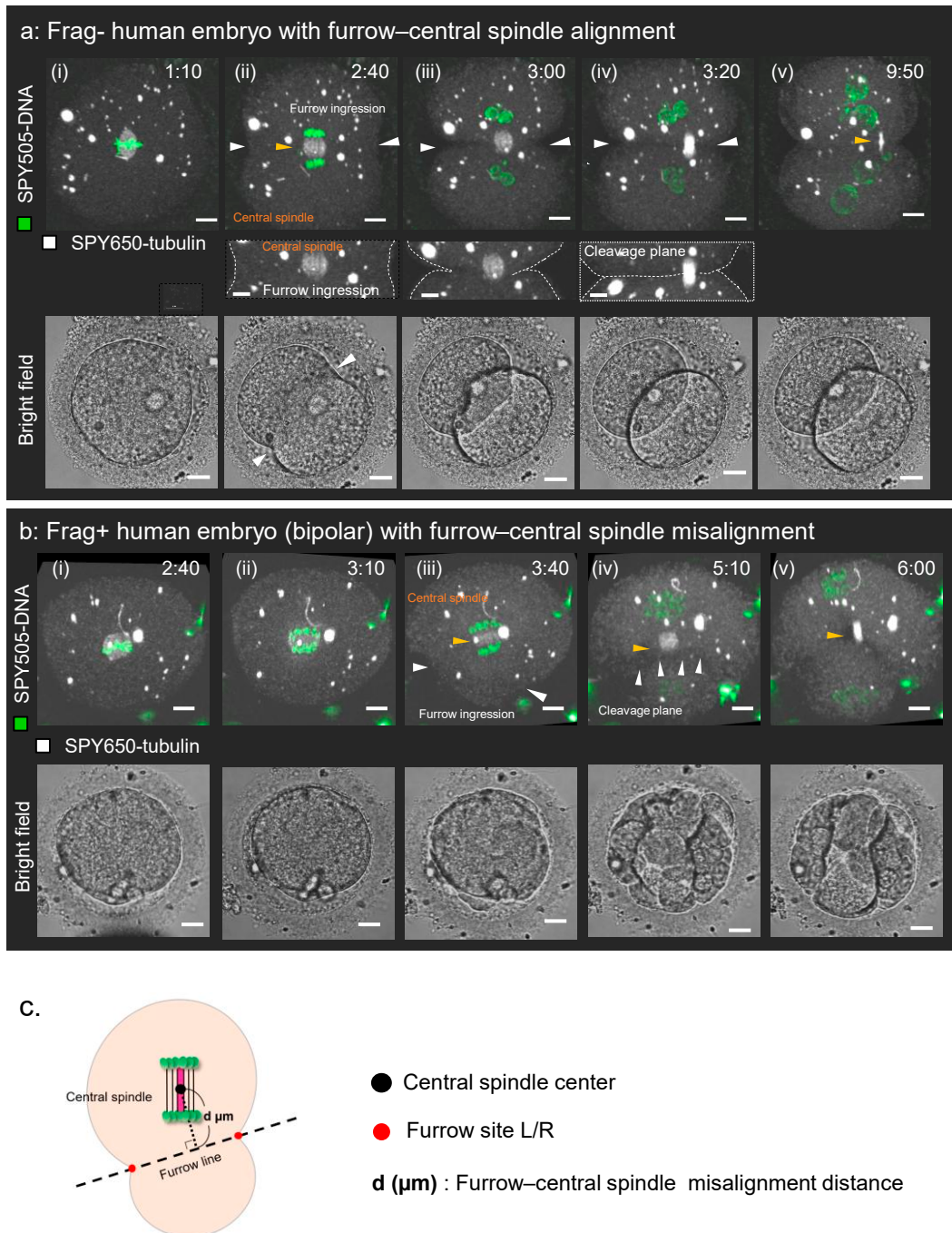
マウス胚では、第1分裂において分裂溝は中央紡錘体に対して常に対称的に形成され、フラグメントは全く観察されなかった。一方、ヒト胚では第1分裂時に高頻度で重度のフラグメント形成が認められた。正常に近い胚 (Frag-) では、中央紡錘体と分裂溝が協調して配置されていたが (図1a)、重度のフラグメントを伴う胚 (Frag+) では、分裂溝が中央紡錘体から側方に大きくずれた位置で陥入する現象が観察された (図1b)。解析の結果、ミスアラインメント距離 $d$ が増大するほど、フラグメント面積比が有意に増加する正の相関が認められた (図2a: Spearman's  $\rho = 0.589$ ,  $P < 0.001$ )。この関係は、紡錘体が二極性であるか多極性であるかに関わらず一貫して認められた。

