

博士論文

体外受精における妊娠率向上に寄与する要因および不妊原因に関する研究

2023 年 9 月

Xingqiang WEI

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

【目次】

略語一覧	3
用語集	4
概要	7
第 1 章 序論	11
第 2 章 ヒト受精卵における 1 前核胚形成メカニズムの解明	14
第 1 節 単一前核胚の発生成績	15
2.1.1 緒言	16
2.1.2 対象	18
2.1.3 採卵と培養方法	18
2.1.4 培養成績の分析	18
2.1.5 結果	20
2.1.6 考察	21
第 2 節 雌雄ゲノムの両方を含む 1PN 形成のリスク	25
2.2.1 緒言	26
2.2.2 対象	28
2.2.3 タイムラプス解析	28
2.2.4 ベクトル解析	28
2.2.5 統計分析	29
2.2.6 結果	30
2.2.7 考察	32
第 3 章 連続自動経時的観察による 3 倍体胚検出方法の確立	48
3.1 緒言	49
3.2 研究材料および研究方法	51
3.3 結果	52
3.4 考察	53
第 4 章 体外受精反復不成功患者を対象とした遺伝子変異の網羅的解析	54
4.1 緒言	55
4.2 実験材料および実験方法	57
4.2.1 研究対象者	57
4.2.2 全エクソームシーケンシング	57

4.2.3	バリアントの選別と解釈	57
4.2.4	卵巣サンプル	58
4.2.5	原始卵胞の免疫蛍光染色	58
4.2.6	統計解析	59
4.3	結果	60
4.3.1	不妊患者の特徴	60
4.3.2	不妊女性における high impact ホモ接合型変異	60
4.3.3	HWE の比較	60
4.3.4	原始卵胞における RNF17 の局在	61
4.4	考察	66
第 5 章	総括	70
謝辞		75
参考文献		76

略語一覧

IVF = in vitro fertilization: 体外受精

c-IVF = conventional in vitro fertilization: 通常な体外受精

ICSI = intracytoplasmic sperm injection: 細胞質内精子注入(顕微授精)

c-ICSI = conventional ICSI: 通常な細胞質内精子注入

Piezo ICSI = ピエゾ素子を用いての細胞質内精子注入

1PN = monopronucleated zygote: 単一前核の接合子/受精卵

2PN = two pronuclei zygote: 2つ前核の接合子/受精卵

3PN = three pronuclei zygote: 3つ前核の接合子/受精卵

MII = metaphase II: 第2減数分裂中期

CW = cytoplasmic wave: 細胞質内の波状動態

FC = fertilization cone: 受精丘

2nd PB = second polar body: 第2極体

Ca²⁺ oscillations = Ca²⁺ オシレーション

Cleavage rate = 受精卵の分割率

Blastocyst rate = 受精卵の胚盤胞発生率

HWE = Hardy-Weinberg equilibrium: ハーディー・ワインベルグ平衡

HGVD = Human Genome Variation: ヒト遺伝子変異のデータベース

用語集

1. 生殖補助医療技術 (ART)

不妊症患者の妊娠成立のために、卵子と精子、あるいは胚を体外で取り扱う治療法で体外受精、顕微授精、胚移植、卵子・精子・胚の凍結融解技術を総称して生殖補助医療技術 (Assisted Reproductive Technology : ART) と呼ぶ。

2. 体外受精(c- IVF)

卵子が入っている培養液の中に、培養液にて洗浄もしくは密度勾配法にて運動精子のみを集め、精子濃度を約 10~20 万個/mL に調整し媒精することで受精を図る方法である。

3. 顕微授精 (ICSI)

射出精子の濃度が低い、もしくは精子運動率が低く c-IVF では受精が成立しない患者を対象に、顕微鏡下で形態や運動性を判断し、良好な 1 個の精子を選んで、細いキャピラリーを用いて卵子に直接精子を穿刺して受精を図る方法である。

4. Piezo ICSI (ピエゾ ICSI) :

ピエゾ素子（電圧を力に変える素子によって生じるピペット先端の振動）により透明体や卵細胞膜に穴をあけることで、精子を細胞質内に注入する方法である。透明帯を卵細胞質内に深く押し入れることなく囲卵腔に達することができ、また一回のパルスをかけることにより、細胞膜は容易に穿破できる。この点より Piezo 法を用いた顕微授精の方が卵子に対するダメージが少なく、紡錘体を吸引し染色体と紡錘糸が切り離される危険も少ない。

5. タイムラプスシステム(Time-lapse system: TLS) :

タイムラプス (Time-lapse) 技術は、一定の時間間隔で静止画像を撮影し、これらの画像を連続的に再生することによって、動的なプロセスを視覚的に捉える手法であり、生殖医学の領域において重要性を持つ。生殖補助医療において、タイムラプス胚観察システムを活用することで、胚の培養過程を容易に追跡できる。これにより、胚を培養器外に取り出す必要がなく、受精から胚盤胞発生に至る一連の発育過程を連続的かつ詳細に観察することが可能となる。さらに、この技術を用いて、胚の細胞分裂パターンや発育の速度を評価し、胚を選定する際の貴重な情報を提供する。したがって、タイムラプス技術は生殖補助医療において新たな胚の判断材料と

して、胚発生の詳細なモニタリングと妊娠成功率の向上に寄与している。本研究では、Embryo Scope® time-lapse system (Vitrolife)と CCM-iBIS time-lapse system (ASTEC) 2種類のタイムラプスシステムを用いて胚観察を行った。

6. 受精丘

精子侵入部位の卵細胞表面に形成される突起、一過性隆起である。ウニの受精丘が cone に似ていることから fertilization cone(FC)と呼ばれているが、ヒトやマウスでは cone の形態をとらず、丘状の隆起となる。

7. Cytoplasmic wave (CW) :

精子の侵入部位より卵母細胞の対側周辺に向けて放射状に移動する細胞質内のオルガネラの動きである。

8. ROC 曲線 :

ROC 曲線 (Receiver Operating Characteristic curve) は、通信工学理論としてレーダーシステムにおけるノイズから敵機の存在を検出するための方法として開発され、敵機の存在を正確に検出する能力と、誤検出の可能性との間のトレードオフを示す。臨床研究の領域では、ROC 曲線はしばしば診断検査の有用性を評価するための有力な手法として応用されており、連続変数である独立変数と二分変数であるアウトカムとの関係の強さを客観的に評価するために利用され、診断テストの性能を客観的かつ定量的に評価する。

9. 遺伝子変異:

遺伝物質 (遺伝子を構成する DNA の塩基配列、あるいは RNA 上の塩基配列) が質的・量的に物理的变化した状態を指す。一方、染色体突然変異の場合、染色体の数や構造に変化が生じる。

10. 8.3KJPN データベース :

8300 人の日本人の全ゲノム解析を行い、一塩基バリエーション (Single Nucleotide Variant : SNV)、INDEL (挿入 (insertion, IN)・欠失 (deletion, DEL)) などの頻度情報、アレル頻度情報などをまとめたものを指す。

11. piRNA:

piRNA (PIWI-interacting RNA) は動物の生殖細胞に高く発現する約 30 塩基の小分子 RNA であり、Argonaute (AGO) ファミリーに属する PIWI タンパク質と複合

体を形成して機能する。生殖細胞のゲノム DNA を保護する役割を担っており、生殖細胞の形成や胚発生に関与する重要な遺伝子制御経路である。

12. RNF17:

piRNA 経路遺伝子の 1 つである。未分化 ES 細胞と精巣特異的に発現し、精子完成にとって不可欠であることが報告されている。

13. ハーディー・ワインベルグの法則:

ハーディー・ワインベルグの法則は、任意交配であり集団数が十分かつ他の集団と隔離され突然変異や自然選択が起こらないと仮定した場合、世代を経ても、遺伝子頻度 (gene frequencies) と遺伝子型頻度 (genotype ratios) が一定であるという法則である。つまり、突然変異が生じている場合はハーディー・ワインベルグの法則は成立しないことになる。ハーディー・ワインベルグ平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium; HWE) は、対立遺伝子 A と a において A 遺伝子の遺伝子頻度 (遺伝子プールに占める対立遺伝子の割合) を p 、a 遺伝子の遺伝子頻度を q とした場合、次世代の個体群の遺伝子型の分離比は $AA : Aa : aa = p^2 : 2pq : q^2$ となり、 $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ の式で表される。

14. ヒト遺伝子変異のデータベース (Human Genome Variation Database) :

日本人健常者のゲノム配列を解析し、遺伝的な変異やバリエーションの情報を収集・管理するためのデータベースであり、1,208 検体のエクソーム解析情報や 3,248 検体によるコホート研究の結果をもとに得られた遺伝変異情報が掲載されている。研究者や医療専門家が疾患の原因遺伝子同定や発症リスク評価のために活用されている。

概要

我が国における出産児の 14 人に 1 人が生殖補助医療により産まれており、累計で 70 万人を突破した（2019 年、厚生労働省）。本研究では体外受精において見られる異常受精および体外受精反復不成功患者を対象とした DNA の網羅的解析に焦点を当て、妊娠率向上に寄与する要因および不妊原因の両面からの解析を行った。

はじめに、体外受精後に異常受精とされている 1 前核胚形成のうち、雌雄両方のゲノムを含む 1 前核形成のメカニズムを調べ、この 1 前核由来胚移植の妥当性/安全性を調べることを目的とした。体外受精後、通常は雌雄の前核（2PN）を形成するが、約 3–6% に 1 前核（1PN）形成が起こることが報告されている。1PN 形成の原因には単為発生に起因する雌性 1PN、雄性前核形成不全による雌性 1PN、雌性前核形成不全に起因した雄性 1PN など、1 倍体 1PN となる場合の他に、雌性前核と雄性前核が形成する際或は形成された後に融合する 2 倍体の 1PN があり、後者の場合は児が生まれることがある。体外受精の場合、第二極体放出後、精子の膜融合部位に受精丘が形成され、続いて細胞質内に Cytoplasmic Wave（CW）が起こる。第二極体は雌性前核形成のサインであり、受精丘/CW は雄性前核形成のサインであることから、本研究では両サインを有する 1PN の動態解析を行い 2 倍体 1PN 形成のメカニズム解明を行った。1PN の動態解析は 2 種類の経時的自動連続観察システム（EmbryoScope: ES, VitroLife 社および iBIS, アステック社）を用いて第二極体放出の位置、受精丘もしくは CW の起点が確認できた 726 個（ES:229 個、iBIS:477 個）の接合子の後方視的解析を、岡山大学倫理委員会(研 2101-009)および英ウィメンズクリニック倫理委員会(2020-11)承認を得て行った。第二極体放出起点と受精丘/CW 起点の距離を測定し、1PN となる場合の距離のカットオフ値を ROC 曲線解析により求め、雌雄ゲノムを含む 1PN 形成の確率を

算出した。受精丘の出現から後退までの平均時間は、100（±37）分であり、受精丘後退後 15～30 分以内にすべてが受精丘後退地点より CW を開始した。第二極体放出起点と、受精丘/CW 起点の距離のカットオフ値は ES: 17 μ m (AUC: 0.987, CI: 0.976-0.999)、iBIS: 18 μ m (AUC: 0.972, 95%CI: 0.955-0.988)であった。また、雌雄ゲノムを含む 1PN の理論的発生率（半径 18 μ m 地点の表面積/全体の表面積）は 2.7%であり、IVF 全体の 1PN 率（4.3%(145/3337)）の 62.8%であった。本研究において、第二極体放出起点から半径 18 μ m 以内に精子が侵入した際に雌雄合体 1PN 形成が起こることが判明した。ヒト MII 期卵母細胞では、微絨毛・表層顆粒の分布が均一であることが報告されており、雌雄ゲノム含有 1PN 形成は自然妊娠においても同程度の確率で起こっていると推測されることから、体外受精後の雌雄両方のゲノムを含む 1PN 形成は 2PN と同等に正常受精と判断可能であることが示唆された。

次に、体外受精後に雌雄の 2 前核が確認され正常受精と判断されるも 3 倍体である胚を連続自動経時的観察により検出する方法の確立を試みた。3 倍体は 2-3%に起こり、早期流産の原因となる染色体異常の約 15%が 3 倍体であることが報告されている。体外受精で得られた胚の場合、3 倍体胚は受精後に通常 3 前核を有していることから受精後の観察で判定することが可能であると考えられてきたが、経時的自動連続観察システムにて極体放出失敗後に二つの雌性前核が融合し一つの大きな前核を形成する現象を捉えた。雌雄前核の融合は顕微授精、体外受精後にも起こり、一つの大きな前核を作ること、妊娠に至った胚の雄性前核の大きさはほぼ等しいことから、雌性前核が雄性前核より大きい場合、3 倍体もしくは、3 倍体を主体とする染色体異常胚であることが考えられる。通常の臨床で行われている胚の経時的自動連続観察にて極体放出失敗後に二つの雌性前核が融合し雌雄 2 前核を形成した症例のうち、患者よりインフォームド・コンセントが得られた場合、FISH 解析と NGS 解析を行い 3 倍体であることを

確認し、雌雄 2 前核形成の早期段階にて雌性前核が雄性前核より大きいことが認められた症例のうち、患者よりインフォームド・コンセントが得られた場合も同様に FISH 解析と NGS 解析を行い、3 倍体を主体とする染色体異常胚であることを検証する予定である（岡山大学倫理委員会承認：研 1712-001）。これにより、着床前スクリーニング検査の盲点である“XXX の 3 倍体検出”を可能にすることが出来ると同時に、受精卵の一部をサンプリングして解析するという侵襲的な方法による胚へのダメージや流産の問題を回避でき、染色体異常胚移植による流産という過程を削減できることから、母体側の負荷やリスクも軽減できる。

