

## 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学 生命環境学域 生命工学科
職名・氏名	助教・渡辺 連 <span style="float: right;">㊞</span>

## 1 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

## 2 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。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を検証する。仮に影響がみられた場合、どのような分子メカニズムでその影響が引き起こされるのかを調べるため、体外培養-胚操作卵や胚のエピジェネティック関連因子の動態解析し、その胚由来の雌産子で卵胞備蓄形成過程および卵胞発育関連因子の解析を行う。

## 3 研究の方法

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。具体的には、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。

### 留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

## 本研究の概要図

### 1) 体外受精(IVF)胚



### 2) 顕微授精(ICSD)胚



### 3) 体外成熟(IVM)胚



### 4) αMEM培養胚



## 1. 体外培養や胚操作が雌の生殖能および生殖老化に及ぼす影響の解析

2, 4, 6, (次年度以降, 10, 12, 13-15)ヶ月齢での

実験① 繁殖能の評価

実験② 卵巣内の各発育ステージの卵胞数の計測

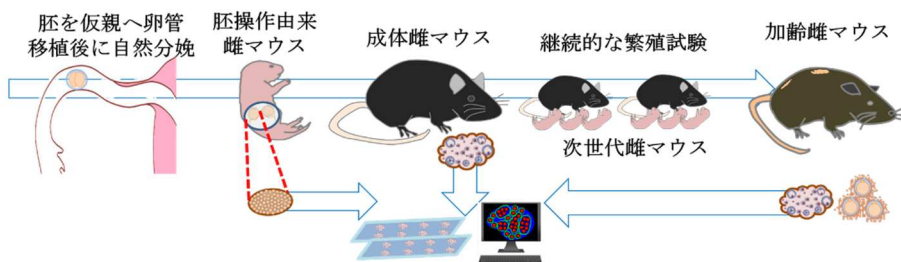
実験③ 排卵卵子のクオリティ(体外発生能、染色体整列など)の評価

## 2. 胚のエピジェネティックな変化と雌生殖能との関連機構とその制御因子の同定

実験④ 体外培養および胚操作胚のエピジェネティック動態の解析

実験⑤ 新生仔～成体卵巣でのリアルタイムRT-PCR、免疫染色、ウエスタンブロッティングによるエピジェネティクス関連因子の発現動態解析

実験⑥ 新生仔～成体卵巣での卵胞形成・発育の動態解析



## 4 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。
- ・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。

## 留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。