

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

山梨大学 生命環境学域 生命工学科
助教・渡辺 連

研究テーマ

胚の体外培養と操作が将来の雌生殖能に及ぼす影響とそのメカニズムの解明

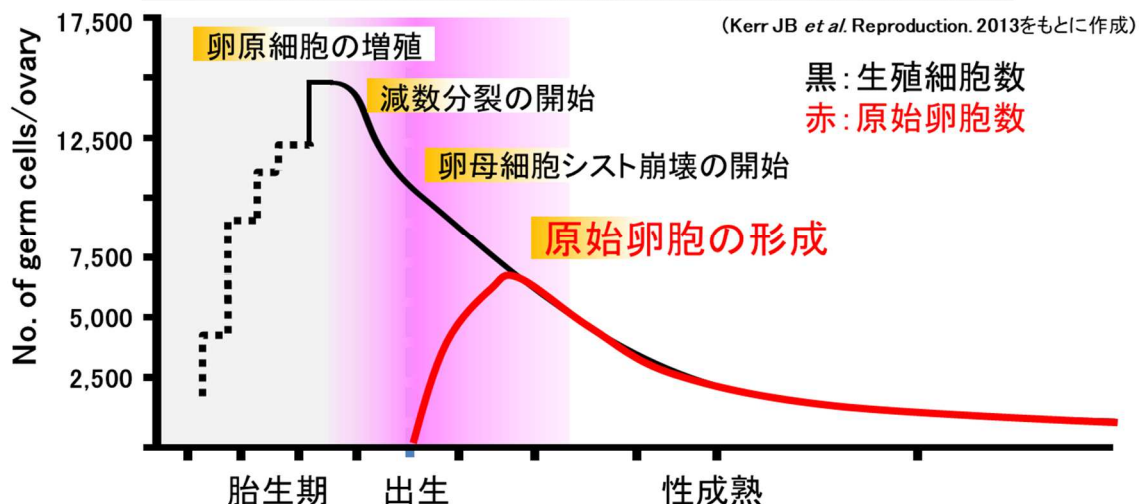
研究の概要

近年我が国では新生児の約 16 人に 1 人(2017 年)が体外培養を利用した生殖補助技術(ART)により出生しているが、胚や胎児期の環境が成長後の健康や疾患の発症に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。ART 由来の産子では自然妊娠に比べ、体重増加や糖代謝異常のリスクが報告されているが、哺乳類において胚や胎児期の環境が将来の雌生殖能にどのような影響を与えるのかはほぼ分かっていない。本研究では、体外培養や顕微授精などの胚操作が雌マウスの生殖能とその老化に及ぼす影響を長期的な繁殖能や卵巣予備能(卵胞数、卵クオリティ)の解析により検証することを目的。

研究の背景

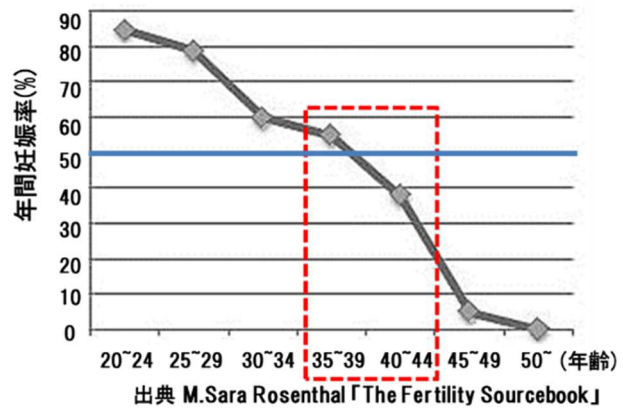
哺乳類個体の生殖能には時間的な限りがあり個体差も大きい。老化にともなう雌雄の生殖能の低下はホルモンバランスの急激な変化による更年期障害など個体の健康を損なうだけでなく、生殖寿命の短縮や生殖能の喪失による後天的な不妊から将来の不妊治療を増やし、少子化に拍車をかけている可能性がある。特に寿命に比べて短い雌の生殖能は、出生前後に確立される有限な備蓄卵(原始卵胞)の数やクオリティに依存している。加齢に伴う周期的な排卵過程で原始卵胞は徐々に枯渇し、卵では染色体異数性の増加や発生能の低下が起き、数と質双方の要因から妊孕能の低下につながるがよく知られている。