さらに、体外受精反復不成功患者を対象とした遺伝子変異の網羅的解析を行い、不妊原因となる遺伝子変異を調べることを目的とした解析を行った。不妊の約 10-20% は原因不明であり、原因解明が求められている。卵成熟機構には未解明の部分が存在し、不妊原因が卵の異常によるものである場合には現在の医療では治療できないことが多い。実際、体外受精反復不成功患者は少なくなく、金銭面のみならず精神面の負担も大きいことから本研究では体外受精反復不成功患者を対象に不妊原因となる遺伝子変異を探るため、2021 年 1 月から 10 月の間に英ウィメンズクリニックにおいて体外受精を行った患者のうち体外受精反復不成功患者 25 人と同クリニックスタッフで自然妊娠出産し本研究参加に同意が得られた 10 人の血液から DNA を抽出し、次世代シーケンシング（NGS）による遺伝子変異の網羅的解析を行った（岡山大学倫理委員会承認：研 2006-036）。NGS 解析の結果、自然妊娠出産者 10 人に存在しない High impact な変異が 57 遺伝子に存在し、うち 7 遺伝子（*ADAM33*, *CEP89*, *CRIPAK*, *OR52N4*, *PDZRN3*, *RAET1E*, *SPATA31A3*）において、患者群と 8.3KJPN データベースの対照群間のアレル頻度に有意な差が検出された。また、完全不妊が存在しない状態でハーディー・ワインベルグ平衡（HWE）が成立すると仮定した場合、9 遺伝子（*ADAM33*,

CEP89, OR2T29, OR52J3, OR52N4, RABL2A, RNF17, SPATA31C1, WWTR1)において対象患者における実測値と Human Genetic Variation Database (HGVD) からの算出値に乖離が生じていることが判明し、これらの遺伝子の変異が完全不妊となる原因の候補となった。

第 1 章

序論

生殖補助医療の治療過程は、卵子と精子の採取に始まる。卵子の採取は、患者個人の卵巣機能に応じた卵巣刺激法により卵胞の成長を促進し、超音波ガイド下で卵胞を穿刺吸引し複数の卵子を採取する。採卵された卵子は、一般的に体外受精（In Vitro Fertilization: IVF）もしくは顕微授精（Intracytoplasmic sperm injection: ICSI）にて受精させる。IVF と ICSI の選択は精子濃度と精子運動性から通常判断され、ある一定の基準を上回った場合は通常 IVF が最初に試みられ、受精不良の場合は ICSI となる。精子検査にて精子濃度と運動率が低い場合は男性不妊と診断され、通常は ICSI が施行される。IVF では、運動精子のみを集めたのち濃度を調整し卵子の入った培養液に添加して受精を促す。ICSI では、高倍率の倒立顕微鏡下でインジェクションニードルを使用して精子を卵細胞質内に直接注入し受精させる。受精卵は培養器（インキュベーター）内で 2 日から 5 日間培養し、良好に発育した胚を子宮内にも移植する（胚移植：Embryo transfer, ET）。我が国では 5 日間の培養にて胚盤胞期に到達した胚を移植するのが一般的である。

生殖補助医療胚培養士は、医師の指導の下で体外受精や顕微授精などの生殖補助医療手法を実施する医療技術者であり、精液検査、精子調整処理、採卵、IVF、ICSI、受精の判定、胚培養、卵子・精子・胚の凍結保存と融解などの臨床的な作業を主に遂行する。

タイムラプス(Time-lapse system: TLS) 胚観察システムの開発により、胚をインキュベーター外に取り出すことなく胚発生の連続観察が可能となり、これまで観察不可能であった受精から胚盤胞発生までの一連の動的観察から多くの現象が明らかになりつつある。実際、この 10 年間の間に、様々なタイムラプス胚観察システムが開発された。Primo Vision(Vitrolife)のように既存のインキュベーター内に小型タイムラプス機器を設置するタイプ、Embryoscope (Vitrolife)、Eeva (Early Embryo Viability Assessment) (Auxogyn)、CCM-iBIS (ASTEC)などのように、インキュベーター、カメラ、モニ

ターが一体化したタイプが存在する。この技術は斬新であるにもかかわらず、日本を含む世界中の多くの不妊治療施設が採用している。TLS により観察可能な受精から胚盤胞までの形態動態学的パラメータには、受精時の動態、前核形成までの動態、細胞分裂のタイミング、細胞分裂完了の有無、細胞の対称性、細胞質の断片化などが含まれる。生殖医療補助胚培養士や研究者がこれらのパラメータを分析し、胚の状態や適切な発育段階を評価できる一方、画像解析ソフトウェアや AI により形態動態学パラメータデータが数値化された評価法は、主観的判断や専門家の経験に依存せず、妊娠に至る最適な胚の選択を可能にする非侵襲的、非主観的な方法として進化し続けている。しかしながら、発生生物学的な知見に基づく専門家による解析、および TLS で捉えた現象の専門家による説明は必須である。

第 2 章

ヒト受精卵における 1 前核胚形成メカニズムの解明

第 1 節

単一前核胚の発生成績

2.1.1 緒言

体外受精 (In Vitro Fertilization: IVF) とは、本来体内(卵管)で起こっている受精という現象を体外に持ち出し、人工的な環境をつくって受精させる行為である。体外受精の方法には、基本的に c-IVF(conventional IVF)と精子を卵子内に直接注入する顕微授精(ICSI)の 2 種類があるが、同じ周期に 2 種類受精方法(c-IVF と ICSI) 同時に行う方法(split 法)もある。

生殖補助医療(ART)では、c-IVF または ICSI の 16～18 時間後に受精が確認され、2 つの前核(PN)の形成と第 2 極体の卵胞周囲腔への押し出しにより、正常な受精と見なされる。この時の受精卵は前核期といい、初期胚発生 段階における受精直後から分裂までの時期を指す。雄由来と雌由来の二つの前核が同一細胞質内に独立して存在する特徴的な構造を持つ。通常受精した前核期の接合子の 2 つの前核は、一般的にサイズが等しく、中央に位置している。

しかし、単一の前核(1PN)や、3 つ(3PN)または 4 つ(4PN)以上の前核を持つ接合子は、臨床でしばしば観察され、異常に受精していると見なされる。3PN または 4PN 以上の胚に関しては、多倍体染色体構成を持つと考えられ、移植後の流産や胎状妊娠のリスクが高くなると予想されている。

1PN 胚に関しては、半数体であるリスクが高いと考えられ、臨床で移植胚を選択する際に除外される場合が多い。しかし、いくつかの報告により、1PN 接合子に由来する胚盤胞が正常な健康な新生児につながる可能性があった (Staessen C, et al. 1993;

Reichman DE, et al. 2009; Gras L, et al. 1999; Dasig D, et al. 2004)。Itoi ら 2015 年の報告により、1PN 胚の胚盤胞形成率は、c-IVF および ICSI サイクルにおいて 2PN 胚よりも有意に低かったが、ICSI ではなく c-IVF の 1PN 胚盤胞は、十分な継続妊娠率があることを示した (Itoi F, et al. 2015)。

この研究の目的は、従来の体外受精(c-IVF)に由来するヒト単一前核(1PN)接合子の発生能を検証することにある。

2.1.2. 対象

2020 年 1 月から 2020 年 7 月にかけて、iBIS (Astec、日本) のタイムラプスシステムを使用して、599 人の患者の 24 個の 1PN 受精卵と 453 個の 2PN 受精卵の iBIS のタイムラプスデータを比較した。また、当院では個人情報保護法に基づいて医療情報の管理を行っており、個人情報の保護に厳重な注意を払い、体外受精、顕微授精、胚移植法を施行する際にも、個人情報の守秘・プライバシーを尊重している。また、体外受精を施行する前に、学会・論文発表などについては匿名性を保ち個人情報保護について説明し、患者の同意を文書にて得ている。

2.1.3 採卵と培養方法

卵巣刺激法は、原則として Long protocol, Short protocol または Antagonist protocol を用い、卵胞発育と E2 値をモニターしながら管理し、第二主席卵胞径が 18 mm を超えた時点で hCG 5000 単位を投与し、36 時間後に静脈麻酔下、経膈超音波ガイド下に採卵を行った。回収した卵子は Universal IVF Medium (Origio, Denmark) 中で採卵から 3~5 時間の前培養を行った。精子は二層密度勾配法にて遠心分離の後に良好なものを回収した。IVF は精子濃度を 8 万/ml に調整して媒精に供した。受精確認は媒精後の 20 時間後から、タイムラプス (Time-lapse) データを用いて行った。SAGE 1-Step medium (Origio) を用いて胚培養を行った。また、卵子、胚の培養は 37°C、5.5% CO₂、5% O₂、89.5% N₂ の気相条件下で培養を行った。

2.1.4 培養成績の分析

1PN が観察されたサイクルと観察されなかったサイクルの患者の特徴は、カイ二乗検定を用いて比較された。また、体外受精（c-IVF）後の 1PN 形成率を計算した。1PN と 2PN 受精卵の分割率および胚盤胞発生率も計算し、二乗検定を用いて比較した。3PN (there pronuclei zygote) 受精卵は、異常受精と見られ、さらなる胚発生のために培養されなかった。

この研究は、英ウィメンズクリニック（承認番号：2020-11）および岡山大学（承認番号：K2101-009）の倫理委員会によって承認された。

2.1.5 結果

本研究の患者の特徴は表 1 に記載されている。1PN が観察された周期と観察されなかった周期では、年齢、男性因子、PCO(多嚢胞性卵巣)、子宮内膜と原因不明の各項目において、それぞれの割合に有意な差がなかった。しかし、生殖補助技術を受けて治療した ART 回数、卵管因子の割合については、有意な差があった。

iBIS タイムラプスシステムによって観察された c-IVF 後の受精卵の 1PN 形成率は 4.3% (145/3,337) だった。

1PN と 2PN 受精卵の分割率および胚盤胞発生率も計算し、二乗検定を用いて比較した結果が表 2 に示明にされた。分割率について、1PN 胚は 91.0%(132/145)、2PN 胚は 97.8%(2655/2714)となり、1PN の方が有意に低い結果になった($P<0.001$)。 c-IVF 由来の 1PN の胚盤胞形成率は 31.8%(42/132)であり、2PN 胚の胚盤胞形成率は 64.2%(1422/2214)であったので、胚盤胞形成率においても、分割率と同じ様に 1PN の方が有意に低かった($P<0.001$)。

3 つ以上の前核 (3PN 以上) が確認された受精卵は、臨床で異常受精と見られ多倍体の胚としたため、胚培養は行われず培養成績の結果はなかった。

2.1.6 考察

ヒト生殖補助医療(ART)では、胚の約 1.6～7.7%が、従来の体外受精(cIVF)または細胞質内精子注入(ICSI)の後に、単一の前核(1PN)を伴う異常な接合子期を示します (Plachot M, et al. 1988; Balakier H, et al. 1993; Munne S, et al. 1993; Staessen C, et al. 1993; Reichman DE, et al. 2009; Staessen C, et al. 1997)。今回の研究では、c-IVF 後の受精卵の 1PN 形成率は 4.3% (145/3,337) であり、以前の研究と大体同じ様な発生率だった。

1PN 胚は、c-IVF 胚由来と ICSI 胚由来かを区別する必要がある。細胞遺伝学的分析によると、細胞質内精子注入(ICSI)に由来する 1PN 接合体の約 30%のみが二倍体であることが報告されている (Lim AS, et al. 2000; van der Heijden GW, et al. 2009; Yan J, et al. 2010)。これらの知見は、ICSI 由来の 1PN 接合体の大部分が単為生殖によって生成されることを示唆している。逆に、細胞遺伝学的分析では、従来の体外受精(c-IVF) から得られた 1PN 接合子の二倍体の割合が高いこと (46～80%) が確認されている (Staessen C, et al. 1993; Plachot M., et al. 1991)。実際、c-IVF 由来の 1PN 接合子の中には胚盤胞期まで発達することができるものもあり、1PN 接合子を用いた胚移植後に健常児が生まれている (Plachot M., et al. 2004; Cibelli JB, et al. 2001)。これらの観察結果に基づいて、いくつかの 1PN 接合子から健常児が生まれる可能性がある。ICSI 由来の 1PN 接合子の中には胚盤胞期まで発達することが可能なものがあるが、その胚盤胞の移植後の妊娠、健児出産は極めて稀であった。

しかし、単為生殖によって生成された 1PN 接合子は、依然として胚盤胞期まで発達することができることも知られている (Lin H, et al. 2003)。そのため、臨床応用に使用

可能な 1PN 接合子を選択するための科学的に有効なスクリーニング方法を確立する必要がある。前述のように、c-IVF 由来の使用可能な二倍体 1PN 接合体の存在が報告されているが、これらの接合体については形成される際にどんな特徴あるかはまだ不明である。

本研究では、1PN 形成ありのグループでは、生殖補助技術を受けて治療した ART 回数の割合については、有意に少なかった ($P < 0.001$)。その原因を探求するため、患者の ART 回数などを交絡因子とした多施設解析などが必要になると考えられる。

表 1. 患者背景

	Patients with 1PN	Patients without 1PN	P-value
Age	35.4 ± 4.7	37.6 ± 4.6	0.361
# of ART attempts	2.5 ± 3.2	4.5 ± 7.1	<0.001
Causes of infertility			
Male factor	9.6% (13/135)	9.0% (53/712)	0.382
Tubal factor	77.8% (105/135)	75.9% (461/712)	0.003
Myoma	8.9% (12/135)	16.4% (110/712)	0.046
Endometriosis	6.7% (9/135)	12.3% (81/712)	0.127
PCO	8.1% (11/135)	5.8% (31/712)	0.080
Others	5.9% (8/135)	1.8% (17/712)	0.045
Unexplained	11.1% (15/135)	12.0% (74/712)	0.759

カイ二乗検定

表 2. 1PN および 2PN の受精卵の分割率および胚盤胞率

			No. of zygotes	Cleavage rate	Blastocyst rate
Total # of cycles		847	3256	—	—
Total # of patients		599			
Total # of retrieved oocytes		4822			
1PN	Total		145	91.0% (132/145) ^a	31.8% (42/132) ^c
2PN	Total		2714	97.8% (2655/2714) ^b	64.2% (1422/2214) ^d
≥3PN			397	—	—

ab, cd: $p < 0.001$ (カイ二乗検定)

注：1PN = monopronucleated zygote; 2PN = two pronuclei.

