

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 河野博臣(東京都) |
| 学位の種類 | 博士(学術) |
| 学位記番号 | 甲第79号 |
| 学位授与年月日 | 令和3年3月31日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第3条第2項該当 |
| 学位論文題名 | ヒト giant oocyte のマイクロマニピュレーションおよび 次世代シーケンス法による染色体解析に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 柏崎直巳 (副査) 伊藤潤哉 坂上元栄 |

論文内容の要旨

【序論】ヒト生殖補助医療 (assisted reproductive technology: ART) は、不妊症に対する治療、癌治療後の妊孕性保全などの目的で、医療介在によって生殖活動を補助するものである。ヒト ART では卵巣からの卵採取が重要であるが、ごく稀に採卵時に通常の卵母細胞よりも直径が大きな「giant oocytes: GOs」が採取されることがある。この GOs の多くは 2 倍体で、受精させても染色体の数的異常胚を形成する。GOs が採卵される確率は 0.12 から 0.3% であり、卵巣刺激法や患者の体質に依存しないと考えられている。GOs は、通常の卵母細胞と同じ受精能を示す。また、GOs は MII 期に達した際、極体 (polar body: PB) 2 個および chromosome-spindle complex (CSC) 2 個を有するものと、PB1 個および CSC1 個を有するものが存在する。GOs は受精後のその初期胚の染色体構成に異数性が生じることが報告されているが、その詳細については不明な点が多い。成熟卵母細胞の PB は減数分裂の産物で、染色体構成は CSC と相同であることから、GOs の PB の染色体解析ができれば、対応する GO の細胞質内の染色体も間接的に解析でき、受精およびその後の初期胚発生に有用な情報となりうる。染色体解析法については、染色体標本作製し、特殊な染色を施す従来法でない次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) 法による解析が最近開発され、胚の着床前診断にも適用されている。

本研究はヒト GOs における染色体解析を目的に、GOs の PB および CSC を個々にサンプリングするためのマイクロマニピュレーション法を開発し、ヒト GOs へ適用して採取ゲノムサンプルの NGS 法による染色体解析を試みた。

第一章 マウス MII 期卵母細胞における polar body (PB) および metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) のマイクロマニピュレーションおよび次世代シーケンス法を用いた染色体解析

【目的】 卵母細胞における PB ゲノムおよび CSC ゲノムの正確なサンプリング技術は、本研究に非常に重要である。同一卵母細胞質内に CSC が 2 つ存在し、かつそれぞれの CSCs の近傍に対応する PBs を有する GO の染色体解析には、マイクロマニピュレーションを用いた PB および CSC のサンプリングが適していると考えられる。本章では、マウス卵母細胞を用いて PB および CSC を採取し、NGS 法による染色体数の解析を試みた。

【方法】 超低温保存マウス未受精卵を購入し、その加温卵の PB および CSC を、倒立顕微鏡下のマイクロマニピュレーションにより採取して、染色体解析に適用しうる状態で採取できるか検討した。すなわち、PB の近傍の透明帯をレーザーにて穿孔し、PB をガラスピペットで吸引採取してサンプルチューブへ移して凍結保存した。続けて CSC を倒立顕微鏡の偏光装置にて確認しながらガラスピペットで吸引採取し、凍結保存した。採取した PBs および CSCs を含んだサンプルチューブを株式会社アイジェノミクス・ジャパン（東京）へ送付し、NGS 法による染色体解析を依頼した。

【結果】 マウス成熟卵母細胞 20 個に対し、全ての卵母細胞から PBs および CSCs の採取ができた。NGS 法による染色体解析成功率は、CSCs 由来染色体、PBs 由来染色体それぞれ 100% (5/5)、60% (3/5) であった。本手法で採取したマウス卵母細胞の CSCs および PBs の染色体解析は NGS 法により解析可能であった。

第二章 ヒト生殖補助医療における GOs の採卵率

【目的】 GOs はヒトを含めた哺乳類に存在することが報告されているが、ヒト ART において採取された GOs について、それらの核の状態や成熟能などの詳細な解析はされていない。そこで、ヒト ART における GOs 採卵成績および核の状態などについて、山下湘南夢クリニックの採卵成績から調べた。