### 2. 中央紡錘体の不安定性とコンパクションの遅延

中央紡錘体のトラッキング解析により、ヒト胚の第1分裂ではマウス胚と比較して中央紡錘体の移動距離が有意に長く、固定が不安定であることが判明した (中央値: 30.65 vs 8.60  $\mu\text{m}$ )。また、中央紡錘体がミッドボディへと凝集する「コンパクション」までの時間も、ヒト胚では有意に延長していた (中央値: 60 vs 37.5 min)。フラグメント面積比とこれら中央紡錘体の動態パラメータの間には強い相関があり、総移動距離が大きい胚ほど (図2b: Spearman's  $\rho = 0.562$ ,  $P = 0.010$ )、またコンパクションまでの時間が長い胚ほど (図2c: Spearman's  $\rho = 0.632$ ,  $P = 0.0028$ )、形成されるフラグメントが重度であった。これは、中央紡錘体の不安定性が細胞質分裂の進行を停滞させ、フラグメント形成を誘発していることを示唆している。

### 3. 第1分裂と第2分裂における動態の差異

興味深いことに、フラグメント形成の脆弱性は第1分裂に特異的であった。透明帯を除去して詳細に観察したところ、第1分裂で重度のフラグメントが生じた胚であっても、続く第2分裂では新たなフラグメントの形成は稀であった (図3a,b)。ライブイメージング解析でも、第2分裂時の中央紡錘体は第1分裂時よりも安定しており、コンパクションまでの時間も有



**図1 第1分裂における分裂溝—中心紡錘体の整列とミスアラインメント (Frag–/Frag+の比較)**  
 SPY505-DNAおよびSPY650-tubulinによるライブイメージング (上段) と明視野像 (下段) で、ヒト胚第1分裂の細胞質分裂を示す。a : Frag–胚では分裂溝の陥入部位が中心紡錘体に整列し、cleavage planeに沿って対称的に進行する。b : Frag+胚 (bipolar) では分裂溝の陥入が中心紡錘体軸から側方にずれ (misalignment)、陥入の位置異常を伴ってフラグメント形成が増大する。c : 分裂溝の左右陥入点 (Furrow site L/R) と中心紡錘体中心 (Central spindle center) から、\*\*分裂溝—中心紡錘体ミスアラインメント距離 d(μm)\*\*を定義する。

意に短縮していた (図3b 中央値: 35.0 vs 60.0 min)。このことから、ヒト胚は発生が進むにつれて細胞分裂機構を成熟させ、フラグメント形成に対する耐性を獲得していくことが示唆された。

#### 4. 複数の収縮環と RhoA の局在不全

細胞質分裂の分子メカニズムを解明するためアク

チン環の動態を解析したところ、マウス胚やヒトの第2分裂では単一の収縮環が形成されるのに対し、ヒトの第1分裂では複数のアクチン環が異所的に形成される例が頻繁に観察された (図4)。さらに、収縮環形成の上流シグナルである RhoA の局在を調べた結果、マウス胚やヒト第2分裂では RhoA が赤道面の皮