第 2 節

雌雄ゲノムの両方を含む 1PN 形成のリスク

2.2.1 緒言

正常な受精は、第二減数分裂中期である metaphase II (MII) の卵母細胞に精子が卵母細胞膜と融合することで起こる。MII 卵母細胞では、染色体はスピンドル(spindle)の中心に整列している。精子が融合することで卵母細胞が活性化されると、減数分裂が再開される。卵母細胞の活性化後、染色体は分離され、非対称な分裂が起こり、第 2 極体(2nd PB)が放出される。精子が卵母細胞膜と融合すると、卵細胞質の突起が形成されることがある。この錐形の形状をした突起は、最初にウニなどで知られている fertilization cone(受精丘)と呼ばれ、雄性前核を形成する(Longo. F. J, et al. 1968)。第 2 極体放出後に、第 2 極体直下に雌性前核が形成される。ただし、2.7%~5.6%の受精卵は、1 つの前核しか形成されないと報告されている (C. Staessen, et al. 1993; H. Balakier, et al. 1993; E. Otsu, et al. 2004)。

単一前核の接合子(1PN)の形成はいくつかのパターンが考えられる： i) 精子の侵入なしに卵母細胞が受精活性化する(単為発生)、ii) 精子の侵入に続いて雌性前核形成が行われ、雄性前核が形成されない、iii) 雄性前核形成が行われ、雌性前核が形成されない、iv) 雌性と雄性の前核が形成された後に融合し、両方のゲノムが含まれる 1 つの大きな前核が形成される、および v) 前核形成時に雌雄両方のゲノムを含む 1 つの核膜である前核が形成される。最初の 3 つのパターンは半倍体であり、後の 2 つのパターンは二倍体である (図 10、図 11 参照)。

二倍体の 1PN 形成は、雄性と雌性の前核が融合した結果と考えられており、精子の侵入がスピンドル (Spindle) に近接する場合には、雌性と雄性のゲノムが組み込まれた

結果とも考えられる (Krukowska. A, et al. 2005)。雌性前核形成は常に第 2 極体の放出の場所の直下に形成され、前核が形成される前に雌性の染色体が集合する一定の時間がある (Otsuki. J., et al. 2007)。細胞質の動きの流れである細胞質の波状動態 (CW: cytoplasmic wave) と、雄性前核が最初に出現した位置から来る放射状波は、タイムラプス撮影システムが普及してからよく観察されるようになった (G. Coticchio, et al. 2018)。その結果、第 2 極体の下に位置する染色体に近い卵母細胞膜と精子が融合するときに、2 倍体 1PN が形成されるという仮説を立てた。この研究では、CW、受精丘、および第 2 極体の放出の位置に注目することにより、この仮説を証明することを目的とした。

タイムラプス (Time-lapes) システムの全ての胚の培養を使用することにより、非侵襲的に後方視的な検討が可能となった。

2.2.2 対象

2013 年 6 月から 2016 年 12 月にかけて、EmbryoScope および EmbryoScope plus (Vitrolife、日本) のタイムラプスシステムを使用し、第 2 極体の放出と受精丘および/または初期の細胞質フレアが観察された体外受精(c-IVF) の受精卵を対象に、2020 年 1 月から 2020 年 7 月にかけて、iBIS (Astec、日本) のタイムラプスシステムを使用して、20 個の 1PN 受精卵と 229 個の 2PN (2PN: two pronuclei zygote) 受精卵 (103 人の患者) の EmbryoScope および EmbryoScope plus のタイムラプスデータ、および 599 人の患者の 24 個の 1PN 受精卵と 453 個の 2PN 受精卵の iBIS のタイムラプスデータを比較した。

2.2.3 タイムラプス解析

タイムラプス画像は自動的に 15 分ごとにキャプチャされた。第 2 極体の放出位置と受精丘または CW の開始位置との距離が測定された。当院の全ての患者の受精卵は、2020 年 1 月以降、受精後 4 時間後からモニタリングされており、それぞれの卵は SAGE 1-Step 培養液 (Origio、日本) に培養された。iBIS タイムラプスシステムを使用して、受精丘が出現してから後退するまでの時間と受精丘が後退するから CW が開始するまでの時間を測定した。

2.2.4 ベクトル解析

フロー解析ソフトウェア (Flownizer 2D、DITECT、日本) を使用して、卵母細胞質内の顆粒の移動を追跡し、ベクトルを計算した。

2.2.5 統計分析

第 2 極体放出の位置と受精丘/CW の開始位置との間の距離の閾値を計算するために、受信者操作特性曲線解析が行われた。1PN が観察されたサイクルと観察されなかったサイクルの患者の特徴は、カイ二乗検定を用いて比較された。

この研究は、英ウィメンズクリニック（承認番号：2020-11）および岡山大学（承認番号：K2101-009）の倫理委員会の承認を得て行った。

2.2.6 結果

第 2 極体の位置が精子の侵入口に近接していた場合の 1PN 形成の例を図 1 (EmbryoScope タイムラプスシステムの例) と図 2 (iBIS タイムラプスシステムの例) で示す。第 2 極体放出後に受精丘が突起し、現れた。受精丘が後退された直後に、CW が細胞質を流れ、1PN が形成された。図 3 (EmbryoScope タイムラプスシステムの例) と図 4 (iBIS タイムラプスシステムの例) は、精子の侵入口から開始された CW の例である。黄色の矢印 (図 3 と図 4) に示されるように、CW の放射状の流れが明確に観察される場合、精子の侵入口を区別することができる。突起した受精丘はすぐに卵母細胞質内に後退された。受精丘が出現してから後退するまでの平均時間は 100 ± 37 分であった。卵母細胞質内の CW は、受精丘が後退してから約 15~30 分以内に発生した。

また、受精丘や CW が観察されたと観察されなかった 1PN と 2PN 胚の発育成績の結果は表 3 に示明されている。1PN 胚の分割率および胚盤胞率において、受精丘や CW が観察された 1PN は受精丘や CW が観察されなかった 1PN より、有意に高い結果になった ($P < 0.001$)。受精丘や CW が観察された 1PN、および 2PN の間には有意な差があった ($P < 0.001$)。

ベクトル解析ソフトウェアである Flownizer 2D を使用して、細胞質の波が確認された。流れの例の図 5 に示すように、より速い流れは精子の侵入口から開始される。流れの放射状の波は卵母細胞の反対側に向かって流動している。

第 2 極体放出位置と受精丘または細胞質の CW の中心/開始位置との距離の差のカットオフ値は、Embryo Scope に $17 \mu\text{m}$ (AUC : 0.987、95%CI : 0.976~0.999)、iBIS に

18 μ m (AUC : 0.972、95%CI : 0.955~0.988) であった(図 6)。

雌性ゲノムと雄性ゲノムの両方を含む 1PN 形成のメカニズムは、図 7 に示されている。卵子が中期 II のスピンドルに附近で精子と融合すると、第二極体は精子の融合点の近くで放出される。第二極体の放出の直後に、受精丘が出現する。受精丘が卵細胞質内に後退すると、卵細胞質内で CW が発生し、雄性ゲノムが雌性ゲノムに衝突する。それからは膜を共有し、雌性と雄性の両方ゲノムを含む単一の前核 (1PN) を形成することになる。

雌性ゲノムと雄性ゲノムの両方を含む 1PN 形成のリスクゾーンは、図 8 に示されている。1PN 形成のリスクゾーンは、第二極体の下方の半径 18 μ m の領域になる。卵子を球体として、図 9 のように計算するすれば、c-IVF 後の受精卵は 1PN 形成の理論的なリスクが約 2.7% であった。

2.2.7 考察

この研究では、精子が M II 卵母細胞質の膜との融合が第二極体の放出起点から 18 μ m 以内で発生すると、高い精度で 1PN が形成されることが明らかになった。精子が卵子に融合する際に、精子が任意の点から卵子に侵入すると考えられる場合、c-IVF 後の 1PN の受精卵の発生率は理論上で 2.7% になった。現在、私たちのマウスでの実験的な研究でも、細胞質のサイズが小さくなると 1PN の発生率が増加することがわかった (Okajima N, et al. 2022)。細胞質の波状動態 (CW) は精子の侵入口から開始されるため、この研究でベクトル解析によって確認されたように、雄性染色体が雌性染色体に衝突することで単一核の受精卵の形成が起こる可能性がある。自然妊娠中においても、精子がさまざまな方向から卵子に侵入する場合にも発生している。雄性和雌性のゲノムを含む 1PN 胚の形成を、c-IVF 後に自然現象として考えることもできるかもしれない。

この研究では、c-IVF 後の 1PN 形成率は 4.3% であり、文献に報告されている 1PN 発生率と同じだった。ただし、1PN 受精卵の中には、雌性前核或るいは雄性前核の形成だけから起こるものもある可能性があった (C. Staessen, et al. 1993; H. Balakier, et al. 1993; E. Otsu, et al. 2004)。Van der Heijden ら (G.W. van der Heijden, et al. 2009) は、c-IVF 後の 1PN 胚の 87% が雌性と雄性的の両方ゲノムを持っていたことを報告していた。Sultan ら (K.M. Sultan, et al. 1995) も、c-IVF 後の 1PN 胚の 62% が通常の二倍体であったことを報告した。したがって、雌性と雄性的のゲノムを含む 1PN の発生率は約 2.7%~3.7% であり、この研究で見つかった理論上の発生率 2.7% に類似している。体外受精後の 1PN に由来する一部の胚は二倍体であり、健康な乳児はそれらの胚から生まれることができるという十分な証拠がある (Yao G., et al. 2016; Itoi F., et al. 2015;

Bradley, C.K. et al. 2017; Capalbo A., et al. 2017; Hondo S., et al. 2019; Li M., et al. 2019)。

体外受精を受けた治療回数と不妊症の卵管因子や子宮筋腫の発生率において、1PN がある患者は、1PN がない患者よりも高いことが報告されている。これらの違いについては、十分な解釈を得るためにさらなる研究が必要である。

動物の細胞周期進行には、ミトゲン活性化(mitogen activation)タンパク質キナーゼとサイクリン B/CDK1 複合体の活性低下が重要であることがよく知られている (Moos J., et al. 1995; Moos J., et al. 1995)。マウスにおいては、精子がミトゲンに入ってから Ca^{2+} オシレーション/振動が起これば、ミトゲン活性化プロテインキナーゼの不活性化が同期して受精卵核の形成につながることを報告されている (Gonzalez-Garcia J.R. et al. 2014)。雌性ゲノムと雄性ゲノムの両方を含む 1PN が Ca^{2+} オシレーションと共に発生する場合、このシグナル伝達経路に従う可能性がある。

本研究では、受精丘と CW が観察された 1PN の接合子は、受精丘と CW が観察されなかった 1PN 受精卵に比べて、同様に有意に高い分割率と胚盤胞発生率であったことを示唆された。これは、1PN において単為発生により活性化された雌性 1PN が、精子の侵入がなかったために受精丘と CW が観察されなかったためであると考えられる。

c-IVF に比べて、通常な細胞質内精子注入(c-ICSI) 後の 1PN においては、非常に低い妊娠率と高い異常な染色体構成が報告されている (Mateo S., et al. 2013; Mateo S., et al. 2017; Xie P.Y., et al. 2018)。これは、精子が紡錘体の付近に注入されたときに、卵母細胞の細胞質の膜がインジェクションピペットへの吸引によって紡錘体を破壊されると、ICSI 後の 1PN で異常な染色体配置が発生する可能性があるためと理解できる

(図 12 参照)。一方、Piezo-ICSI (ピエゾ素子を用いての細胞質内精子注入) は、卵細胞質膜を破壊するために卵母細胞の細胞質の吸引を必要としないため、紡錘体の位置の観察と相まって、紡錘体に近接するゾーンに精子の注入をせず、染色体異常な 1PN 形成の回避ができると考えられる。従って、Piezo-ICSI は従来法の c-ICSI よりも優れたオプションである (Furuhashi K., et al. 2019; Mansour R. 1998)。

紡錘体が配置されているマウス卵母細胞の表面の周りで微絨毛は通常希少で短いという報告は、微絨毛の欠如が精子の侵入を阻止すると考えられてきたため、これらの条件で精子が卵母細胞の表面にどのように融合するかという問題を引き起こす (Longo F.J., et al. 1984)。マウスや他の哺乳類の卵母細胞と対照的に、Santella らの走査型電子顕微鏡の結果により、ヒトの MII 期卵母細胞の表面に長さ $1\text{--}3\mu\text{m}$ の短い微絨毛が均等に分布しており、紡錘体が配置されている卵母細胞の周り膜には微絨毛のない領域がないことが示されている (Longo F.J., et al. 1984)。従って、ヒトでは精子の侵入と融合が卵母細胞の表面のどこでも起こり得ると示唆している。これらすべてを考慮すると、自然受精によって生まれた 1PN 由来の幼児も生まれる可能性があることを考慮すべきである。現在の日本では染色体異数性の着床前遺伝子検査は許可されていないので胚の染色体数は確認できないため、この情報は不妊治療の患者にとって有用であるかもしれない。また、雌性と雄性の両方のゲノムを含む 1PN 由来の胚は、以前のように廃棄するのではなく、胚移植の選択肢としての可能性があると考えられる。

表 3. FC /CW ありの 1PN および 2PN の受精卵の分割率および胚盤胞率

			No. of zygotes	Cleavage rate	Blastocyst rate
Total # of cycles		847	3256	—	—
Total # of patients		599			
Total # of retrieved oocytes		4822			
1PN	with FC and CW		24	100% (24/24)	70.8% (17/24) ^d
	without FC and CW		121	89.3% (108/121) ^a	23.1% (25/108) ^c
2PN	with FC and CW		453	97.6% (442/453) ^b	71.6% (255/356) ^d
	without FC and CW		2261	97.9% (2213/2261) ^b	62.8% (1167/1858) ^d

ab, cd: $p < 0.001$ (カイ二乗検定)

注 : CW = cytoplasmic wave. FC = fertilization cone; 1PN = monopronucleated zygote; 2PN = two pronuclei.