【方法】 本章は山下湘南夢クリニック倫理審査委員会および国立国際医療研究センター倫理委員会にて承認を得て実施した。山下湘南夢クリニックの自然周期または低卵巣刺激周期の採卵成績を対象として GOs 採取率を調べた。得られた卵母細胞は倒立顕微鏡下にて観察し、核の状態（卵母細胞の成熟）および卵母細胞の細胞質の最大直径を測定し、その直径が 140 μm を超えるものを GO と判定した。採取された GOs は、文書同意が得られたものを本章の対象症例とした。

【結果】 採卵を行った 6124 周期（クロミフェン周期：3170、レトロゾール周期：1429、自然周期：1525）において、10392 個の卵母細胞が得られ、GOs の採卵率は 0.29% (30 GOs /10392 oocytes) であった。卵巣刺激法ごとの GO 採卵率は、クロミフェン周期、レトロゾール周期、自然周期においてそれぞれ 0.30% (20 GOs/6606 oocytes)、0.29% (7 GOs/2401 oocytes)、0.21% (3 GOs/1405 oocytes) であり、卵巣刺激法による差は認められなかった ($P > 0.05$)。得られた GOs は MII 期が 53.3% (16/30)、MI 期が 20.0% (6/30)、GV 期が 26.7% (8/30) であった。

第三章 ヒト GOs の体外成熟培養

【目的】未成熟の状態（GV 期もしくは MI 期）で得られた GOs は体外成熟培養を行い、その体外成熟能について調べた。

【方法】採卵された MI 期および GV 期 GOs について、採卵後 37.5°C、6% CO₂、5% O₂、89% N₂ の気相でガス平衡させた oocyte maturation-medium (IVM Media KIT, Cooper Surgical, Inc. USA) を用いて 35 mm dish (AGC TECHNO GLASS, Japan) に 20 μL drop を作製し、OVOIL (Vitrolife, Sweden) で覆い、インキュベーター (ES6S, 株式会社アステック, 福岡) 内で冠状細胞が付いた状態で 24 時間成熟培養を行った。成熟培養後、GOs は冠状細胞を除去後、PBs および CSCs の数を倒立顕微鏡の偏光装置を用いて確認した。成熟培養成績については、2015 年 10 月 1 日から 2017 年 12 月 31 日の期間に山下湘南夢クリニックで実施された採卵において、同条件で成熟培養した通常の卵母細胞と比較した。

【結果】MI 期で得られた 6 個の GOs は成熟培養により全てが成熟し、通常卵の成熟率 89.4% (2079/2326) と差は認められなかった ($P > 0.05$)。成熟した GOs のうち PB を 2 つ有する GOs が 83.3% (5/6)、そのうち CSC を 2 つ有するものは 80.0% (4/5) であった。GV 期で得られた 8 個の GOs のうち、7 個について成熟培養を行い、71.4% (5/7) が成熟し、通常卵の成熟率 65.1% (829/1274) と差は認められなかった ($P > 0.05$)。成熟した 5 個の GOs は全て PB を 2 つ有しており、そのうち CSC を 2 つ有するものは 4 個であった。本検討の結果、未成熟で得られた GOs の成熟率は、通常卵と比較して差が認められないこと ($P > 0.05$)、成熟した GOs は 80% 以上の割合で PB を 2 つ有することが示された。

第四章 ヒト GOs の NGS 法による染色体解析

【目的】ヒト GOs からマイクロマニピュレーションで PBs および CSCs を採取し、NGS 法による染色体解析を試みた。

【方法】採卵時に成熟しており PB および CSC を 2 つずつ有する GOs をガラス化保存・加温し、本検討に使用した。偏光顕微鏡にて CSC の位置をそれぞれ確認し、片方の PB 近傍に穿孔し、ガラスピペットで PB を吸引採取し凍結保存した。続けて、採取した PB の近傍に位置する CSC をピペットで吸引採取し、サンプルチューブへ移して凍結保存した。1 組の PB、CSC を採取した後、残りの PB、CSC についても、同様の手順で採取し、凍結保存を行った。2 つの PB、CSC を採取した後、透明帯を完全に除去して cytoplasm をサンプルチューブに移して凍結保存した。サンプルチューブは株式会社アイジェノミクス・ジャパン（東京）へ送付し、NGS 法による染色体解析を依頼した。