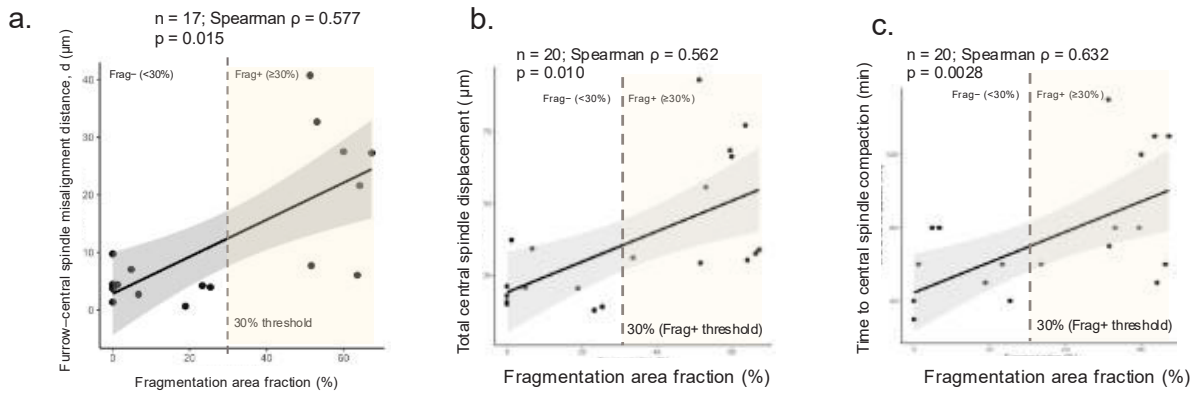


図2 フラグメント量は (i) 溝—中心紡錘体ミスアラインメント (d)、(ii) 中心紡錘体移動量、(iii) 中心紡錘体コンパクション遅延と相関する

フラグメント面積割合 (Fragmentation area fraction, %) と、細胞質分裂関連パラメータの相関解析。a: フラグメント量と溝—中心紡錘体ミスアラインメント距離 d(μm) の関係。b: フラグメント量と中心紡錘体総移動距離 (Total central spindle displacement, μm) の関係。c: フラグメント量と中心紡錘体コンパクションまでの時間 (Time to central spindle compaction, min) の関係。回帰線と信頼帯を表示し、破線はFrag+判定に用いた閾値 (30%) を示す (図中にSpearmanのρとp値を表示)。