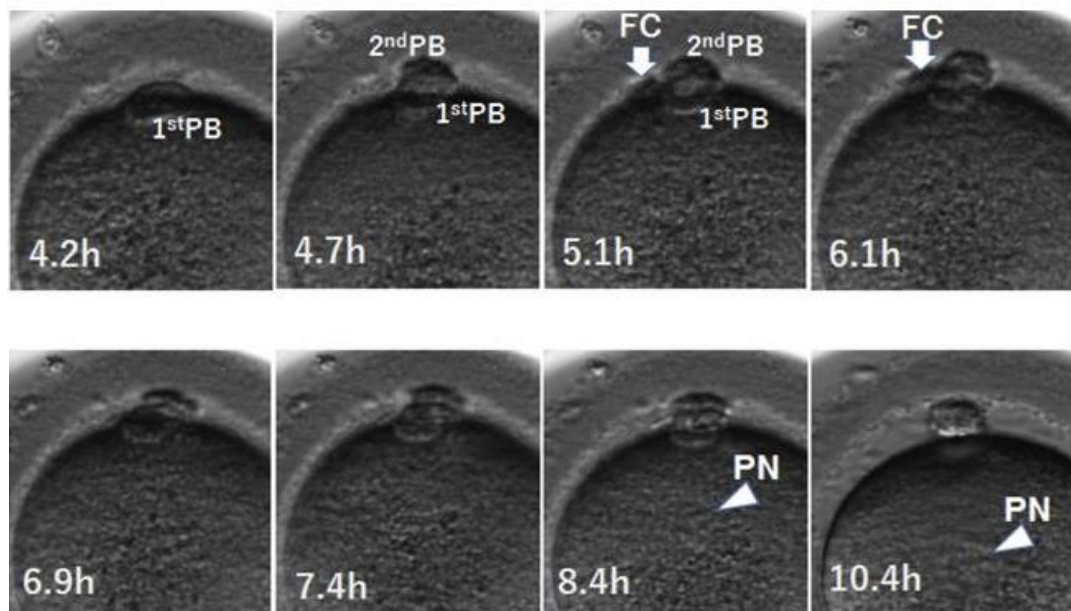


図 1. (EmbryoScope タイムラプスシステムで受精丘(FC)が確認できた例
 受精丘の出現が第 2 極体 (2nd PB : second polar body) 放出する位置に近い場合の単核
 体受精卵 (1PN) の形成。2nd PB は採卵後 4.7 時間で放出された。受精丘は授精後 5.1 時
 間に突出し、授精後 6.9 時間に後退/押し込まれた。1PN は授精後 8.4 時間には識別で
 きるレベルで形成され、授精後 10.4 時間には明確になった。

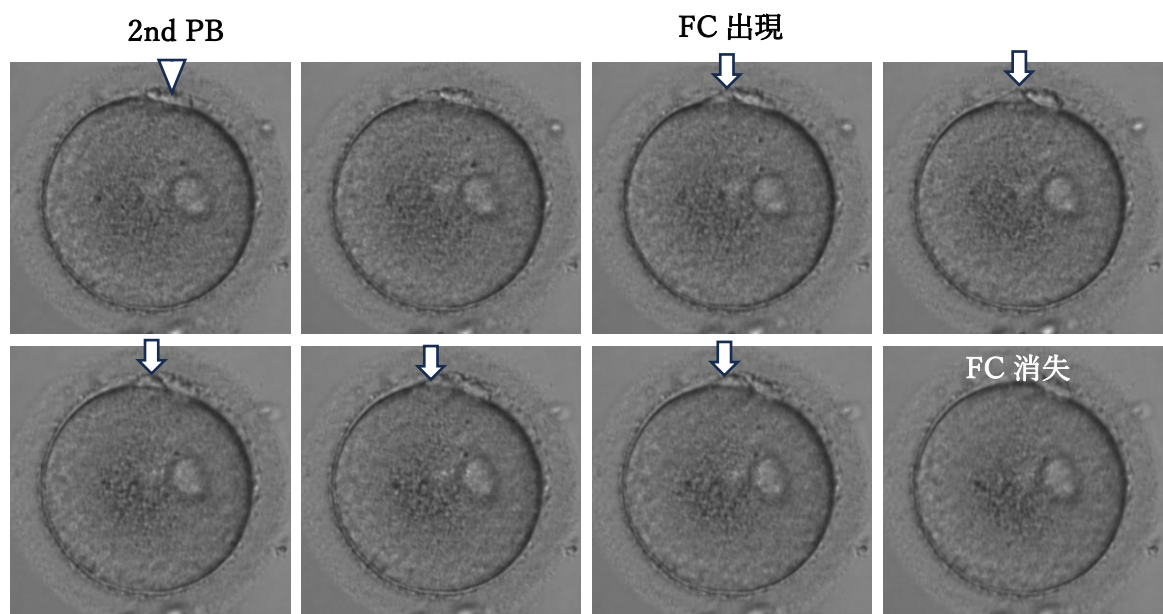


図2. iBIS タイムラプスシステムで受精丘(FC)が確認できた例
 受精丘(FC)の出現が第2極体 (2nd PB : second polar body) 放出する位置に近い場合の
 単核体受精卵 (1PN) の形成。

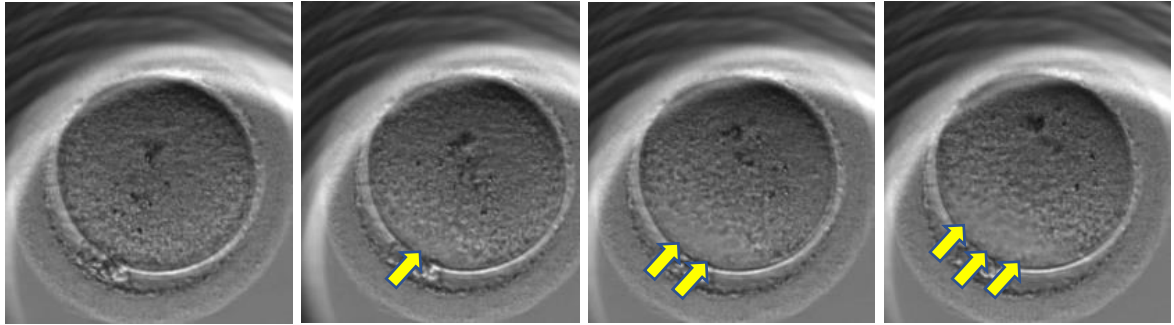


図 3. EmbryoScope タイムラプスシステムで観察された卵細胞質の波 (CW: cytoplasmic wave)の様子

卵細胞質の波(CW)は精子の侵入口から発生した。黄色い矢印は細胞質波の動きを示している。

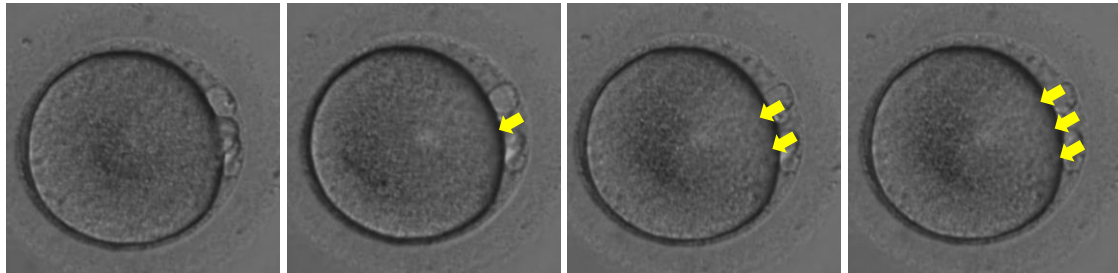


図4. iBIS タイムラプスシステムで観察された卵細胞質の波 (CW: cytoplasmic wave) の様子

卵細胞質の波(CW)は精子の侵入口から発生した。黄色い矢印は細胞質波の動きを示している。

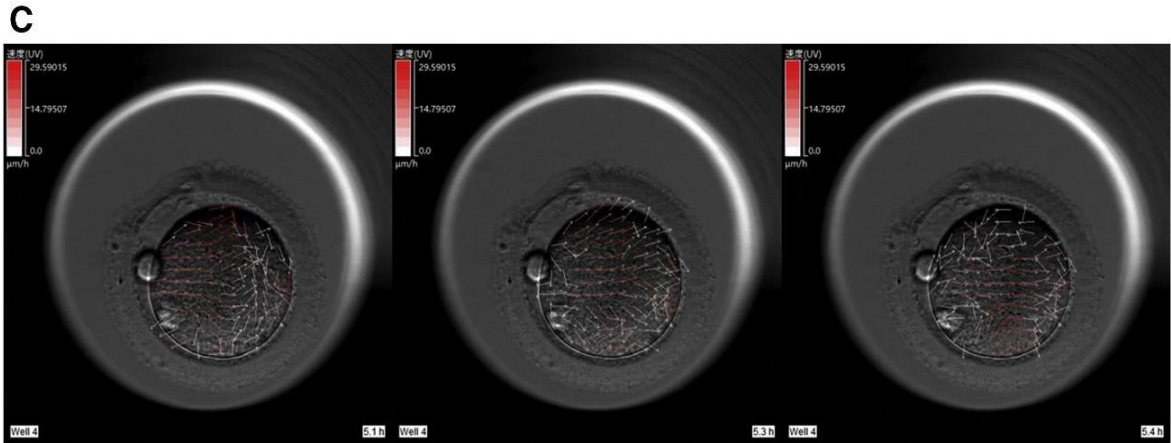


図 5. 卵細胞質の波のベクトル解析 (ベクトル解析ソフトウェア: Flownizer 2D)
 赤い矢印は最も速い流れを、白い矢印は最も遅い流れを示している。授精してからの時間は右下に示されている。より速い流れは精子の侵入口から開始される。流れの放射状の波は卵母細胞の反対側に向かって流動している。

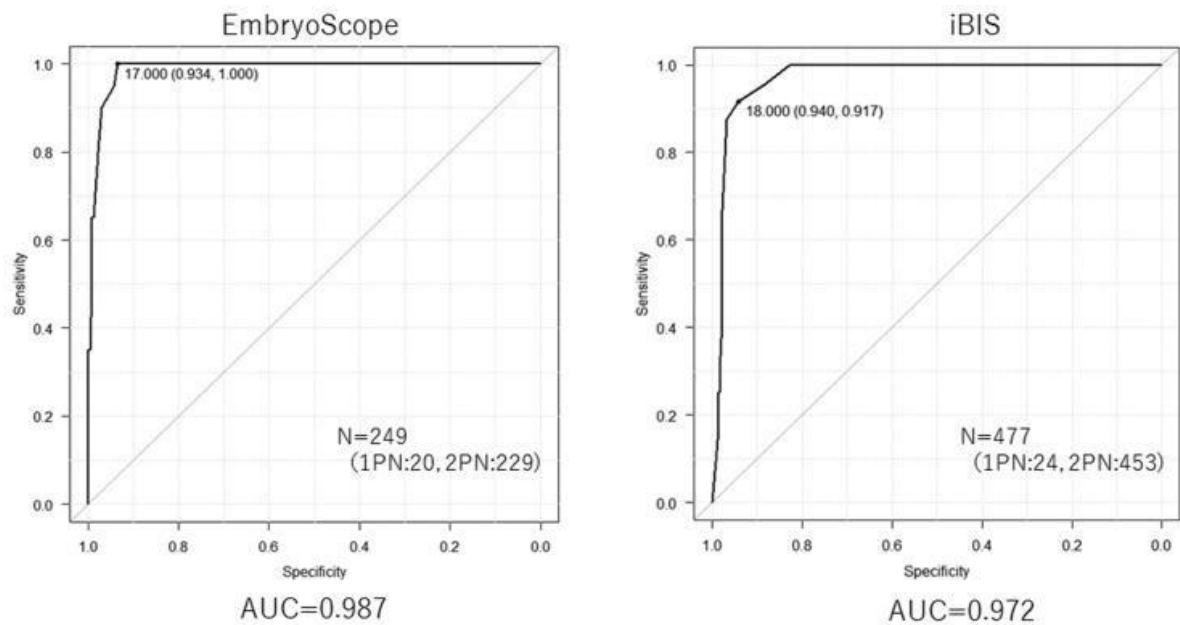


図 6. 第 2 極体放出位置と受精丘/細胞質波の始点の距離のカットオフ値
 第 2 極体放出位置と受精丘または中心/細胞質波の始点の距離の差のカットオフ値は、Embryo Scope の場合は $17\mu\text{m}$ (AUC : 0.987 ; 95%CI : 0.976~0.999) であり、iBIS の場合 $18\mu\text{m}$ (AUC : 0.972 ; 95%CI : 0.955~0.988) であった。