【結果】GOs 4 個の、合計 8 個の PBs について全ての採取に成功 (8/8, 100%) した。また、合計 8 個の CSCs については 7 個の採取に成功 (7/8, 87.5%) した。3 個の GOs の PBs および CSCs を NGS 法により解析した結果、全ての採取サンプルに染色体異数性が確認された。本検討により、PB および CSC をマイクロマニピュレーションにて直接採取し、NGS 法により染色体解析ができることが示された。

本研究で確立したマイクロマニピュレーションおよび NGS 法を適用してヒト GOs の PBs および CSCs の染色体解析ができることが示された。また、CSC と近接する PB の染色体数的異常は相補的であった。従ってヒト GOs については、胚移植に用いる配偶子の対象からは除外するべきである。

論文審査の結果の要旨

1. 学術的背景

哺乳類の受精能を有する成熟卵母細胞はごく稀に、その細胞質の体積がほぼ 2 倍の巨大卵母細胞 (giant oocyte(s): GO(s)) と呼ばれる卵母細胞が認められている。この GOs は体外での受精能および初期発生能は、通常サイズの卵母細胞と同様であることが報告されているが、この GOs 由来胚には染色体異常が頻発する。

20 世紀後半において家畜および実験動物の体外受精および初期発生に関する研究が進展し、家畜の増殖、遺伝資源保存などへ応用されるようになった。さらに 1978 年のヒト体外受精成功を契機に、ヒト不妊治療としてのヒト体外受精関連の生殖補助医療技術が 21 世紀に入り世界中に普及した。その結果として、ヒト生殖補助医療において GOs の採取が報告されるようになった。しかし、その GOs の染色体解析は、配偶子であるがゆえに詳細な解析はなされていない。

本研究は、ヒト GOs の染色体解析を目的に、1) ヒト GOs の極体および卵母細胞質内の紡錘体をサンプリングするためのマイクロマニピュレーションをマウス卵母細胞を用いて開発し、さらに 2) ヒト GOs からこのマイクロマニピュレーションを適用して極体および卵母細胞質内の紡錘体をサンプリングし、これらを次世代シーケンサー法 (next-generation sequencing 法: NG 法) による染色体解析を試みた。

2. 論文の内容

本論文は、ヒト GOs の染色体解析を目的に、GOs の PB および紡錘体を個々にサンプリングするためのマイクロマニピュレーションを開発 (第一章) し、ヒト GOs へ適用し、採取した PB および紡錘体の染色体解析を試みた (第四章)。また、ヒト生殖補助医療における GOs の採取および核の状態について調査し (第二章)、さらにヒト生殖補助医療において採取された未成熟 GOs の体外成熟を試みた (第三章)。

第一章 マウス M II 期卵母細胞における polar body (PB) および metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) のマイクロマニピュレーションおよび次世代シーケンサー法を用いた染色体解析

マイクロマニピュレーションによる卵母細胞の PB ゲノムおよび CSC の正確なサンプリング技術

は、本研究に必要不可欠である。本章では、マウス卵母細胞を用いて PB および紡錘体を採取し、NGS 法による染色体解析を試みた。

【方法】超低温保存マウス未受精卵を購入し、その加温卵の PB および紡錘体を、倒立顕微鏡下のマイクロマニピュレーションにより採取して、NGS 法による染色体解析を試みた。すなわち、PB の近傍の透明帯をレーザーにて穿孔し、PB をガラスピペットで吸引採取してサンプルチューブへ移して凍結保存した。続けて CSC を倒立顕微鏡の偏光装置にて確認しながらガラスピペットで吸引採取し、サンプルチューブへ移して凍結保存した。採取した PBs および紡錘体を含んだサンプルチューブを株式会社アイジェノミクス・ジャパン（東京）へ送付し、NGS 法による染色体解析を依頼した。

【結果】マウス MII 期卵母細胞 20 個を用いて、全ての卵母細胞から PBs および紡錘体の採取ができた。採取対象の PB は小さく萎縮したものや、細胞膜が破損して粘性を持つものがあり、回収に難渋したサンプルが認められた。NGS 法による染色体解析の成功率は、紡錘体由来サンプルおよび PBs 由来サンプルでそれぞれ 100% (5/5)、60% (3/5) であった。本章で開発したマイクロマニピュレーションで採取した PBs および紡錘体からのサンプルは NGS 法により染色体解析が可能であることが示された。