マウスを例にした出生前後の卵巣内卵母細胞数の推移



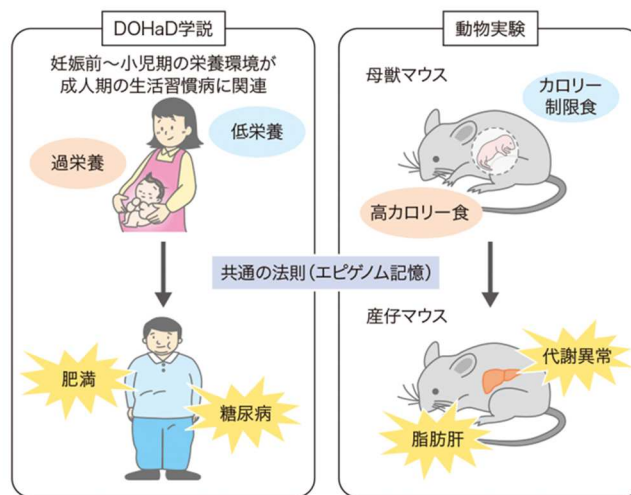
例えばヒトでは 20 代で 80% あった妊娠率が 30 代後半を境に 45% 未満まで急激に低下することが知られている。女性の社会進出に伴う晩産化の傾向からも生殖能の維持と向上・延伸に繋がる技術開発は需要が高いと考えられるが、加齢による雌の生殖能の低下を制御するメカニズムの詳細は明らかでない。ゆえに、雌生殖能のポテンシャルを非侵襲的かつ正確に把握し予測する技術や、雌生殖能の維持と向上・延伸に繋がる生殖寿命制御機構の解明による技術開発は僅々の課題と考えられる。

ヒトにおける年齢別の1年間の妊娠率



近年、胚や胎児期の過栄養や栄養飢餓が成体における健康や生活習慣病などの疾患発症リスクと結びつくことが明らかになりつつあり、その現象は DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) とよばれている。マウスでは子宮に着床前の受精後 3 日間の母体の低栄養が、成体後の産子に高血圧や糖代謝異常などを発症させることが示され (Watkins et al. BOR 2008)、早期卵巣老化(Kaitlyn A et al. BOR 2015) など雌生殖能にも影響を与える可能性が示されており、この時期の胚の適切な栄養環境が将来の健康に重要であることが示唆されている。

DOHaD(Developmental Origins of Health and Disease)学説



実験医学2020年4月号より引用

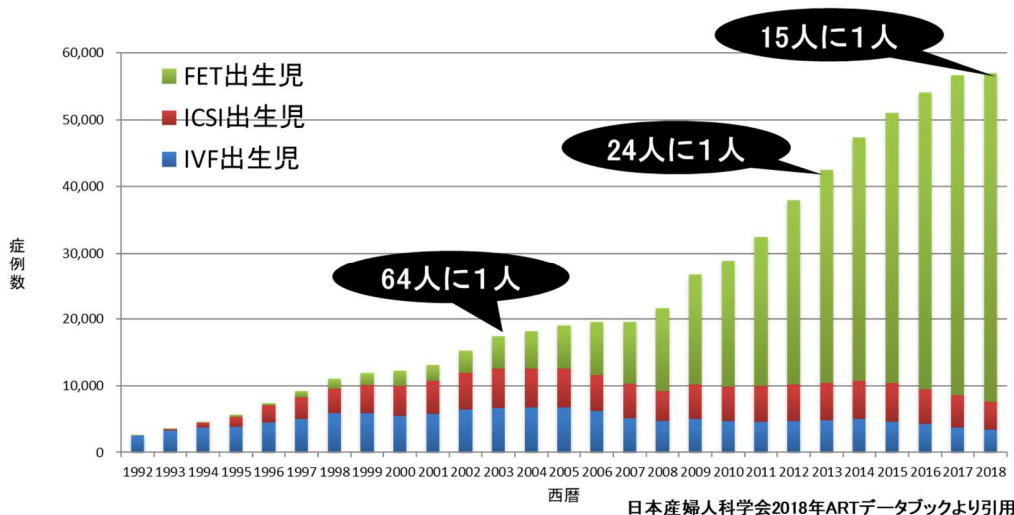
一方、周産期は原始卵胞プール確立の重要な時期であり母体や産子の栄養飢餓が原始卵胞形成に影響することが報告されつつある。近年、この原始卵胞形成過程において胎児期から新生仔期の栄養飢餓や、それに誘導されるオートファ