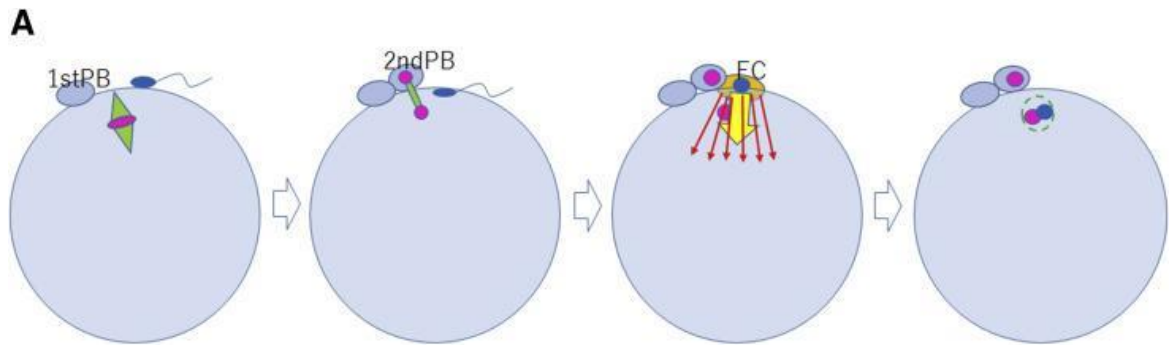


図 7. 雌性ゲノムと雄性ゲノムの両方を含む単一の前核受精卵 (1PN) 形成の示意图
 この図は、1PN 形成のメカニズムを示している。卵子が中期 II のスピンドルに近くで精子と融合すると、第二極体は精子の融合点の近くで放出される。第二極体の放出の直後、受精丘が出現する。受精丘が卵細胞質内に後退すると、卵細胞質内を流れる細胞質の波状動態 (CW) が発生し、雄性ゲノムが雌性ゲノムに衝突する。それから膜を共有し、雌性と雄性の両方ゲノムを含む単一の前核 (1PN) を形成することになる。

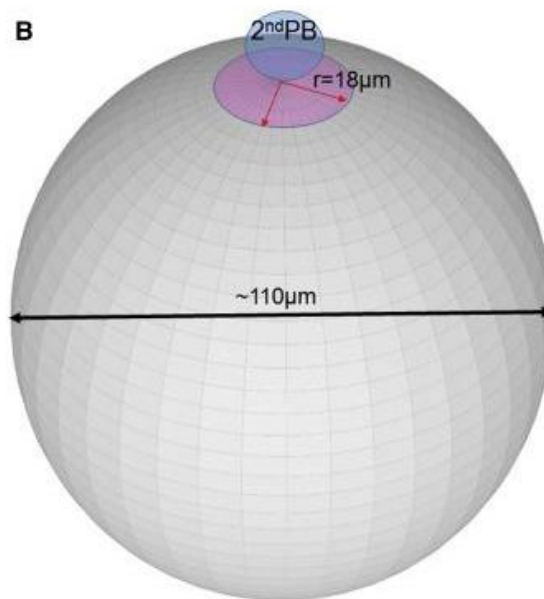
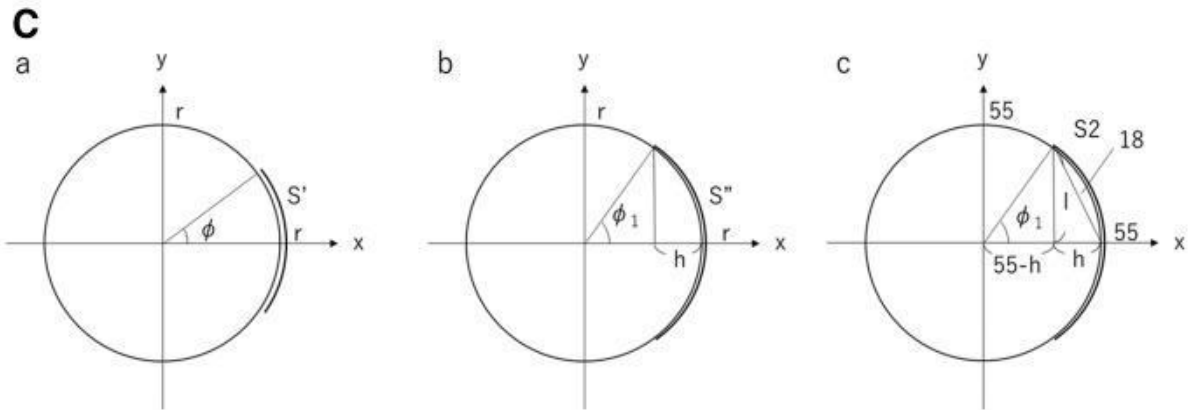


図 8. 雌雄両方のゲノムを含む単一の前核受精卵 (1PN) 形成のリスクゾーンの示意图
1PN 形成のリスクゾーンは、第二極体の下方の半径 $18\mu\text{m}$ の領域をピンク色で示している。



$$a) S' = \int_0^\phi 2\pi y dL = 2\pi \int_0^\phi y r d\theta = 2\pi r^2 \int_0^\phi \sin \theta d\theta \quad (L = r\theta)$$

$$b) S'' = 2\pi r^2 \int_0^{\phi_1} \sin \theta d\theta = 2\pi r^2 (1 - \cos \phi_1) = 2\pi rh \quad (h = r - r \cos \phi_1)$$

$$c) S_1 = 4\pi 55^2, S_2 = 2\pi 55 \cdot 3, S_2/S_1 \cdot 100 \approx 2.7(\%)$$

図9. 雄性と雌性のゲノムの両方を含む単一の前核受精卵 (1PN) 形成の理論的リスク

a) $\theta = 0$ から $\theta = \phi$ までの球冠の表面積。b) 角度が $\theta = 0$ であり、 ϕ_1 のとき、 $S'' = 2\pi rh$ 。球冠の表面積は、球冠の半径と高さによって決定されることを示す。c) $r = 55\mu\text{m}$ で、ストリングの長さが $18\mu\text{m}$ の場合、球冠の高さ (h) は $3\mu\text{m}$ である。雌性と雄性のゲノムの両方を含む 1PN の理論的リスクは約 2.7% である。

1PN = 単一の前核が形成された受精卵、 S_1 = 球の表面積、 $S_2 = \theta = 0$ から $\theta = \phi$ までの球冠の表面積。

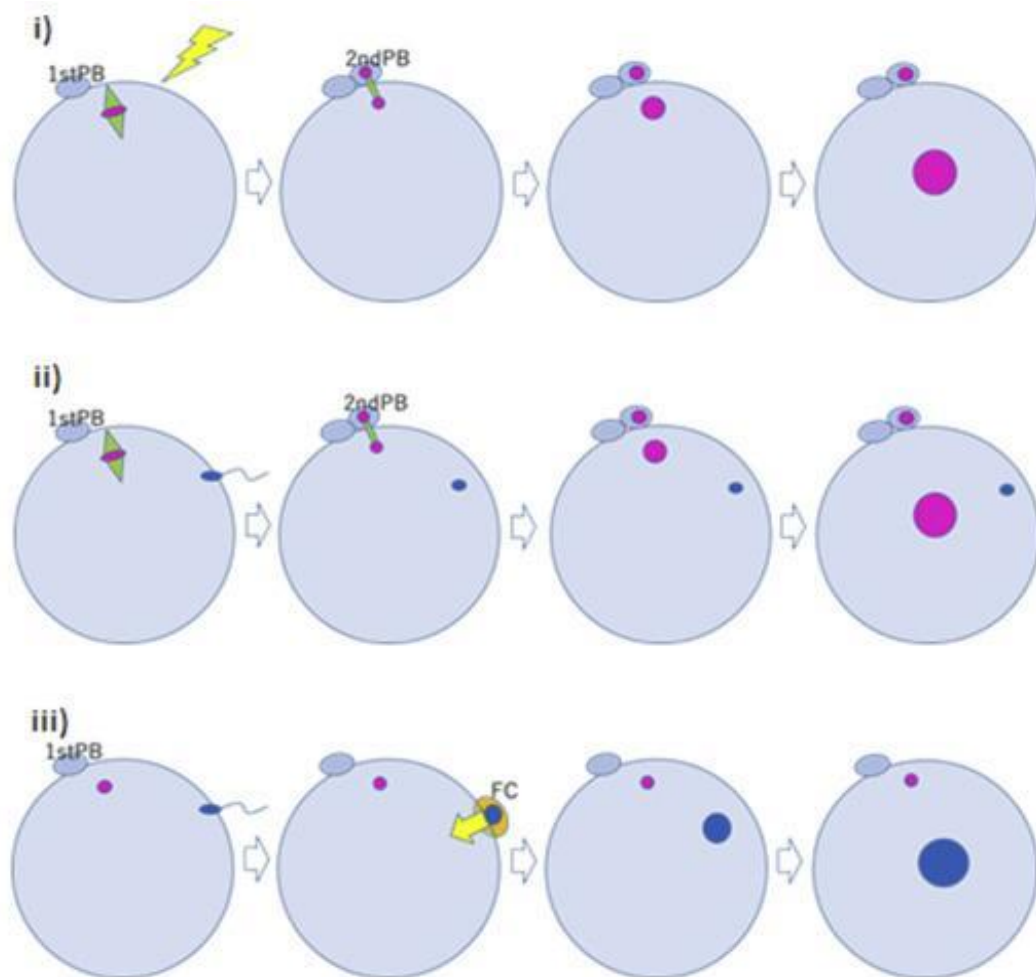


図 10. IVF 後の単一の前核受精卵 (1PN) 形成の複数のパターンの示意图

- i) IVF 後に卵子が精子による受精のない単為的活性化。
- ii) 卵子が活性化され精子が入り、雌性前核が形成されるが雄性前核が形成されない。
- iii) 雄性前核が形成されるが雌性前核が形成されない。

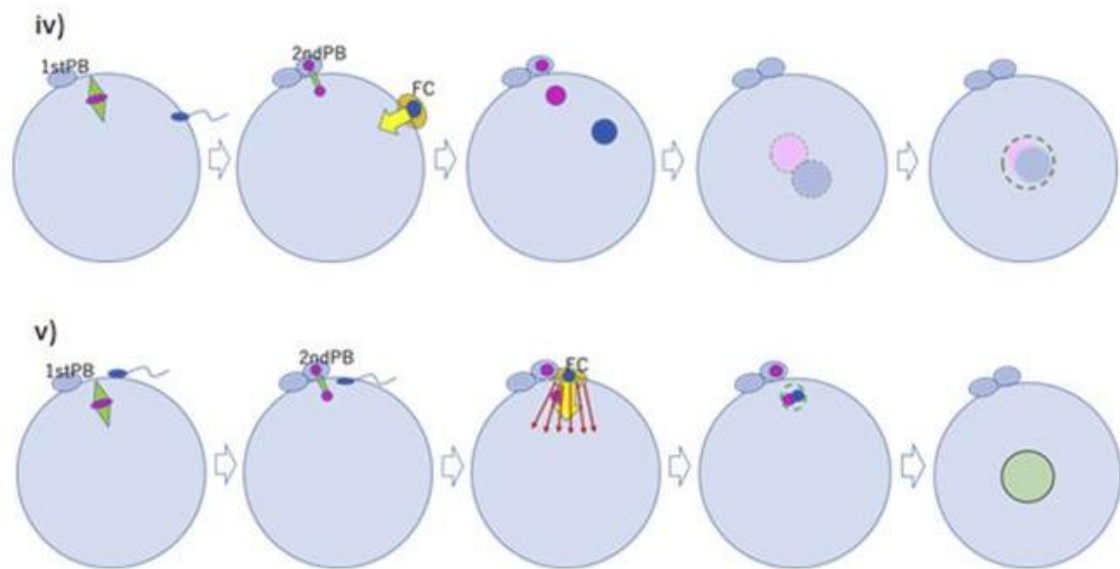


図 11. IVF 後の単一の前核受精卵 (1PN)形成の複数のパターンの示意图

iv) 雌性と雄性の前核が形成されるが、融合/結合して雌雄両方ゲノムを含む 1 つの大きな前核を作る。

v) IVF 後に雌性と雄性のゲノムを含む単一の前核の形成。

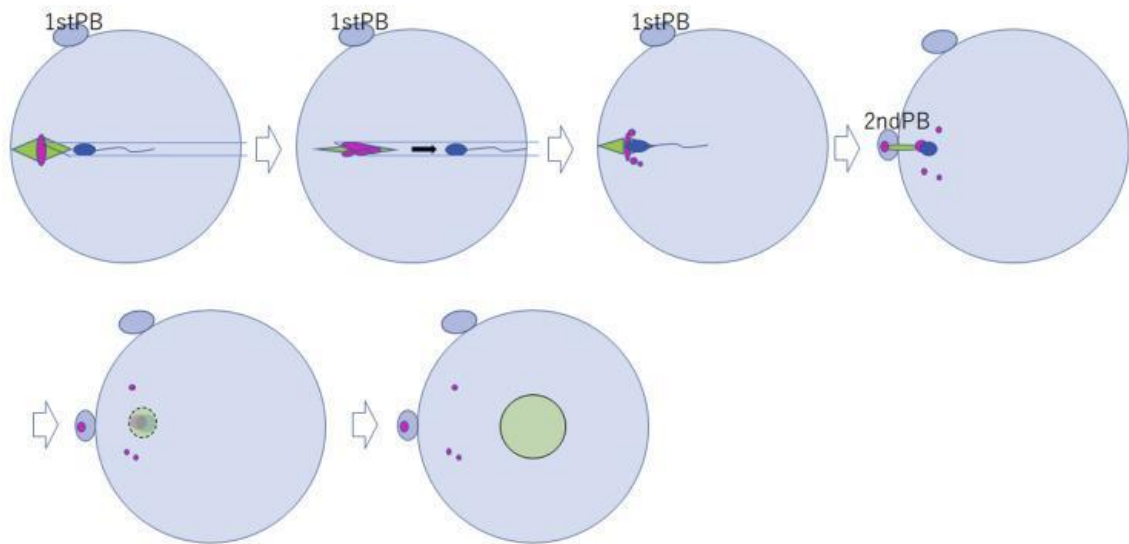


図 12. 顕微授精 (ICSI) 後の単一の前核受精卵 (1PN) 形成の示意图。

ICSI 時、卵母細胞の細胞質の膜を注射針 (injection needle) に吸引することで、スピンドル(紡錘体) が破れ、その近くに精子が注入されると、異常な染色体構成する 1PN が生じる可能性がある。