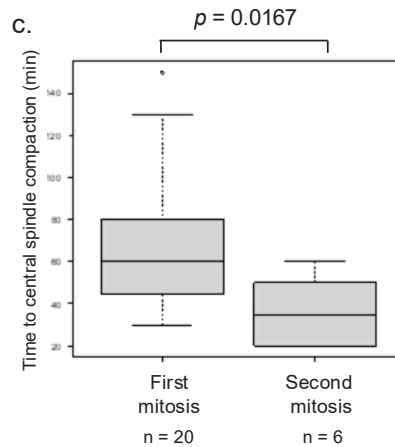
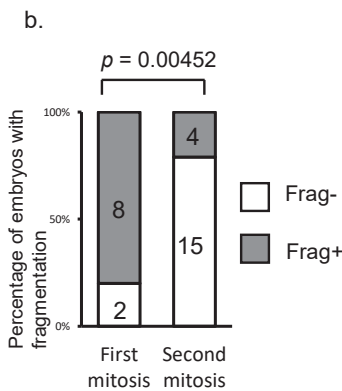
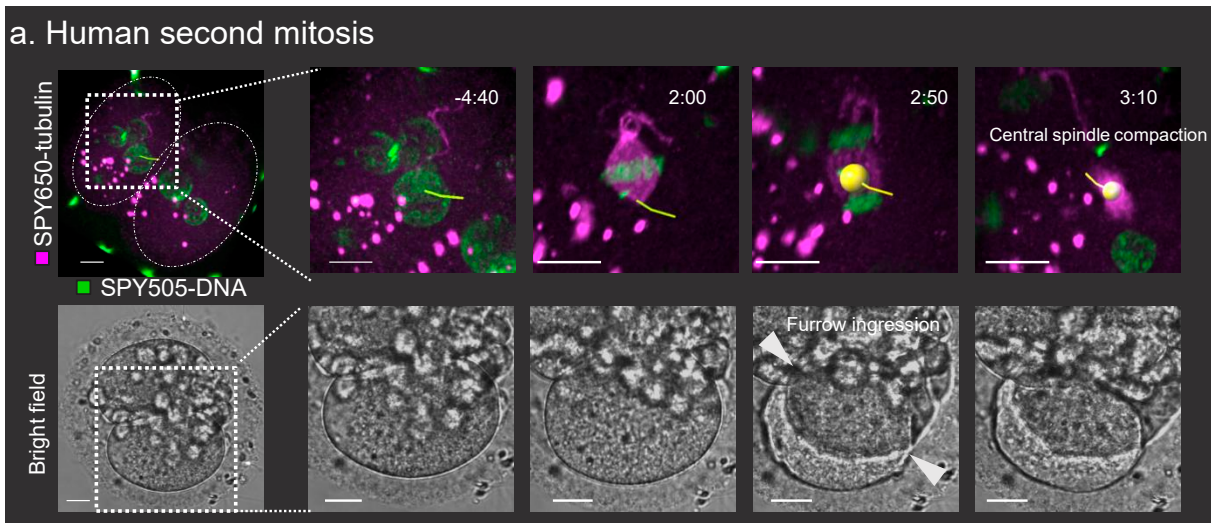
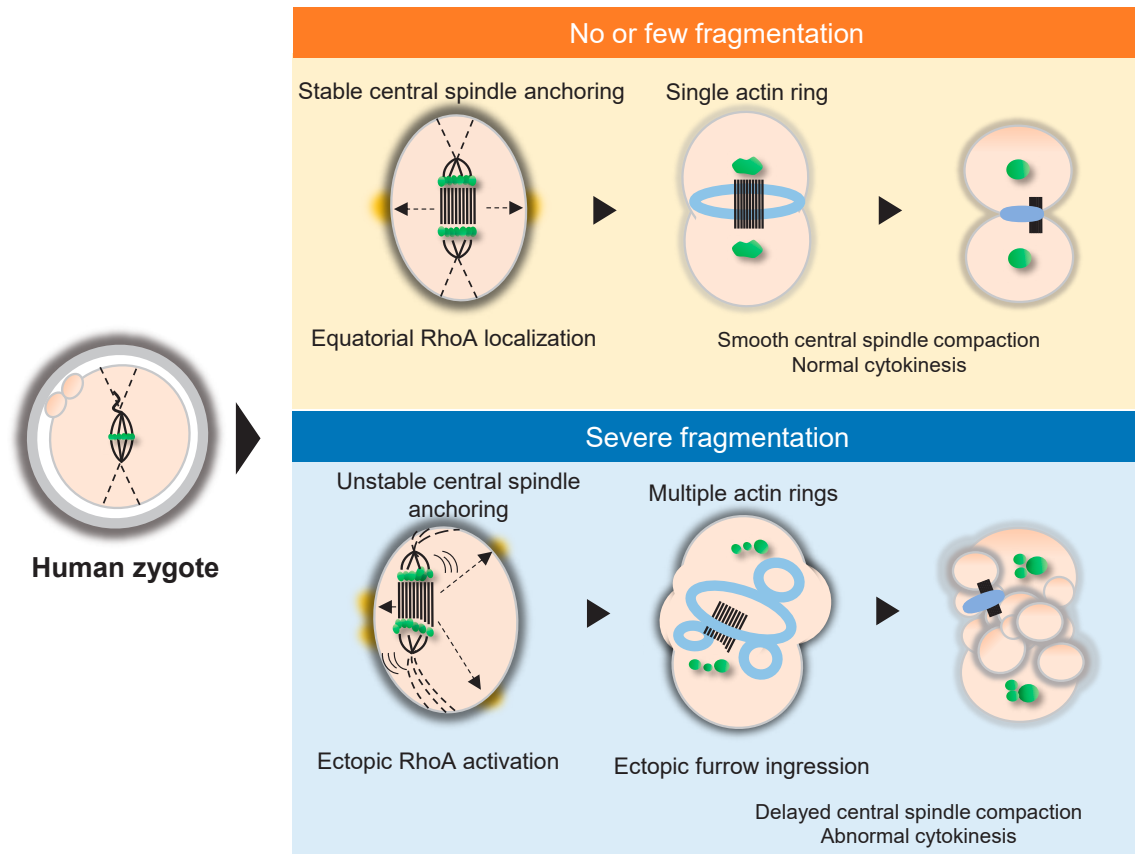