ジューの関与が指摘されている。申請者も、出生直後の新生仔マウスへの飢餓が卵巣内のオートファジーを活性化することで原始卵胞の形成を促進することを報告している(Watanabe R and Kimura N, JRD, 2018)。さらに新生仔期のオートファジー誘導剤の投与により新生仔期から老齢までの原始卵胞数や生殖能を高く維持できることを明らかにしている(Watanabe R et al., BOR, 2020)。これらのことから、出生直前後の栄養環境(培養環境)が卵巣内卵胞数を変化させることで、雌個体の将来の生殖能にも大きく影響を与えられる可能性が考えられた。

概要図. 着床前胚の体外培養や胚操作は、母体の過栄養や飢餓のように成体での雌生殖能にも影響を与えるのか？



日本では不妊治療である生殖補助技術 (Assisted Reproductive Technology: ART) により生まれる新生児が年間 5 万人以上(2015 年)に達している。DOHaD 現象は、胚を体外で培養・操作する ART においても適応されるものと考えられている。



実際に ART で用いられる体外培養に由来する産子では、自然妊娠に比べ体重増加や糖代謝異常のリスクの増加が指摘されており、用いられた培養液の種類でも産子体重に影響があることがわかっている。しかしながら、雌生殖能への影響に着目した報告は限られており、特にそれらを長期的に確認した報告はみられない。世界初の体外受精児が誕生からまだ 40 年しか経っておらず、着床前の

胚が体外環境に曝される ART において長期にわたる成体への影響とその分子機構に関する情報はまだ十分に蓄積されていない。現代日本では、今後も ART の利用にはさらなる増加が見込まれるため、着床前胚の環境や胚の体外培養、胚操作が成体の健康に及ぼす影響とその仕組みの解明は、疾患の潜在的リスクを認識し、その予防や安全な ART を確立するために極めて重要と考えられる。これらの知見は今後の不妊治療を考える上で不可欠であり、増加が予想される ART 由来児の将来の生殖能の予測や保全に貢献し、より安全で安心な ART の確立に貢献することが期待される。