第 3 章

連続自動経時的観察による 3 倍体胚検出方法の確立

3.1 緒言

ヒトの染色体は2倍体であるのが正常であり、減数分裂、体細胞分裂時に染色体分離異常が起こった場合の殆どは生存できない。常染色体と性染色体の一部が染色体分離異常により0本（欠失）、1本（モノソミー）、3本（トリソミー）、4本（テトラソミー）のいずれかの状態になることがある他、全ての染色体が1本（1倍体）または、3本（3倍体）、4本（4倍体）であることがある。これら染色体異常のうち、21番染色体トリソミー（ダウン症）とX染色体モノソミー（ターナー症候群）は生存可能であるが、他の染色体に異常が起こった場合、発生せずに妊娠に至らないか、妊娠しても殆どが流産に至る。卵母細胞の減数分裂異常によって起こる3倍体は2－3％の頻度で起こり、早期流産の原因となる染色体異常の約15％が3倍体であることが報告されている（Chung TH et al. 2018）。しかし、減数分裂時の染色体異常分離は年齢が高くなるほど起こりやすいため、42歳以上での3倍体率は更に高いと推測される。42歳以降では80％以上の卵において、第一減数分裂もしくは第二減数分裂時に染色体異常が起こるため、胚の染色体異常を検出する着床前スクリーニングは42歳以上の不妊患者には有効と海外では認められている。しかし、胚の一部を採取することによる胚へのダメージが懸念されることから、非侵襲的な胚の染色体異常検出法が望まれる。体外受精で得られた胚の場合、3倍体胚は受精後に通常3前核を有していることから受精後の観察で判定することが可能であると考えられてきたが、見過ごされることが多々ある。Y精子の受精によるXXYの3倍体の場合は着床前スクリーニングにより判別可能であるが、X精子の受精によるXXXの3倍体の場合はaCGH法やNGS法による解析の限界により、正常2倍体と判断されてしまい、異常であるにも関わらず移植され流産後の染色体分析により初めて3倍体であることが判明することがあるの

が現状である。

よって本研究では非侵襲的に 3 倍体を判定する方法の考案を目指した。

3.2 研究材料および研究方法

胚の連続自動経時的観察システムにて通常の胚培養（胚盤胞まで）を行い、3倍体が疑われる雌雄二前核接合子の動態解析を行い、非侵襲的な連続自動経時的観察による3倍体胚の検出法開発を試みた。以下に正常受精と第二極体放出失敗による3前核胚形成および雌性前核ふたつが融合し、ひとつの大きな雌性前核と雄性前核ひとつが形成され、3倍体の2前核が形成される模式図を示した(図13)。

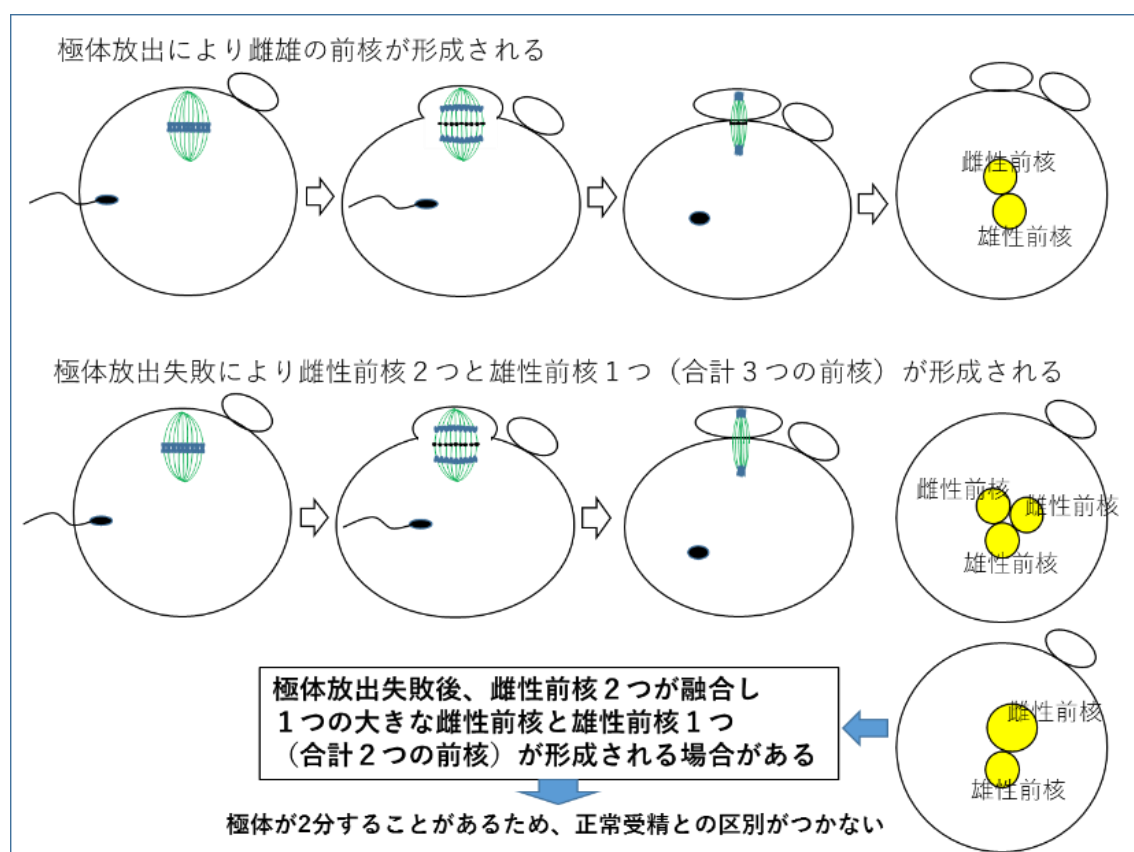


図13. 正常受精と第二極体放出失敗による3前核胚形成および3倍体の2前核(大きな雌性前核)が形成される模式図。

3.3 結果

連続自動経時的観察にて、極体放出失敗後に2つの雌性前核が融合し、一つの大きな前核を形成する現象を捉えた(図14、図15)。

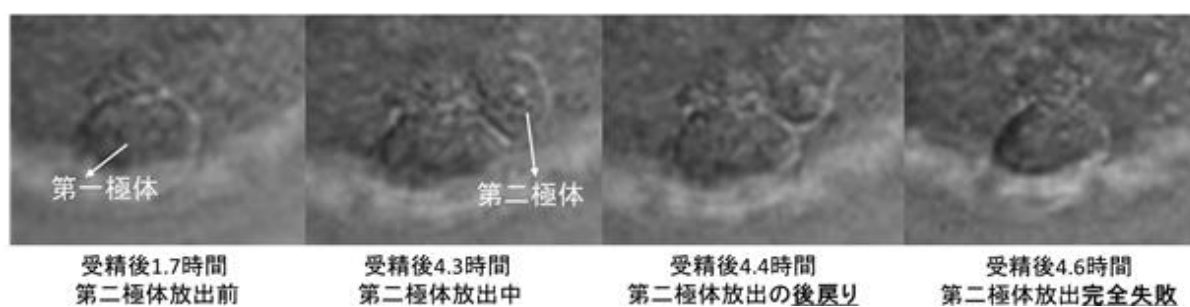


図14. 連続自動経時的観察にて撮られた第二極体放出完全失敗現象

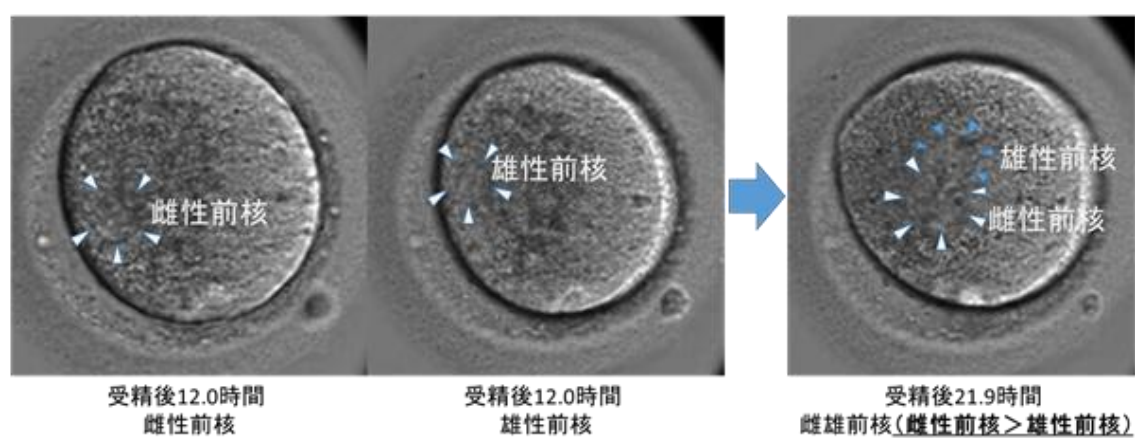


図15. 第二極体放出失敗後に二つの雌性前核が融合し一つの大きな前核を形成する現象。2倍体の雌性前核と1倍体の雄性前核である。

3.4 考察

連続自動経時的観察はこれまでのピンポイント観察では得られなかった動的变化の異常を捉えることが可能であり、異常分割のある胚の発生能が低いことが報告されている (Athayde Wirka K., et al., 2014; Nina Desai, et al., 2018; Daisuke Mashiko, et al., 2020)。ヒト卵減数分裂の際の染色体分裂をつかさどる midzone particles と関連タンパクの局在を明らかになっており (Otsuki et al., 2009)、midzone の異常が 3 倍体やトリソミーの原因と関連する可能性が考えられる。ヒトの場合、出産に至る胚の雌雄の前核の大きさは核膜消失直前にほぼ等しくなる (Otsuki et al., 2009) ことから、雌性前核が雄性前核より大きい場合、3 倍体もしくは、トリソミー胚であることが考えられる。よって、本研究で捉えた現象は連続自動経時的観察によって非侵襲的に 3 倍体胚やトリソミー胚を含む染色体異常胚を見出す方法の一助となると考えられた。また、連続自動経時的観察により非侵襲的に 3 倍体胚を見極めることにより、受精卵の一部をサンプリングして解析するという侵襲的な方法による胚へのダメージや流産の問題を回避でき、染色体異常胚移植による流産という過程を削減できることから、母体側の負荷やリスクも軽減できることが期待される。

第 4 章

体外受精反復不成功患者を対象とした遺伝子変異の網羅的 解析

4.1 緒言

補助的生殖技術（ART）は不妊のカップルが赤ちゃんを授かるのを助け、世界中でこれまでに 800 万人以上の児が産まれている。生殖期における加齢は、減少する減数分裂のエラーによる染色体異数性や多倍体胚、および染色体の構造変化を引き起こし、最大の障害の一つとなる。加齢に関わらず、多くの患者が ART の反復的な失敗により不妊のままであり、約 20%の不妊は原因不明とされている。したがって、不妊の原因を解明することが急務となっている。女性患者の不妊の原因となる可能性のある遺伝子変異に焦点を当てた研究はほとんど行われておらず、一方で多くの遺伝子変異が精子形成の障害の原因として報告されていた。現在、*PADI6*、*NLRP2*、*TLE6*、*NLRP5*、*BTG4*、*KHDC3L*、*REC114*、および *OOEP* の 8 つの遺伝子の変異が早期胚停止の原因として報告されている (Xu Y., et al. 2016; Wang X., et al. 2018; Mu J., et al. 2019; Zheng W., et al. 2020; Maddirevula S., et al. 2017; Wu L., et al. 2019; Wang W., et al. 2020; Tong X, et al. 2022; Zhang W., et al. 2019)。また、*PATL2* の変異は GV 段階の停止 (Huang L, et al. 2018) を引き起こし、*TUBB8* と *TRIP13* の変異は極体排出の失敗 (Feng R, et al. 2016; Zhang Z, et al. 2020)、*PANX1* の変異は卵母細胞の死 (Sang Q, et al. 2019)、*ZP1*、*ZP2*、*ZP3* の変異は Empty follicle 症候群 (Pujalte M, et al. 2023; Zhang Z, et al. 2022; Wang J, et al. 2021)、*WEE2*、*TLE6* および *CDC20* の変異は受精の失敗 (Sang Q, et al. 2018; Alazami AM, et al. 2015; Lin J, et al. 2020; Zhao L, et al. 2020) を引き起こすことが報告されている。

完全な受精不全や完全な卵成熟不全は非常に稀である一方、IVF や ICSI 後の、胚発育不良や反復的な着床不全となるケースは少なくない。しかしながら、胚発育不良や着床不全の原因となる分子学的および遺伝学的基盤はほとんど分かっていないのが現

状である。不妊の原因が卵母細胞の異常に関連している場合、核移植（細胞質置換、ミトコンドリア置換）などが治療法の一つとして挙げられているが、現在日本で核置換法は許可されていない。

よって、本研究では胚盤胞までの発育率が低い患者および IVF/ICSI 反復不成功患者に焦点を当て、胚発育不良および着床不全の原因となる可能性のある遺伝子変異を模索することを目指した。

4.2 実験材料および実験方法

4.2.1 研究対象者

2021 年 1 月から 10 月まで、英ウィメンズクリニックにおいて、5 回以上の IVF/ICSI 反復不成功であり、胚盤胞形成率が 10%未満の 25 人の不妊女性を対象とし、十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得ておこなった。また、自然妊娠・出産経験のある英ウィメンズクリニックのスタッフ 10 人において同様に研究参加に関してのインフォームドコンセントと同意を得たうえで正常対照群とした。

