

令和6年12月27日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

世界初！マウスの受精卵から異常染色体を抽出することに成功 —異常染色体の種類と構造が明らかに—

受精卵における染色体の分離異常は流産の原因の1つですが、異常染色体の大きさはわずか数 μm のため、これまで異常染色体の詳細を調べることはできませんでした。山梨大学大学院医工農学総合教育部（博士課程）統合応用生命科学専攻3年の柴崎郁江大学院生、山梨大学発生活工学研究センターの若山照彦教授、このはな産婦人科などからなる研究グループは、染色体異常のマウス受精卵から異常染色体を取り出し解析することに世界で初めて成功しました。異常染色体は2細胞期になると核の外に微小核を形成します。研究チームはこの微小核を、胚を生かしたままマイクロマニピュレーターを用いて抽出する方法を開発し、そのDNAを詳しく調べました。その結果、約半数の微小核には2種類以上の染色体の断片が含まれていることや、特定の染色体が分離異常を起こしているのではないことなどが明らかになりました。本研究により異常染色体の詳細な解析が可能となり、分離異常の原因や予防方法の研究が促進され、出産率が改善されることが期待されます。本成果はNature系列の姉妹紙Communications Biologyにオンライン掲載（日本時間12月26日（木）午後7時）されました。

タイトル：Extracting and analyzing micronuclei from mouse two-cell embryos fertilized with freeze-dried spermatozoa（マウス2細胞期胚に形成された微小核の抽出・解析方法の確立）

【本研究のポイント】

- 2細胞期の受精卵から異常染色体由来の微小核を抽出することに成功
- 抽出した微小核のDNA-Seq解析に成功
- 微小核に含まれる染色体は断片化している場合が多く、特定の染色体ではなかった
- 異常染色体の解析が可能となったことから、出産率の改善が期待できる

1. 背景

ヒト胚で頻発する染色体異常は妊娠の失敗や流産の原因であり、細胞分裂の際に生じる染色体分離異常(ACS: Abnormal Chromosome Segregation) (注1) が原因の1つであることが知られています。それらの異常染色体は2細胞期になると直径数 μm の微小核を形成しますが、とても小さいため通常の顕微鏡で微小核を見つけることはできません。ヒト胚の場合、発生に影響があるため核を染色して蛍光顕微鏡で調べることはできません(図1)。そのため不妊治療の現場では、胚の見た目や発生速度など観察可能な指標を用いて生まれる可能性の高い良好胚の選別を行っています。しかし、微小核を有する異常胚でも外見や初期発生は正常な場合が多く、それらの指標で良好胚を選別することは困難です。そのため、染色体分離異常が生じてしまう原因を明らかにし、異常胚になってしまふことを予防することが必要です。これまで分離異常の染色体や微小核を調べるために、受精卵の1つの細胞を用いた遺伝子の網羅的解析や、ホルマリンで固定した受精卵の染色体を蛍光観察するなどの解析が行われてきました。しかし、細胞の網羅的遺伝子発現解析では正常染色体と異常染色体の区別ができないこと、蛍光観察などによる異常染色体の観察では、異常染色体の一部分だけしか解析できないことから、**異常染色体を詳しく調べることはできません**でした。そこで本研究では、染色体異常のマウス2細胞期から、胚を殺さずに微小核を取り出す技術の開発、および摘出した微小核の遺伝子解析を試みました。

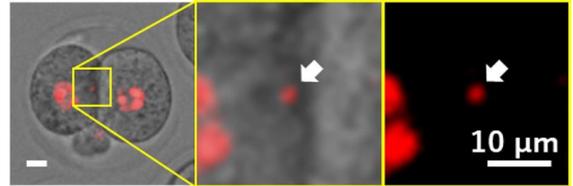


図1. マウス2細胞期胚の微小核
微小核は直径数 μm のため明視野では見つけることができないが、蛍光顕微鏡を使えば観察できる。

2. 研究方法

染色体異常の胚を増やすため、凍結乾燥したマウス精子(注2)を卵子へ顕微授精(ICSI)し、続いて染色体などを光らせるためのmRNAを注入しました。翌日2細胞期へ発育した受精卵を蛍光観察し、染色体分離異常によって形成された微小核の状態を明らかにしました。次に、微小核を2細胞期胚から取り出すために、微小核と細胞骨格の関係や、染色体上にあるセントロメアの有無などを調べ、微小核が2細胞期胚の中でどのような状態になっているのか明らかにしました。

これらの実験で微小核を摘出するための必要条件が見つかってきたため、マイクロマニピュレーターを使って2細胞期の受精卵から微小核を取り出すための技術を、試行錯誤を繰り返しながら開発しました。

取り出すことに成功した微小核は、1つずつ網羅的遺伝子解析(DNA-Seq法)を行い、微小核に含まれている染色体の数、構造、および染色体番号について調べました。

3. 結果

本研究で使用した受精卵は、外見は正常であり通常の顕微鏡では異常を判定できませんでしたが、蛍光観察により約半数(45.3%)が微小核を有する染色体分離異常胚でした。タイムラプス観察やチューブリン(細胞骨格の一種)の染色を行ったところ、微小核はチューブリンと