第二章 ヒト生殖補助医療における GOs の採卵率

GOs はヒトを含めた哺乳類に存在することが報告されているが、ヒト生殖補助医療において採取された GOs について、それらの採取率や核の状態について、山下湘南夢クリニックの採卵成績から調べた。

【方法】本章の研究は、山下湘南夢クリニック倫理審査委員会および国立国際医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施された。山下湘南夢クリニックの自然周期または低卵巣刺激周期の採卵成績を対象とした。採卵で得られた卵母細胞は、倒立顕微鏡下にて観察しながら冠状細胞を残すように卵丘細胞をカットし、核の状態および卵母細胞の細胞質の最大直径サイズを測定し、その直径が 140 μm を超えるものを GO と判定した。採取された GOs は、文書同意が得られたものを対象症例とした。

【結果】採卵を行った 6124 周期（クロミフェン周期：3170、レトロゾール周期：1429、自然周期：1525）において、10392 個の卵母細胞が得られ、GOs の採卵率は 0.29% (30 GOs /10392 oocytes) であった。卵巣刺激法ごとの GO 採卵率は、クロミフェン周期、レトロゾール周期、自然周期においてそれぞれ 0.30% (20 GOs/6606 oocytes)、0.29% (7 GOs/2401 oocytes) 、0.21% (3 GOs/1405 oocytes) であり、卵巣刺激法による差は認められなかった ($P > 0.05$)。得られた GOs の核相は MII 期が 53.3%(16/30)、MI 期が 20.0% (6/30)、GV 期が 26.7% (8/30)であった。

第三章 ヒト GOs の体外成熟培養

未成熟の状態（GV 期もしくは MI 期）で得られた GOs については体外成熟培養を行い、その成熟能について調べた。

【方法】第二章で採卵された MI 期および GV 期 GOs について、採卵後 37.5°C、6% CO₂、5% O₂、89% N₂ の気相でガス平衡させた oocyte maturation-medium (IVM Media KIT, Cooper Surgical, Inc.

USA)を用いて、冠状細胞が付いた状態で 24 時間成熟培養を行った。成熟培養した GOs は、冠状細胞を除去後、PBs および CSCs の数を倒立顕微鏡の偏光装置を用いて確認したのち、今後の解析のためにガラス化保存を行なった。体外成熟培養の成績については、2015 年 10 月 1 日から 2017 年 12 月 31 日の期間に山下湘南夢クリニックで実施された採卵において、同条件で体外成熟培養した通常の卵母細胞と比較した。

【結果】 MI 期で得られた 6 個の GOs は成熟培養により全てが成熟し、通常卵の成熟率 89.4% (2079/2326) と差は認められなかった($P > 0.05$)。成熟した GOs のうち PB を 2 つ有する GOs が 5 個、そのうち CSC を 2 つ有するものは 4 個であった。GV 期で得られた 8 個の GOs のうち、7 個について成熟培養を行い、71.4% (5/7) が成熟し、通常卵の成熟率 65.1% (829/1274) と差は認められなかった($P > 0.05$)。成熟した GOs は全て PB を 2 つ有しており、そのうち細胞質内紡錘体を 2 つ有するものは 4 個であった。本検討の結果、未成熟で得られた GOs の体外成熟率は、通常卵の体外成熟率と比較して差が認められない($P > 0.05$)ことが示された。

第四章 ヒト GOs の NGS 法による染色体解析

ヒト GOs からマイクロマニピュレーションによって PBs および紡錘体を採取し、NGS 法による染色体解析を試みた。

【方法】 採卵時に成熟しており PB および紡錘体を 2 つずつ有する GOs をガラス化保存・加温し、本検討に使用した。偏光顕微鏡にて紡錘体の位置をそれぞれ確認し、片方の PB 近傍にガラスピペットを穿孔して PB を吸引採取し凍結保存した。続けて、採取した PB の近傍に位置する紡錘体をガラスピペットで吸引採取し、サンプルチューブへ移して凍結保存した。1 組の PB、紡錘体を採取した後、残りの PB、紡錘体についても、同様の手順で採取、凍結保存を行った。2 つの PB、紡錘体を採取した後、透明帯を完全に除去して残った cytoplasm をガラスピペットにてサンプルチューブに移して凍結保存した。採取した PBs、紡錘体および cytoplasm を含んだサンプルチューブを株式会社アイジェノミクス・ジャパン（東京）へ送付し、NGS 法による染色体解析を依頼した。