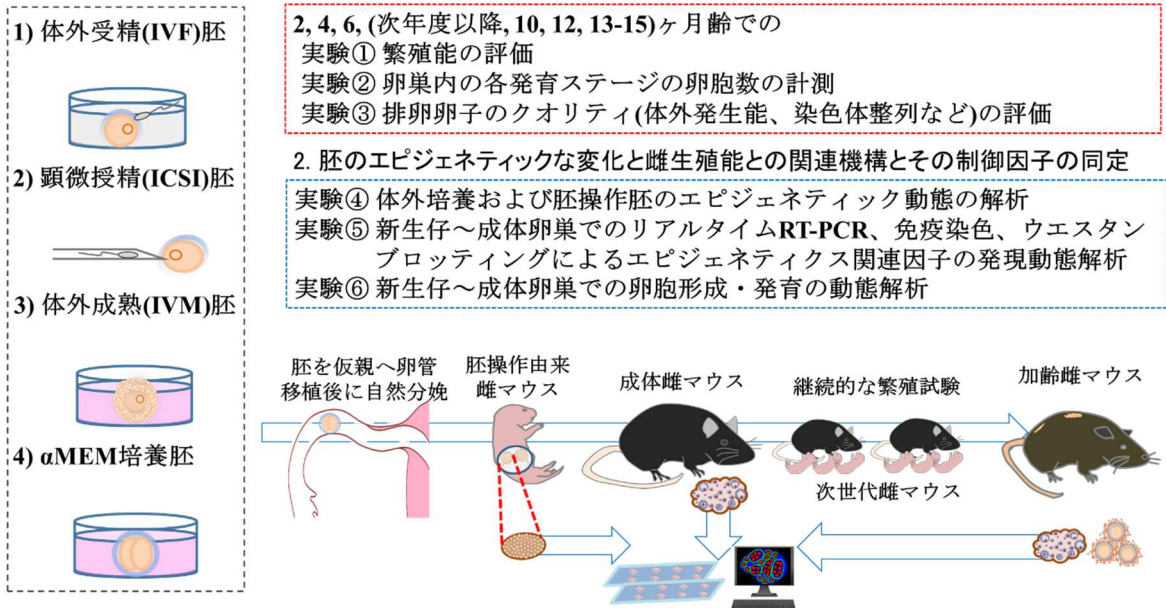
本研究の目的

本研究では、哺乳類着床前胚の培養環境や胚操作が雌生殖能およびその老化に及ぼす影響を長期的に解析することを目的とした。そのために、長期的な雌の生殖能および卵巣予備能の解析により体外培養や胚操作が雌生殖機能に与える影響の検証を試みた。

方法

本研究は DOHaD の考えに基づき、胚の環境操作や培養液が将来雌の生殖能や卵巣機能、卵クオリティにどのような影響を与えるのか明らかにするため、1)体内と異なる受精過程を経験した体外受精胚(IVF 胚)、2)顕微操作によって作出された核のエピゲノムが異常な胚(ICSI胚)、3)体外成熟を経験した胚(IVM胚)、4)通常と異なる培養液に暴露された独自の DOHaD モデル胚(MEM 胚)を用いる。これらの胚を仮親に卵管内胚移植し、得られた雌産子を用いて、①2、4、6ヶ月齢での同系統の雄との交配試験による雌生殖能の評価を行う。顕著な影響がみられた区では、②卵巣組織連続切片による各発育ステージの卵胞数の計測、③卵の染色体整列や体外発生能の評価により卵巣機能や卵クオリティを評価することで、培養環境や胚操作が将来の雌生殖能やその老化に与える影響を明らかにする。加えて、それらの胚で④エピジェネティック動態を確認し、産子の新生仔から成体卵巣での⑤エピジェネティクス関連因子や⑥卵胞形成(MVH、Laminin)および卵胞発育因子(Akt, PTEN)の動態の解析を行い、胚時期のエピジェネティックな変化が生殖老化に影響を与えるメカニズムを明らかにし、それらを制御するマスター因子を同定する。次ページに本研究の概要図を示す。