結合している可能性が高いことが分かりました。また、2細胞期の細胞は、そのままでは強い細胞骨格のため針がうまく刺さらず、微小核を針で吸い込むことが困難でした。そこで、2細胞期胚に細胞骨格を壊す2種類の薬剤処理(注3)を行い、細胞を柔らかくしてからマイクロマニピュレーターに取り付けた直径7-10 μ mのガラス管で微小核の摘出を試みました。その結果、半数以上(59.3%)の異常胚から微小核を摘出することに成功しました(図2 a,b)(動画1)。不思議なことに、2細胞期の両方の細胞に存在している2つの微小核が同時に摘出できる場合もありました(動画2)。一方、核のそばに位置していた微小核の場合、微小核をガラス管で摘出しようとすると、核まで一緒にガラス管に吸い込まれてしまう場合もありました(図2 c,d)(動画3)。一部の微小核は、核を取り除いた別の卵子へ注入して解析を行うことにも成功しました(動画1)。

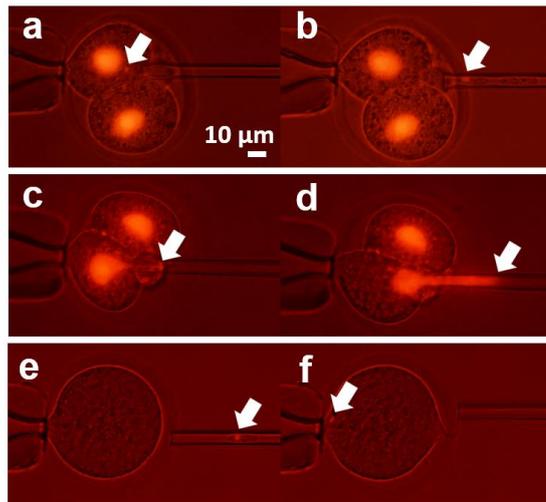


図2. 2細胞期胚から微小核を摘出
 (a,b)微小核を直径7~10 μ mのガラス管で摘出することに成功。(c,d)微小核と一緒に細胞の核まで吸い込んでしまう。(e,f)摘出した微小核を除核した別の卵子へ注入し解析することにも成功した。

摘出した微小核をDNA-Seq解析した結果、過半数の微小核には染色体が1本のみ含まれていましたが、最大4本の染色体を含んだ微小核も見つかりました(図3 a)。また、ほとんどの染色体は断片化していましたが、全長が含まれていた染色体も見つかりました(図3 b)。本実験で調べた18個の微小核のなかには、14種類の染色体(図3 c)(マウスの染色体は全部で20種類)が含まれており、染色体サイズによらず、微小核に含まれる頻度はランダムであることが示唆されました。

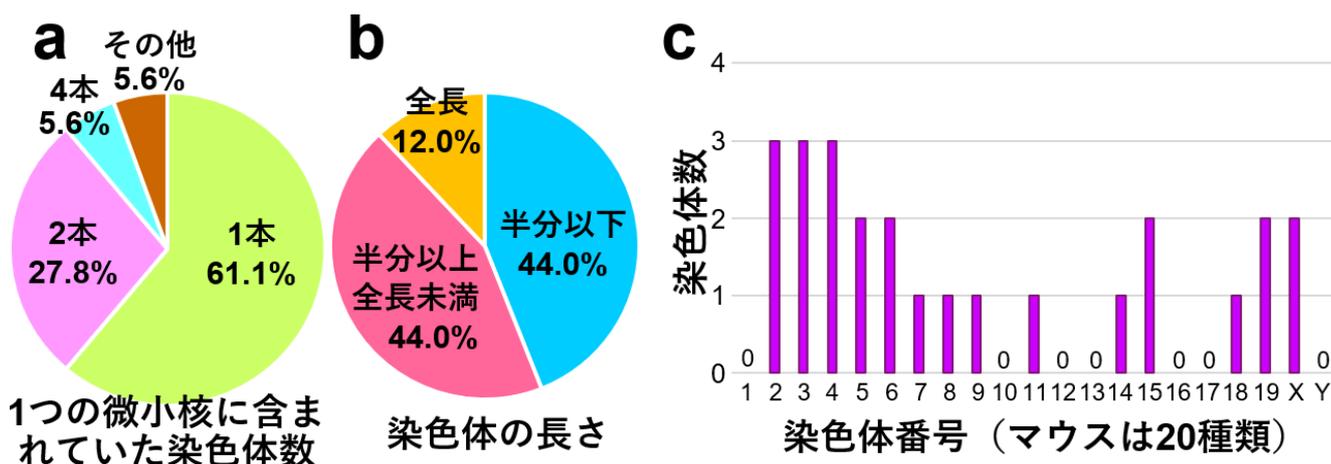


図3. 微小核内の染色体解析結果

(a) 微小核に含まれていた染色体の本数。(b) 微小核に含まれていた染色体の長さ。(c) 微小核に含まれていた染色体の種類と数。X軸は染色体の種類、Y軸は染色体の数を表す。

