

【要約】

Dispermic tripronuclear zygotes spontaneously develop
into biparental embryos

(2 精子受精 3 前核卵は、両親由来の 2 倍体に復する)

千葉大学大学院医学薬学府
先端生命科学専攻 生殖機能病態学
(主任：生水 真紀夫 教授)

藤田 真紀

【緒言】

ヒト体外受精では、受精卵には、1 卵子と 1 精子に由来する合計 2 個の核（2 前核）が観察される。しかし、1-4%に前核が 3 つ観察される 3 前核卵（3PN）が生じる。これは、2 精子受精に由来する異常受精（3 倍体）であるが、その 2-6%は形態学的に正常な胚盤胞に発生する。過去の報告では、3PN 卵より発生した初期胚の一部が 2 倍体になることが FISH（fluorescence in situ hybridization）法や、核型解析等で証明されている。しかし、これらの胚が正常胚であるか、すなわち、両親の染色体を持つか、ということは確認されていない。本研究では、3PN 卵に由来する初期胚が、両親由来の染色体をもつことを証明し、3PN 卵の一部が、発生初期に正常 2 倍体に戻ることを示すことを目的とした。

【材料・方法】

3PN 卵の収集と培養

高度生殖補助医療専門施設において、体外受精後に廃棄予定となった 3PN 卵を患者の同意を得て収集し、受精後 8-22 時間継続培養を行った。第一卵割後に 2-5 細胞胚になったものについて、ガラス化凍結後、液体窒素内に保存し、千葉大学へ移送し実験まで保存した。実験直前に胚を融解し、2 時間の回復培養を行った。

割球のサンプリング

それぞれの胚に酸性タイロドを加えて透明帯を除去し、マウスピペットを用いて割球を分離した。顕微鏡下に各々の割球を 1 個ずつ 1μl の水とともに 200μl チューブ内に回収した。サンプリングしたチューブは直ちに遠心して-80℃で保存した。

両親夫婦の遺伝子多型の解析

割球の両親由来を推定するために、胚の父母の遺伝子多型解析

を行った。まず、胚の父母の血液または口腔粘膜細胞より DNA を抽出し、次に Power Plex 16 multiplex STR system (Promega 社)を用いて、STR 領域 15 箇所と性染色体について multiplex PCR を行った。父がヘテロであり、かつ、母とリピート数が異なる個所を各ペアごとに informative locus として選別した。

割球の PCR

全ゲノム増幅 (Whole genome amplification ; WGA)

各割球をサンプリングしたチューブに proteinase K を反応させて割球を融解した。その後、GenomiPhi version 2 DNA amplification kit (GE Healthcare 社)を用いて、 ϕ 29 DNA polymerase による全ゲノム増幅 (Whole genome amplification ; WGA) を行った。WGA の方法はキットプロトコールに従ったが、単一細胞に適化させるため、酵素を 100 倍希釈して使用し、酵素反応時間は 3 時間とした。WGA 後の DNA は Mini Elute Reaction Cleanup Kit (Qiagen 社) により精製し、12-16 μ l の Tris-EDTA に溶出した。

STR-PCR

両親の多型解析により決定した informative locus を、全ゲノム増幅した割球 DNA をテンプレートとして Light Cycler (Roche Diagnostics)と FastStart DNA Master SYBR Green を使用して PCR 反応により増幅した。PCR 産物は 12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して解析した。

割球の由来の推定

3PN 由来胚の PCR 産物が、父、母の DNA と一致するか、また、父のアリルが 1 セットまたは 2 セットであるかを、電気泳動パターンより推定した。すなわち、3PN 由来胚が、父母の染色体を 1 セットずつ持つ正常 2 倍体か、父の染色体を 2 セットかつ母の染色体を 1 セットもつ 3 倍体か、を推定した。

【結果】

12 個の 3PN 胚を回復培養したうち、全てが 2-5 細胞に分割していた。このうち 1 胚については、4 個の割球のうち 1 個の割球をハンドリング中に喪失したため、解析から除外した。最終的に 11 個の胚から得られた 38 個の割球について全ゲノム増幅と PCR を行い、両親由来を推定した。