4.2.2 全エクソームシーケンシング

患者および正常対照群より 1.0-2.0 mL の血液を EDTA チューブに直接採取し、 -20°C で保存した。なお、これらの血液サンプルは英ウィメンズクリニックで採取し、岡山大学に送付した。ゲノム DNA は ISOSPIN Blood & Plasma DNA キット（日本ジーン株式会社）を使用して抽出した。ゲノム DNA サンプルはマクロジェンジャパン（株）に受託し、全エクソームシーケンシング（WES）を行った。WES は SureSelect exome capture kit（Agilent）を使用し、Hiseq / Novaseq シーケンシングシステム（イルミナ、東京、日本）で行った。

4.2.3 バリアントの選別と解釈

1000 Genome Phase3 EAS（1000 Genomes Project の東アジア人口を組み合わせた既存の変異の非リファレンスアレル頻度）においてアレル頻度が ≤ 0.20 の stop-gain, stop-lost, start-lost, frameshift, splice acceptor と splice donor などの High impact バリアントを抽出した。このうち、自然妊娠および出産のある対照群で見つかったホモ接

合型変異は不妊と関係のない遺伝子変異として除外した。次に、日本人集団での低ア
リル頻度を確認するために、8.3KJPN19 データベース (Tadaka S, et al. 2019) のアリル
頻度をさらに調べた。Human Genetic variation database (HGVD) のデータ (1,208
人のエクソームシーケンシングによって決定された遺伝子変異を含む) を使用し、ハ
ーディー・ワインベルグ平衡 (HWE) を算出した。HWE は、遺伝子変異による不妊
の結果として生じる可能性のある自然選択の発生を評価するために用いられ (Edwards
AW. G. H. 2008)、HWE は集団内の遺伝的変異の量が次の世代でも妨げる要因なしに
一定であることを示している。

4.2.4 卵巣サンプル

岡山大学病院で女性から男性への性別再編手術を受けている性同一性障害当事者の 4
人の患者から卵巣を採取した (年齢: 24-29 歳)。原始卵胞の卵巣皮質の一部を免疫
蛍光染色に供した。

4.2.5 原始卵胞の免疫蛍光染色

原始卵胞は、PBS 中の 4%PFA で 15 分間固定し、PBS 中の 0.5%トリトン X-100 溶
液で 10 分間浸透させた。5%BSA 添加 PBS にてブロックキングを行い、ウサギ由来一
次抗体である抗 RNF17 抗体 (Sigma-Aldrich, Japan, # HPA040111, 1:100) で室温 1 時
間、または 4°Cで一晩インキュベーションした。5%BSA 含有 PBS にて数回洗浄した
後、二次抗体 (ヤギ抗ウサギ IgG H&L Alexa Fluor® 488、Abcam #ab150077, 1:200)
でインキュベートした。DNA は 0.5 μ g/ml の DAPI で染色した (Shigma-aldrich,
Japan)。免疫染色後のサンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000、Olympus, Japan)
で観察した。

4.2.6 統計解析

統計解析は、R（バージョン 4.2.2）を使用してカイ二乗検定により行った。

なお、本研究は、英ウィメンズクリニック倫理審査委員会（承認番号 2020-02）および岡山大学倫理審査委員会（承認番号 K2006-036 および K1807-035）の承認を受けて行った。対象とする全ての患者から書面によるインフォームド・コンセントが得られている。

4.3 結果

4.3.1 不妊患者の特徴

患者の平均年齢は 40.5 歳で、平均 ART 治療回数は 13.1 回、ART 治療期間はそれぞれ 31.9 ヶ月だった。25 人の患者のうち、1 人（無精子症）を除いて男性不妊は無かった（表 4）。

4.3.2 不妊女性における High impact ホモ接合型変異

不妊女性の研究対象者の中で、高影響ホモ接合型変異が 57 の遺伝子で検出されたが、対照群では検出されなかった。これらの 57 の遺伝子の中で、*ADAM33* ($p = 0.009$)、*CEP89* ($p = 0.012$)、*CRIPAK* ($p < 0.001$)、*LGALS9B* ($p < 0.001$)、*PDZRN3* ($p = 0.001$)、*RAET1E* ($p = 0.007$)、*SPATA31A3* ($p = 0.045$) において、8.3KJPN と患者の間でアリル頻度に有意な差が検出された。*ADAM33* については、患者と正常対照群の間でも有意な差が検出された ($p = 0.015$)（表 5）。

4.3.3 HWE の比較

各遺伝子の HWE は、HGVD のデータを基に計算した。上記の 57 の遺伝子のうち、*ADAM33* ($p < 0.001$)、*CEP89* ($p = 0.033$)、*MICA* ($p < 0.001$)、*OR2T29* ($p = 0.003$)、*OR52J3* ($p = 0.0497$)、*RABL2A* ($p < 0.001$)、*RNF17* ($p = 0.0499$)、*SPATA31C1* ($p = 0.030$)、*WWTR1* ($p < 0.001$) において、患者と HGVD との間で有意に低い HWE が検出された。このうち *ADAM33* については、患者と正常対照群の間で有意な差が検出された ($p = 0.022$)（表 6）。

4.3.4 原始卵胞における RNF17 の局在

有意に低い HWE を示した piRNA 経路の遺伝子である RNF17 を同定した後、原始卵胞における RNF17 の局在を調べた。3次元免疫蛍光染色により、RNF17 が原始卵胞の細胞質に散在して局在していることが示された（図 16）。

表 4. 患者の背景

Patients' characteristics	Patients	Control
Ave. age $\pm$ SD	40.5 $\pm$ 4.6	34.5 $\pm$ 3.6
Ave. ART attempts	13.1 $\pm$ 13.3	0
Ave. duration of fertility treatment (months)	31.9 $\pm$ 26.4	0
Male factor	4% (1/25)*	none
fertilization failure	none	N/A
poor embryo development (<10% blastocyst rate)	All	N/A

*Asthenospermia

表 5. 体外受精反復不成功患者にのみ存在した high impact ホモ接合型変異

Gene Name	Effect	Allele frequency			P-value Patients vs 8.3KJPN
		p3 1000G EAS	8.3KJPN	Patients	
<i>ADAM33</i>	frameshift variant	0.114	0.106	0.24	0.009
<i>CEP89</i>	stop lost	0.107	0.075	0.18	0.012
<i>CRIPAK</i>	frameshift variant	0.017	0.006	0.08	0.000
<i>OR52N4</i>	stop gained	0.197	0.164	0.32	0.006
<i>PDZRN3</i>	splice acceptor variant & intron variant	0.001	0.001	0.04	0.001
<i>RAET1E</i>	frameshift variant	0.005	0.002	0.04	0.007
<i>SPATA31A3</i>	frameshift variant	0.008	0.007	0.04	0.045

Chi-squared test

上記の表は、不妊症の女性の高影響ホモ接合体変異を示す。不妊症の女性の研究対象者の中で、57 の遺伝子にて high impact のホモ接合体変異が検出されたが、対照群では検出されなかった。これらの 57 の遺伝子の中で、*ADAM33*、*CEP89*、*CRIPAK*、*PDZRN3*、*RAET1E*、*SPATA31A3* の遺伝子のアレル頻度において、8.3KJPN データベースと患者との間に有意な差があった。

表 6. ハーディー・ワインベルグ平衡 (HWE) の比較

Gene Name	Human Genetic Variation Database					Patients					P-value (Patients vs HGVD)
	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Total	HWE	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Total	HWE	
<i>ADAM33</i>	1029	136	40	1205	0.79	14	10	1	25	0.36	<0.001
<i>CEP89</i>	1014	180	8	1202	0.72	17	7	1	25	0.52	0.033
<i>OR2T29</i>	680	322	7	1009	0.46	11	12	2	25	0.27	0.003
<i>OR52J3</i>	988	162	14	1164	0.74	17	7	1	25	0.52	0.049
<i>OR52N4</i>	813	351	46	1210	0.50	11	12	2	25	0.27	0.034
<i>RABL2A</i>	716	110	29	855	0.76	14	7	4	25	0.52	<0.001
<i>RNF17</i>	949	234	26	1209	0.65	15	9	1	25	0.41	0.049
<i>SPATA31C1</i>	246	39	32	317	0.77	16	8	1	25	0.46	0.030
<i>WWTR1</i>	932	251	27	1210	0.63	11	13	1	25	0.23	<0.001

Chi-squared test

各遺伝子の HWE (ハーディー・ワインベルグ平衡) は HGVD (人類遺伝学変異データベース) のデータに基づいて計算した。上記の 57 の遺伝子の中で、*ADAM33*、*CEP89*、*MICA*、*OR2T29*、*OR52J3*、*RABL2A*、*RNF17*、*SPATA31C1*、*WWTR1* において、患者の HWE は HGVD と比較して有意に低いことが判明した。

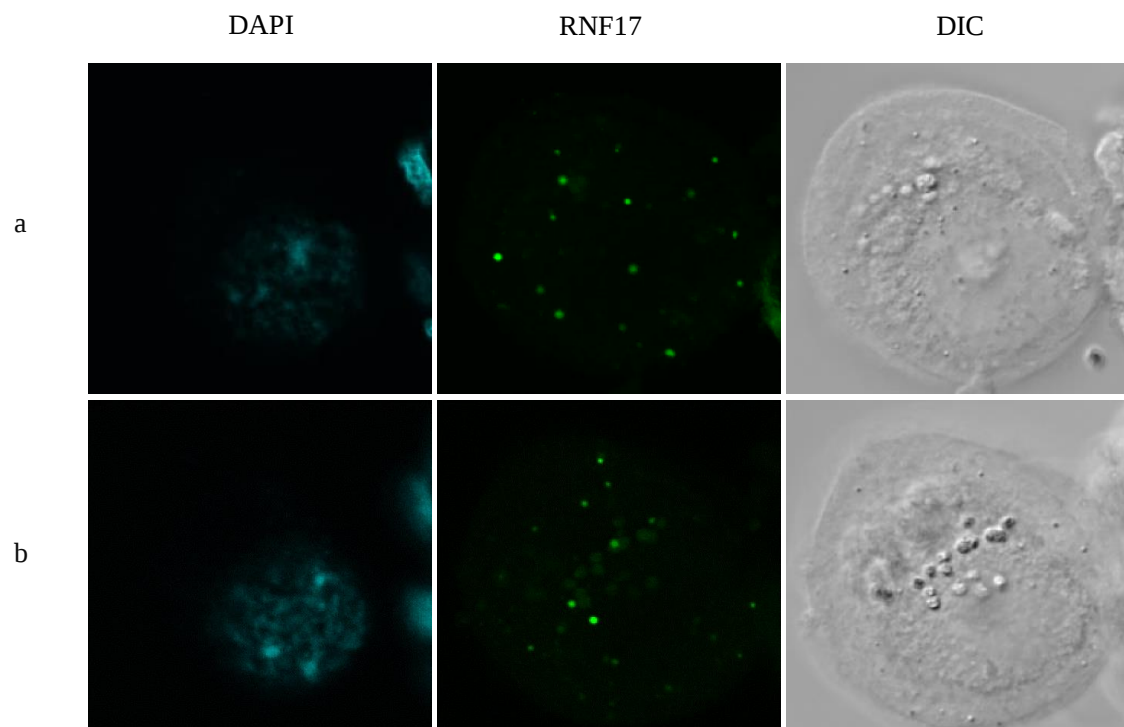


図 16. 原始卵胞における RNF17 の局在

共焦点レーザー顕微鏡で観察された原始卵胞の RNF17 の免疫蛍光染色の結果を示す。

a と b は同じ卵母細胞の異なる横断面を示す。DAPI：青色、RNF17：緑色、Scale bar: 10 μ m.