図3 第2分裂ではフラグメント形成が減少し、中心紡錘体コンパクションが早期化する

a: ヒト胚第2分裂のライブイメージング (DNA / tubulin) と明視野像。分裂溝陥入 (Furrow ingression) と中心紡錘体コンパクション (Central spindle compaction) の進行を示す。画像内に中心紡錘体をトラッキングした線を示す。b: 第1分裂と第2分裂におけるフラグメント形成胚の割合の比較。c: 中心紡錘体コンパクションまでの時間 (min) の比較 (第1分裂 vs 第2分裂)。第2分裂では中心紡錘体の不安定性が改善し、フラグメント形成が抑制されることを示唆する。



**図4 仮説モデル：中心紡錘体アンカリング不全が異所性収縮を介してフラグメントを誘発する**  
 中心紡錘体アンカリングの安定性が、ヒト胚第1分裂における細胞質分裂の成否とフラグメント重症度を規定するというモデル。上段 (No or few fragmentation)：中心紡錘体が安定に固定されると、RhoA活性が赤道面に局在し、単一のアクチン収縮環形成と円滑な中心紡錘体コンパクションを伴う正常細胞質分裂が成立する。下段 (Severe fragmentation)：中心紡錘体アンカリングが不安定な場合、RhoAの異所性活性化と複数収縮環形成、異所性の分裂溝陥入、中心紡錘体コンパクション遅延が生じ、異常細胞質分裂と重度フラグメント形成につながる。

質に単一のバンドとして集積するのに対し、ヒト第1分裂ではRhoAの集積が赤道面に限定されず、複数の異所的なスポットとして局在していた (図4)。このRhoAの空間制御不全が、不適切な分裂溝の形成とそれに続くフラグメント化の直接的な原因である可能性が資された。

#### 考 察

本研究の結果、ヒト第1分裂における中央紡錘体のアンカリング不安定性が細胞質フラグメントと強い関連があることが明らかになった (図4)。中央紡錘体は細胞質分裂シグナルのプラットフォームとして機能するが、ヒトの第1分裂においてはこの固定が脆弱である。その結果、本来赤道面に集中すべきRhoAシグナルが広範囲に拡散あるいは異所的に局在し、不適切なアクチン収縮を引き起こすことで、細胞質が断片化されると考えられる。

この中央紡錘体の不安定性の背景には、いくつかの要因が推測される。第一に、中心体の機能不全で

ある。中心体は紡錘体のアンカリングに重要な役割をもつ星状微小管の起点となることが知られている。ヒト胚は精子由来の中心体を継承するが、第1分裂においては中心体周囲物質 (PCM) の断片化などが生じやすいことが知られており、これが中央紡錘体の安定的な支持を妨げている可能性がある。第二に、細胞皮質の機械的特性の影響である。ヒト胚はマウス胚と比較して高い皮質張力を持つことが報告されており、異所的なRhoAシグナルに対して皮質がより敏感に反応し、収縮が生じやすい状態にあると考えられる。また、第2分裂において分裂機構が安定化する現象は、母性因子から胚性因子への制御の移行 (Oocyte-to-Embryo Transition) に伴う細胞分裂コンポーネントの成熟を反映している可能性がある。例えば、胚性ゲノムの活性化に伴い、中央紡錘体を安定化させる因子 (PRC1やEct2など) の発現や局在が最適化されることが考えられる。