11 個の 3PN 胚のうち、4 個 (36%) が、父由来ゲノム 1 セットと母由来ゲノム 1 セットを有する両親由来 2 倍体と推定された。6 個 (55%) が、父由来ゲノム 2 セットと母由来ゲノム 1 セットよりなる 2 精子受精 3 倍体と推定された。残りの 1 個は、父由来ゲノム 1 セットのみを有する雄核発生 2 倍体と推定された。

今回の検討では、父由来ゲノムを 1 セット母由来ゲノムを 1 セット検出した者を両親由来の 2 倍体と推定した。しかし、父由来ゲノムを 2 セット有する胚でありながら、1 セットしか検出できていない胚が含まれている可能性が考えられる。そこで、今回得られた父アリルと母アリルの比 (P/M 比) を使って、2 セットある父由来のゲノムアリルのうち 1 つのアリルしか検出できない可能性がどの程度あるのか推測した。

父アリルと母アリルの比 (P/M 比) を 2 としたとき、11 個の受精卵による実験で実際に検出された父アリルと母アリルの比の生成確率は、0.033 (Fisher 検定) であった。したがって、今回実験に用いた受精卵のすべてが父由来ゲノムを 2 セット有するとの仮説は棄却され、少なくとも 1 個は父アリル 1 つであることが示された。

【考察】

本研究成績から、2 精子受精 3 前核卵の約半数が第一卵割を経て

両親由来 2 倍体に復すること、他の半数は父由来の 2 セットのゲノムを保って 3 倍体として発生を続けることが示された。

体外受精で生じた 3PN 卵子が、2 倍体胚となって発生を続けることが、われわれを含めいくつかの研究グループにより示されている。

今回のわれわれの研究により、3PN 卵より発生した 2 倍体胚が、両親由来ゲノムセットを有するものであることを初めて証明した。すなわち、これらの二倍体胚が正常胚と同じゲノム構成を持つ可能性が確認された。また、他の 2 精子由来の 3 倍体については、2 精子由来三倍体のゲノム構成を維持している可能性が実際に確認された。この 2 精子由来三倍体構成を維持している胚は、部分胞状奇胎の発生原因となりうる細胞であり、そのような細胞が実際に確認されたのも本研究が最初と思われる。

雄核発生の 2 倍体と推定された 1 胚は、全胞状奇胎のゲノム構成に相当する胚であった。したがって、2 精子由来二倍体胚が全胞状奇胎の発生母地となる可能性があることが確認された。

今回の成績は、正常受精卵の代用として、3PN 卵由来発生胚を用いることができる可能性を確認するものである。実際に、3PN 卵から除核した胚を移植して正常生児を得たとの報告もある。しかし、我が国では、日本産科婦人科学会では 3PN 卵は胚移植に用いず廃棄すべきとの見解を公表しており、臨床応用には用いられていない。一方で、3PN 由来胚は ES 細胞 (Embryonic stem cell) の供給源として期待されている。3PN 卵を用いて ES 細胞を作成する際に、3 前核のうち 1 個を除核することで、胚発生率や胚盤胞到達率の上昇が期待されている。一方、除核しなくても 2 倍体の胚盤胞が発生するという報告もある。今回の結果は、3PN 卵は除核をしなくても二倍体に復することから、除核なしに ES 細胞樹立に供与できるという報告に根拠を与えるものである。

本研究では、父由来のアリルを検出しない胚を2倍体と推定した。しかしながら、全ゲノム増幅では特定部位が増幅されない現象（**allele drop out**）が、一定の確率で起こることが知られている。したがって、今回2倍体と推定した胚が、実際には三倍体であった可能性もある。しかし、ほぼ全ての割球で母由来のアリルが検出されたことより、**allele drop out** が高頻度に行っていたとは考えにくい。さらに、父アリルと母アリルの比（**P/M 比**）の生起確率から、観察したすべての胚が3倍体であった可能性は否定することができた。

本研究により、体外受精由来の3PN卵のおよそ半分が、発生の初期に両親由来の2倍体に復している可能性が示された。今後の臨床応用にむけては、これらの胚に異数性などの異常がないか検討する必要があると思われる。