本研究の概要図

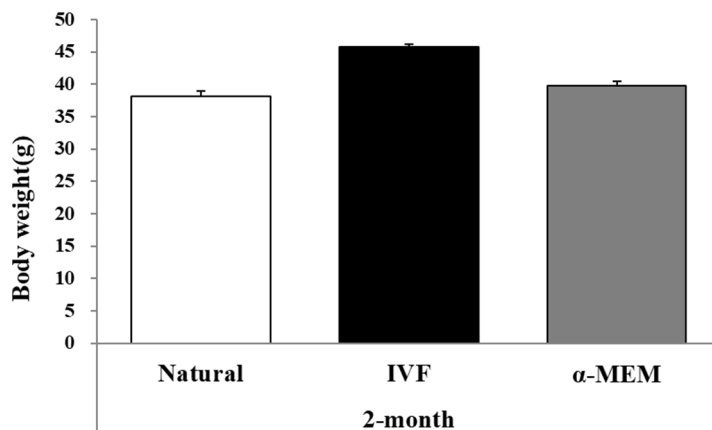


研究の成果

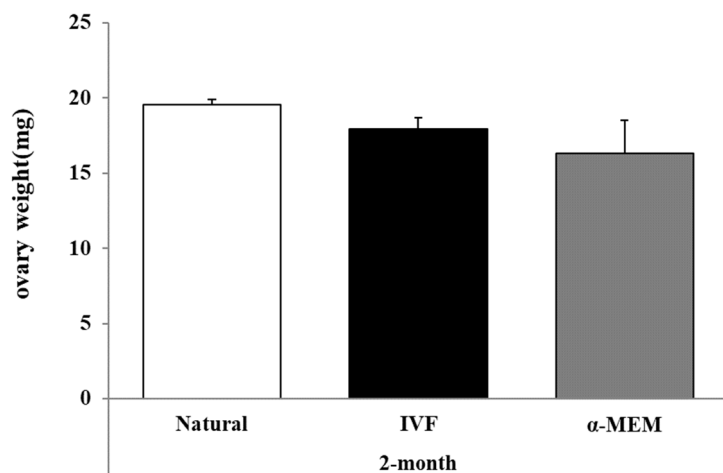
対照区となる自然分娩による産子、胚移植による産子(IVF 由来産子、 α -MEM マウス)を作成、飼育を行い、2ヶ月齢での交配試験を行った。

コロナウイルスの影響で実験施設への入館規制(県外移動後2週間)等により、継続的な産子の確認や長期的な飼育が困難となり、上記のマウスの2カ月齢時点での卵巣重量ならびに平均産子数と産子体重のデータ取得に基づく研究の成果となっている。

・2ヶ月齢での平均体重は、IVF産子で高い傾向がみられた。



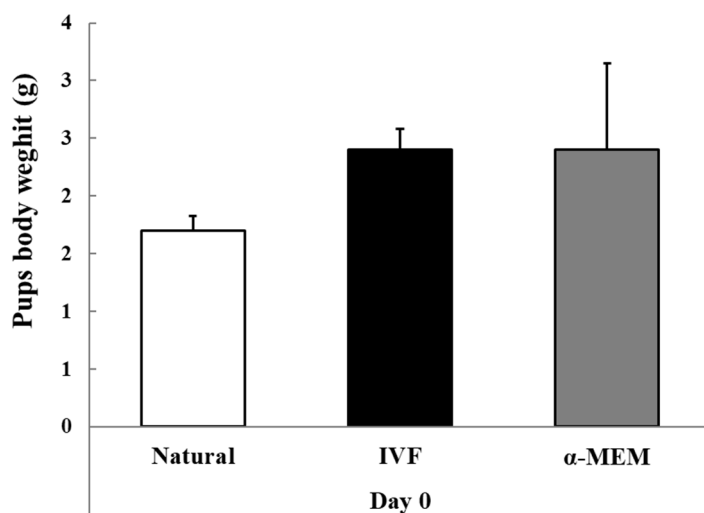
・2ヶ月齢での卵巣重量は、IVF 及び α -MEM 産子で低い傾向がみられた。



・2ヶ月齢での交配試験で得られた平均産子数は IVF および α -MEM で低い傾向がみられた。

Experimental groups		n=	No. of offspring (mean \pm SD)
2-month	Natural	3	13.4 \pm 1.4
	IVF	3	11.6 \pm 1.2
	α -MEM	3	11.4 \pm 1.8

・それらの平均産子体重は、IVF および α -MEM 産子で高い傾向がみられた。



今後の展望

マウスの2カ月齢時点でのデータ取得に基づく研究成果となったが、本研究のテーマである着床前胚の環境や胚の体外培養、胚操作が成体の健康に及ぼす影響とその仕組みの解明は、疾患の潜在的リスクを認識し、その予防や安全な高度生殖補助医療技術(ART)を確立するために極めて重要と考えられる。これらの知見は今後の不妊治療を考える上で不可欠であり、増加が予想されるART由来児の将来の生殖能の予測や保全に貢献し、より安全で安心なARTの確立に貢献することが期待される。

研究成果の発信方法（予定を含む）

マウスの2カ月齢時点でのデータ取得に基づく研究成果となっており、成果の発信方法については検討中である。