

(別紙様式 2 号)

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

高橋 由妃

専攻分野：産婦人科学

コース：

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

Dynamic Changes in Mitochondrial Distribution in Human Oocytes during Meiotic Maturation

(ヒト卵母細胞の減数分裂成熟におけるミトコンドリア分布の動的変化)

共著者：

Shu Hashimoto, Takayuki Yamochi, Hiroya Goto, Masaya Yamanaka, Ami Amo, Hiroshi Matsumoto, Masayasu Inoue, Keijiro Ito, Yoshiharu Nakaoka, Nao Suzuki, Yoshiharu Morimoto

緒言

哺乳類の卵母細胞の成熟過程において、卵母細胞の核と細胞質で異なった反応が生じる事実が報告されている。これまで、卵母細胞の核の成熟過程に関する報告は散見されているが、卵母細胞の細胞質の成熟過程に関する報告はわずかしか無い。一方、ミトコンドリアの産生する ATP が核と細胞質の成熟に重要な役割を担うとする報告もあり、卵母細胞の細胞質内におけるミトコンドリアの分布が卵子や胚の発育に重要

な因子である事実が示唆されている。ヒト卵母細胞の成熟過程におけるミトコンドリアの分布変化は明らかにされていないため、今回我々は減数分裂期の細胞質内におけるミトコンドリア分布の動的変化に関する検討を、ヒト卵子を用いて行った。

方法・対象

2013年6月から2016年2月の間、調節卵巣刺激による不妊治療を行った患者からインフォームドコンセントを得た上で、ヒト絨毛性ゴナドトロピン施行42時間後の細胞内精子注入法による精子注入の時点で、未熟卵母細胞を患者同意のもと提供を受け、直ちにあるいは追加培養後、得られた成熟卵子を使用した。

卵丘細胞を除去後、Mito Tracker Orange (M-7511, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) でミトコンドリアを染色した卵細胞(卵核 (Germinal Vesicle: GV) 卵130個、卵核胞崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown: GVBD) 卵58個を培養し、チューブリンの阻害剤であるコルヒチンあるいはアクチンフィラメントの阻害剤であるサイトカラシンBの添加群と無添加群の成熟過程をライブセルイメージング (Cell Voyager CV1000: Yokogawa Electronic, Tokyo, Japan) を用いて15分毎に40時間観察した。

次に、ミトコンドリアの構造や細胞質内分布を評価するため、固定及び脱水後の卵細胞を透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy: TEM) を用いて観察した。卵細胞を Mito Tracker Orange で染色後、Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて細胞質内におけるミトコンドリア分布の変化を評価し、核周囲及び細胞表面領域におけるミトコンドリア分布面積率を解析した。

なお本研究は、IVF なんばクリニック生命倫理委員会（承認 2009-8・2014-4）および日本産科婦人科学会生命倫理委員会（承認 144・146 号）の承認を得たものである。統計は t 検定または Fisher's protected least significant difference test を用いた。

結果

ライブセルイメージングの解析では、卵の細胞質におけるミトコンドリア分布面積は GVBD の 6 時間前に全体の 83% から 77% へ減少し、GVBD 時には 85% へ増加した ($p < 0.01$)。一方で、極体放出の前後では明らかな変化は認めなかった。

TEM による観察では、GV 卵細胞質においてミトコンドリアは大半が中心部に分布し辺縁部にはみとめない一方で、GVBD 卵では細胞質全体に均一にミトコンドリアの分布が確認された ($p < 0.01$)。また、GV 卵においては、辺縁部と比較して核周囲にミトコンドリア分布の集中が確認された ($p < 0.01$)。

細胞質内のミトコンドリア分布に細胞骨格が関与している可能性をコントロール群、コルヒチン添加群、サイトカラシン B 添加群とで比較検討した結果、ミトコンドリアの占有面積では、コルヒチン添加群では GV 期に 90% となり、GVBD の前後では変化しなかった ($p < 0.01$)。一方、サイトカラシン B の存在下ではミトコンドリア占有面積は 80% へ減少し、GVBD 時に再度緩徐に増加した。 ($p < 0.01$)。また、ミトコンドリアは GVBD 前は細胞質内にクラスター様集積を認める一方で、GVBD 後は細胞質内に均一な分布を認めた。

考察

近年の研究で、哺乳類の卵細胞では細胞質内のミトコンドリアの分布領域は卵細胞の成熟過程において明らかに変化する事が知られている。ミトコンドリアは細胞質内の 90%以上の ATP を産生しており、細胞周期の進行に重要な役割を果たしている。細胞分裂において、細胞は G2 期から有糸分裂に入るために ATP 需要は高まる。核周囲領域にミトコンドリアが移動する事は細胞周期を促進するため ATP 産生を増やすためであることが示唆される。

今回の研究において、コルヒチン及びサイトカラシン B によりミトコンドリア分布の再分配は阻害されることが示された。ヒト卵細胞の成熟過程における求心性及び遠心性のミトコンドリア分布の変化は、細胞辺縁領域に限局したマイクロフィラメントに固定される微小管によって起こる可能性が示唆された。