4. 今後の期待

微小核は、ガン細胞を使った研究により、微小核内のDNAはダメージがひどいだけでなく、微小核が核に吸収されると、微小核内の異常DNAが核のDNAに取り込まれてしまい、細胞にさらなるダメージを与えることがわかってきました。もし受精卵に生じた微小核でも同様な現象が起きるとしたら、異常受精卵から微小核を取り除くことで正常化できるようになるかもしれません。しかし大量の研究試料が手に入るガン細胞と異なり、受精卵を研究に利用することは非常に困難であること、および微小核だけを摘出して研究する手法がなかったことから、今まで受精卵の微小核についての研究はほとんど進んでいませんでした。

本研究は染色体分離異常胚から、受精卵を生かしたまま異常染色体（微小核）を抜き取り、摘出した微小核の網羅的遺伝子解析を行うことに成功しました。今後は異常染色体を抜き取った受精卵の正常性や分離異常が生じてしまった原因などを明らかにし、出産成績を大きく改善することを目指します。一方、本研究では染色体を取り出しただけでなく、別の卵子へ移植することにも成功しました。将来的にはダウン症やターナー症候群のように染色体数の異常胚を正常化する技術などへ発展できると考えています。

謝辞 この研究は科研費、キャノン研究助成金、浅田生殖医学研究助成金などで実施されました。

<論文情報>

[掲載誌] Communications Biology

[タイトル] Extracting and analyzing micronuclei from mouse two-cell embryos fertilized with freeze-dried spermatozoa (マウス 2 細胞期胚に形成された微小核の摘出・解析方法の確立)

[著作者] 柴崎郁江^{1,2}、杉山陽大¹、鎌田裕子^{1,3}、長友啓明⁴、伊藤大祐¹、若山清香⁵、大我政敏⁶、笠井剛²、幸田尚¹、若山照彦^{1,5}

[所属] 1. 山梨大学大学院総合研究部生命環境学域、2. このはな産婦人科、3. 亀田病院、4. 山梨大学総合分析実験センター、5. 山梨大学発生工学研究センター、6. 麻布大学獣医学部

communications biology	Article
	
https://doi.org/10.1038/s42003-024-07358-0	
Extracting and analyzing micronuclei from mouse two-cell embryos fertilized with freeze-dried spermatozoa	
 Check for updates	
<small>Ikue Shibasaki^{1,2}, Hinata Sugiyama¹, Yuko Kamada^{1,3}, Hiroaki Nagatomo⁴, Daiyu Ito¹, Sayaka Wakayama⁵, Masatoshi Ooga⁶, Tsuyoshi Kasai², Takashi Kohda¹ & Teruhiko Wakayama^{1,5}✉</small>	

<補足説明>

注1. 染色体分離異常(ACS : Abnormal Chromosome Segregation)

正常な細胞の場合、細胞分裂により1セットの染色体はDNA合成後に2つの細胞(娘細胞)へ1セットずつ均等に分けられる。しかし何らかの原因で染色体が均等に娘細胞へ分離されない場合がある。分離されなかった染色体は細胞の核へ組み込まれず、細胞質内で遊離した状態となり、やがて微小核と呼ばれる直径数 μm の核を形成する。がん細胞でよくみられる現象であり、試料が容易に利用できることから、がん細胞での研究が進んでいる。

注2. 凍結乾燥精子

一般的に精子は液体窒素で凍結保存されていますが、維持管理が大変でコストが高いだけでなく、震災などで液体窒素が補充できないとすべてだめになってしまいます。そこで安全かつ低コストで精子を保存するために、精子を凍結乾燥で保存する技術が開発されました(Wakayama et al, Nature Biotech. 1998,16 : 639-641)。この技術によって、それまで液体窒素がなければ保存できなかった精子を室温でも保存できるようになりましたが、まだ完成された技術ではなく、精子の一部にはDNAダメージが生じてしまうことがわかっています。

注3. 細胞を柔らかくするため、細胞骨格の重合を阻害する薬として、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシンBとチューブリンの重合阻害剤であるコルセミドを添加しました。

<動画等の利用について>

動画1. 染色体分離異常の受精卵から微小核を除去している様子

動画2. 両方の細胞の微小核が同時に摘出されてしまう様子

動画3. 微小核を吸引すると、細胞の核までガラスピペットに吸い込まれてしまう例

上記動画あるいはカラー写真等の提供が可能です。ご入用の方は下記研究担当までご連絡ください。

(研究に関する問合せ先)

山梨大学 発生工学研究センター

教授 若山 照彦 twakayama@yamanashi.ac.jp

TEL : 055-220-8826 FAX : 055-220-8827

(広報に関する問合せ先)

山梨大学総務企画部総務課広報・渉外室

TEL : 055-220-8006 FAX : 055-220-8799

E-mail : koho@yamanashi.ac.jp