本研究の限界として、供与胚の数が限られていたことや、詳細な遺伝学的背景の把握が困難であった

ことが挙げられる。また、ライブイメージングに用いた蛍光プローブが微小管動態に微細な影響を与えている可能性も完全には否定できない。しかしながら、非侵襲的な手法によりヒト胚特有の物理的脆弱性を定量的に示した点において、本研究の意義は大きい。

結論として、正確な細胞質分裂を完遂するためには、中央紡錘体の安定した固定が不可欠である。本研究で見出された中央紡錘体由来のシグナル伝達と細胞質フラグメント形成の機序は、ヒト初期胚発生における脆弱性の分子基盤を明らかにするものであり、将来的には胚評価の精度向上や、フラグメント形成を抑制する新たな培養技術の開発に寄与することが期待される。

## Abstract

Severe cell fragmentation characterizes early human development, predicting poor blastocyst formation and aneuploidy. Despite its clinical significance in assisted reproductive technology (ART), the mitotic mechanisms triggering fragmentation during the first zygotic division remain poorly understood. We used non-invasive live-cell imaging of DNA, microtubules, and actin in donated human two-pronuclear (2PN) embryos to investigate whether central spindle dynamics drive fragmentation. We demonstrate that central spindle anchoring is frequently unstable during the first mitosis in human embryos, unlike in mouse embryos. This instability leads to a spatial misalignment between the central spindle and the cleavage furrow. A larger misalignment distance was significantly correlated with increased fragmentation area fractions. Furthermore, embryos exhibiting severe fragmentation showed a marked delay in the transition from the central spindle to the midbody (compaction) and a greater total displacement of the central spindle. Live-cell imaging and immunofluorescence revealed that this instability is associated with the formation of multiple ectopic contractile actin rings and the mislocalization of RhoA, the upstream regulator of cytokinesis, which failed to confine to the equatorial cortex. Notably, these cytokinetic defects were predominantly confined to the first mitosis; by the second mitosis, central spindle stability improved, a single contractile ring was formed, and fragmentation was significantly reduced. Our findings establish that defective central spindle anchoring and subsequent signaling dysregulation are primary drivers of fragmentation in human zygotes. This study provides fundamental insights into the molecular vulnerabilities of the first human mitosis, offering a mechanical framework to improve embryo assessment and IVF outcomes.

## 引用文献

1. Currie CE, Ford E, Whyte LB, et al. The first mitotic division of human embryos is highly error prone. *Nat Commun* 2022; 13: 6755.
2. Yazdani A, Halvaei I, Boniface C, et al. Effect of cytoplasmic fragmentation on embryo development, quality, and pregnancy outcome: a systematic review of the literature. *Reprod Biol Endocrinol* 2024; 22: 55.
3. Chavez SL, Loewke KE, Han J, et al. Dynamic blastomere cytokinesis and karyokinesis predict human embryo developmental capacity to the blastocyst stage. *Nat Commun* 2012; 3: 702.
4. Pelzer D, de Plater L, Bradbury P, et al. Cell fragmentation in mouse preimplantation embryos induced by ectopic activation of the polar body extrusion pathway. *EMBO J* 2023; 42: e112024.
5. Ono Y, Shirasawa H, Takahashi K, et al. Shape of the first mitotic spindles impacts multinucleation in human embryos. *Nat Commun* 2024; 15: 5381.