【結果】 ヒト GOs 4 個、およびそれらの合計 8 個の PBs について全ての採取に成功 (8/8, 100%) した。また、合計 8 個の紡錘体については 7 個の採取に成功 (7/8, 87.5%) した。3 個の GOs の PBs および紡錘体を NGS 法により解析した結果、全てに染色体異数性が確認され、数的異常を示した染色体は PB と近接する紡錘体の間で相補的であった。本検討により、PB および紡錘体をマイクロマニピュレーションにて直接採取し、NGS 法により染色体解析ができることが示された。また、GOs は PBs および紡錘体それぞれにおいて、染色体異数性を示すことが確認された。

本研究は、ヒト巨大卵母細胞の染色体解析を目的に、1) ヒト GOs の極体および卵母細胞質内紡錘体をサンプリングするためのマイクロマニピュレーションを開発し、さらに 2) ヒト巨大卵母細胞から上記マイクロマニピュレーションを適用して極体および卵母細胞質内紡錘体をサンプリングし、

これらを次世代シーケンサー法による染色体解析法を試みた。その結果、ヒト GOs では染色体異数性を有することが確認された。

3. 論文の審査

1) テーマの立て方

哺乳類にごく稀に確認される巨大卵母細胞の 2 つの紡錘体およびそれに対応する極体の染色体解析が可能となれば、その発生機構やヒト生殖補助医療の適用に対して重要な情報を提供しうる。従ってこのテーマは、卵母細胞の形成やヒト生殖補助医療に大いに貢献するものと評価できる。

2) 研究の背景

これまでの巨大卵母細胞の染色体解析は、その体外受精後に発生した胚細胞由来の染色体標本の解析によって間接的に解析されてきた。本研究は、マイクロマニピュレーションおよび次世代シーケンシング法を適用して、ヒト GOs の染色体解析を試みたものであり、ヒト生殖補助医療への貢献が期待できる。

3) 研究の方法

本論文での主な材料としてのヒト巨大卵母細胞は非常に貴重である。さらに、研究の方法として、マイクロマニピュレーションによる卵母細胞からの直接的な極体および紡錘体のサンプリングの手法は技術的に難易度の高いものであり、マウス卵母細胞での検討は重要で、次世代シーケンシング法の適用も適切である。

4) 研究の結果

本論文の実験結果は、適切に図表にまとめられており、統計学的な検定法も適切に適用されている。しかし、貴重なサンプルであるヒト GOs の染色体解析例数は多いとはいえない。

5) 考察と結論

本研究の結果から、ヒト GOs の染色体構成は異数性を示すことが明らかになり、ヒト GOs は生殖補助医療における胚移植の材料として用いることは適切でないとの結論を導き出している。本研究の成果は、今後、ヒト生殖補助医療あるいは卵形成分野への貢献が期待できる。

6) 参考文献

ヒト巨大卵母細胞に関する論文は多くはないが適切に引用されている。また、本論文におけるテーマの学問的背景や考察においても適切な文献が引用されている。

4. 審査結果

本論文の成果は、ヒト巨大卵母細胞の染色体解析を目的に、1) ヒト GOs の極体および卵母細胞質内紡錘体をサンプリングするためのマイクロマニピュレーションの手法を開発し、さらに 2) ヒト巨大卵母細胞から上記マイクロマニピュレーションを適用して極体および卵母細胞質内紡錘体をサンプリングし、これらを次世代シーケンサー法による染色体解析法を適用して、ヒト GOs の染色体解

析に成功した。その結果、ヒト GOs の紡錘体は全てで異数性が認められた。したがって、ヒト生殖補助医療においてヒト巨大卵母細胞を胚移植に用いる目的での配偶子としての材料として用いることを避けるべきであるとの結論を得た。

本研究の成果は、ヒト生殖補助医療にける巨大卵母細胞の染色体異数性に対する重要な知見を与え、ヒト生殖補助医療に大いに貢献するものと考えられる。以上のことから、本論文は博士（学術）の授与にふさわしい研究業績であると判定した。本研究の主な成果は“**Reproductive Medicine and Biology**”へ投稿し、受理され公表されている。