4.4 考察

本研究では、*ADAM33*、*CEP89*、*CRIPAK*、*LGALS9B*、*PDZRN3*、*RAET1E*、*SPATA31A3* の 7 つの遺伝子が、患者と 8.3KJPN データベースの間で有意に高いアレル頻度を示していることが明らかになった。その中で、*ADAM33* と *CEP89* の 2 つの遺伝子は、患者の HWE が HGVD に基づく HWE と比べて有意に低かった一方、*CRIPAK*、*LGALS9B*、*PDZRN3*、*RAET1E*、*SPATA31A3* の 5 つの遺伝子の HWE は正常妊娠出産者間に有意差は見られなかった。自然界では一般的に破壊的な力が発生するが、不妊を引き起こす可能性のある遺伝的変異は、この研究の患者と HGVD の間の HWE の違いによって測定することができる。したがって、後者の 5 つの遺伝子是不妊の原因とは考えにくい。

ADAM33 (ADAM Metallopeptidase Domain 33) は、ヒトの卵母細胞の細胞質で強く発現している。国際マウス表現型コンソーシアム (IMPC: International Mouse Phenotyping Consortium) による報告によれば、*ADAM33* のノックアウトマウスの表現型は、雄マウスではクレアチニンとカリウムの循環が増加するが、雌マウスでは増加しない。*ADAM33* が遺伝子標的化によって無効にされたマウスは、生殖能力があり、予想されるメンデルアンの比率で赤ちゃんが生まれると報告されてる (Chen C., et al. 2006)。したがって、この遺伝子の変異自体が不妊を引き起こすわけではないと考えられる。

CEP89 (Centrosomal Protein 89) は、繊毛形成やミトコンドリアの完全性に必要である (Tanos BE, et al. 2006; van Bon BW, et al. 2013)。繊毛形成と関連する経路は、細胞小器官の形成と維持であり、*CEP89* の変異は正常な胚の発育を危険にさらす可能性

がある。

さらに、*OR2T29*、*OR52J3*、*OR52N4*、*RABL2A*、*RNF17*、*SPATA31C1*、*WWTR1* の 7 つの遺伝子は、HGVD と比較して研究対象の患者の HWE が有意に低くなっていることが判明した。HWE は、遺伝子型の頻度が外部要因の影響を受けない限り、一世代から次世代にわたって一定である。よって、不妊患者の HWE が HGVD よりも有意に低いことは、遺伝子変異に起因する不妊である可能性がある。

OR2T29、*OR52J3*、*OR52N4* はすべて嗅覚シグナル経路に関連している。これらの遺伝子に関連する遺伝子オントロジー (GO) のアノテーションには、G タンパク質共役受容体 (GPCR) 活性も含まれており、多くの GPCR は、初期胚の発生に重要な役割を持つと報告されており、ES 細胞の分化過程で高レベルに発現することがわかっている (Choi HY, et al. 2015; Griffin CT, et al. 2001)。したがって、これらの遺伝子の突然変異は胚性細胞の分化にネガティブな影響を与える可能性がある。*RABL2A* (RAB、メンバー・オブ・RAS・オンコジーン・ファミリー・ライク 2A) は、エキソサイトーシスおよびエンドサイトーシス経路の調節に関連している。*RABL2A* のノックアウトマウスの表現型は、メスの不妊症とオスの異常な精巣形態を示す (IMPC)。また、*RABL2A* の突然変異を持つオスのマウスはオリゴアステノスペルミアシリオパシーを示すと報告されている (Lo JC, et al. 2012)。したがって、*RABL2A* の突然変異は人間でも不妊症を引き起こす可能性があると推測される。

RNF17 (Ring Finger Protein 17) は、RING フィンガーや Tudor ドメインを含むタンパク質をコードしており、これらは Piwi-interacting RNA (piRNA) の生成と PIWI タンパク質の piRNA への結合に不可欠である。また、piRNA 経路は生殖細胞の発育と機

能に重要である。PIWI タンパク質と関連して、piRNA は移動遺伝子要素であるトランスポゾンの活動を抑制し、生殖細胞のゲノムを保護する (Malone CD, et al. 2009; Siomi MC, et al. 2011)。RNF17 欠損の雄マウスでは、精子形成不全となり、不妊となる (Pan J, et al. 2009)。また、RNF17 はマウスの精巣において PIWI タンパク質のプロセッシングを阻害することも報告されている (Wasik KA, et al. 2015)。メスマウスは通常の生殖能力と子供の典型的な出生数を示すと報告されていたが、後に PIWI タンパク質や MOV10L1 などの piRNA 経路の構成要素はメスマウスの生殖能力には必要ではなく、ゴールデンハムスターでは重要であることが近年報告された (Hasuwa H, et al. 2021; Loubalova Z, et al. 2021; Zhang H, et al. 2021; Guan Y, et al. 2021)。piRNA は様々な種の生殖細胞で主に発現され、RNF17 はヒトの初期卵胞の卵母細胞で高い発現が報告されている (Zhang Y, et al. 2018)。したがって、RNF17 の変異は不妊を引き起こし、先に述べたゴールデンハムスターの卵母細胞での piRNA 遺伝子のノックアウトによる受精後の欠陥と類似の結果をもたらす可能性が考えられる。

SPATA31C1 (SPATA31 Subfamily C Member 1) は、細胞分化と精子形成に関与すると考えられている (Alliance of Genome Resources、2022 年 4 月)。しかし、女性の不妊に対するその影響に関する研究はまだ行われておらず不明であり更なる検討が必要である。

WWTR1 (WW Domain Containing Transcription Regulator 1) は、Hippo シグナル伝達経路において下流の調節ターゲットとして機能する転写共同活性化因子であり (Ray S, et al. 2022)、細胞の増殖とアポトーシス (Kanai F, et al. 2000; Lei QY, et al. 2008)、細胞間接触 (Zhao B, et al. 2007)、細胞極性 (Genevet A, et al. 2011; Lucas EP, et al. 2013)、細胞骨格の張力 (Dupont S, et al. 2013; Rauskolb C, et al. 2011) を制御す

る重要な役割を果たしている。また、Sox2 を抑制し、Cdx2 を促して胚盤胞の内細胞塊と栄養外胚葉への分化に働き、細胞の位置決めを制御する (Goolam M., et al. 2016; Frum T, et al. 2018)。 *WWTR1* の変異を持つ患者の胚の発育不良は、細胞分化の阻害に起因すると考えられる。 *WWTR1* ^{-/-} マウスは腎嚢胞を有し、出生数が減少していることが報告されている (Hossain Z, et al. 2007)。また、 *WWTR1* ^{-/-} マウスはメンデルの法則に従って生まれるも、ホモ接合変異を持つ児のほぼ半数が断乳時までに死亡するとされている。これは不妊の女性において *WWTR1* 変異の HWE 低下が起こっていることを説明できる可能性がある。

以上のことから、 *CEP89*、 *OR2T29*、 *OR52J3*、 *OR52N4*、 *RABL2A*、 *RNF17*、 *SPATA31C1*、 *WWTR1* の遺伝的変異は、体外受精反復不成功患者において原因となる遺伝子変異の候補となることが考えられた。さらに、piRNA 経路の遺伝子である *RNF17* と Hippo シグナル経路の遺伝子である *WWTR1* は、体外受精反復不成功患者の不妊原因の因子である可能性が高く、不妊原因と候補となることが本研究にて初めての報告となる。さらに、 *RNF17* が原始卵胞の卵母細胞質に卵母細胞散在的に局在していることも本研究による初めての知見となった。ただし、現時点ではまだサンプルサイズは比較的小さく、データの蓄積によって本研究結果を明確にする必要がある。しかしながら、本研究結果は体外受精反復不成功患者における潜在的な診断マーカーを提供できる可能性を秘めており、女性不妊の遺伝的基盤の理解に役立つと考えられた。

第 5 章

総括

生殖補助医療はここ数十年で目覚ましい発展をと遂げており、わが国における生殖補助医療技術による出産児は累計で 70 万人を突破した（2019 年、厚生労働省）が、まだまだ発展の余地があるのも事実である。本研究では体外受精において見られる異常受精および体外受精反復不成功患者を対象とした DNA の網羅的解析に焦点を当て、妊娠率向上に寄与する要因および不妊原因の両面からの解析を行った。体外受精では、一般的に採卵翌日に正常受精したかどうかを前核の観察で行う。正常に受精している場合は、通常は二つの前核(2PN)が確認されるが、前核が確認できない(0PN)、1 個しか確認できない(1PN)と 3 個(3PN) 或は 3 個以上(3PN 以上) 確認できることが時にある。移植の際は 2PN が確認出来た胚を優先するが、2PN がなく、0PN、1PN しかない場合には、患者さんと相談の上、移植をする場合がある。以前の報告により、約 3-6%に 1 前核(1PN) 形成が起こることが知られている。また、1PN 形成には単為発生に起因する 1 倍体の雌性 1PN や精子核のみの雌性 1PN と、雌雄両方のゲノムを含む 2 倍体 1PN があり、後者の場合は児が生まれることがある。

近年、様々な機能を有するタイムラプスシステムが数社より開発され不妊治療施設や胚培養に関連する研究施設に導入されてきた。さらに、AI を用いた良好胚選別法の開発も進んでいる。生殖補助医療においての利点は、タイムラプス胚観察システムを使用することで、胚を培養器外に取り出すことなく、胚の連続観察が可能となり、胚発生段階においてこれまで観察することのできなかった、受精後の様々な細胞質内イベントから胚盤胞発生までの一連の動的観察が容易となったことにある。また、タイムラプス観察システムでの胚発生解析は、今後もさらに発展し、妊娠に至る染色体異数性の無い正常胚選択するための重要なツールとなる可能性を秘めている。本研究では、タイムラプスシステムを使用し、第 2 極体の放出と受精丘および/または初期の細胞質フレアが観察された c-IVF の 1PN 受精卵と 2PN 受精卵のタイムラプスデータを比較検討した。観察された結果としては、第二極体放出後、精子の膜融合部位に受精

丘が形成され、続いて細胞内に Cytoplasmic Wave (CW) が起こる。受精丘の出現から後退までの平均時間は、100 (±37) 分であり、受精丘後退後 15~30 分以内にすべてが受精丘後退地点より CW を開始した。また、精子の融合が第 2 極体(2nd PB=second polar body) 放出起点から 18 μ m 以内で起こると、1PN 胚が形成されることが高精度で見出された。精子が卵母細胞の細胞質膜のどこかで融合すると考えられる場合、体外受精後に 1PN が発生する理論的な確率は 2.7% であった。ヒト MII 期卵母細胞では、微絨毛・表層顆粒の分布が均一であることが報告されており、雌雄ゲノム含有 1PN 形成は自然妊娠においても同程度の確率で起こっていると推測される。

卵母細胞の減数分裂異常によって起こる 3 倍体は 2 - 3 % の頻度で起こり、早期流産の原因となる染色体異常の約 15% が 3 倍体であることが報告されている。しかし、減数分裂時の染色体異常分離は年齢が高くなるほど起こりやすいため、42 歳以上での 3 倍体率は更に高いと推測される。42 歳以上では 80 % 以上の卵において、第一減数分裂もしくは第二減数分裂時に染色体異常が起こるため、胚の染色体異常を検出する着床前スクリーニングは 42 歳以上の不妊患者には有効と海外では認められている。しかし、胚の一部を採取することによる胚へのダメージが懸念されることから、非侵襲的な胚の染色体異常検出法が望まれる。近年では連続自動経時的観察が可能となり、これまでのピンポイント観察では得られなかった動的变化の異常を捉えることが可能となり、異常分割のある胚の発生能が低いことが報告されている。ヒト卵減数分裂の際の染色体分裂をつかさどる midzone には減数分裂関連の様々なタンパクが局在することが明らかになっており、midzone の異常が 3 倍体やトリソミーの原因と関連する可能性が考えられる。ヒトの場合、出産に至る胚の雌雄の前核の大きさは核膜消失直前にほぼ等しくなることから、雌性前核が雄性前核より大きい場合、3 倍体もしくは、トリソミー胚であることが考えられる。よって、本研究で捉えた現象は連続自動経時的観

察によって非侵襲的に3倍体胚やトリソミー胚を含む染色体異常胚を見出す方法の一助となると考えられた。また、連続自動経時的観察により非侵襲的に3倍体胚を見極めることにより、受精卵の一部をサンプリングして解析するという侵襲的な方法による胚へのダメージや流産の問題を回避でき、染色体異常胚移植による流産という過程を削減できることから、母体側の負荷やリスクも軽減できることが期待される。

体外受精により多くの不妊患者が児をえることが出来るようになったが、不妊の約10–20%は原因不明であり、原因解明が求められている。卵成熟機構には未解明の部分が存在し、不妊原因が卵の異常によるものである場合には現在の医療では治療できないことが多い。実際、体外受精反復不成功患者は少なくなく、金銭面のみならず精神面の負担も大きい。本研究では体外受精反復不成功患者を対象に不妊原因となる遺伝子変異を見つけることを目的とし、体外受精を行った患者のうち体外受精反復不成功患者と自然妊娠出産者の血液からDNAを抽出し、次世代シーケンシング(NGS)による遺伝子変異の網羅的解析を行った。NGS解析の結果、自然妊娠後出産者に存在しないHigh impactな変異が57遺伝子に存在し、うち7遺伝子(*ADAM33*, *CEP89*, *CRIPAK*, *OR52N4*, *PDZRN3*, *RAET1E*, *SPATA31A3*)において、患者群と8.3KJPNデータベースの対照群間のアレル頻度に有意な差が検出された。また、完全不妊が存在しない状態でハーディー・ワインベルグ平衡(HWE)が成立すると仮定した場合、9遺伝子(*ADAM33*, *CEP89*, *OR2T29*, *OR52J3*, *OR52N4*, *RABL2A*, *RNF17*, *SPATA31C1*, *WWTR1*)において対象患者における実測値とHuman Genetic Variation Database(HGVD)からの算出値に乖離が生じていることが判明し、これらの遺伝子の変異が完全不妊となる原因の候補となった。今後、大型データベースを利用した大規模解析による確認を予定している。

現在、世界中や日本国内でも着床前スクリーニング検査 PGT-A は着床前診断の主流の技術となっており、生検による胚に与える損傷、PGT-A の誤判定、モザイク胚の判断、判定不能胚の存在などの問題が依然として解決されていない。一方、タイムラプス胚観察装置の AI 診断化が試みられており、本研究の成果である雌雄両方のゲノムを含む 1 PN 形成や 3 倍体 2 PN の検出は、今後の AI 化および生殖補助医療に大いに貢献すると思われる。さらに、本研究で判明して不妊原因となる可能性のある遺伝子変異は、大規模解析が望まれるも、確実なものとなった際は、治療法の開発のみならず、患者の金銭面や精神面の負担も軽減できることが期待される。

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、温かいご指導およびご教示を賜りました岡山大学環境生命科学研究科生殖補助医療学研究室の大月純子准教授に心より感謝いたします。また、田崎秀尚助教および当研究室の皆様方に深く感謝いたします。

また、あらゆる面で支えていただいた英ウィメンズクリニックの塩谷雅英先生、苔口昭次先生、江夏徳寿先生、岩崎利郎先生と古橋孝祐氏などの皆様方に深く感謝いたします。

研究面ならびに研究面以外のサポートと日ごろから多くの助言とご指導を頂いた、岡山大学大学院環境生命科学研究科動物応用微生物学の森田英利教授、動物生理学の齋藤昇教授、動物遺伝学の辻 岳人准教授には心より感謝申し上げます。また、ベクトル解析における技術的支援に対して福井健太郎先生に感謝いたします。

DNA 研究は日本学術振興会（KAKENHI グラント番号 20K09620）の支援を受けて行われました。著者は血液サンプルの収集に対して前西文秋氏に支援を受けたことに感謝します。

最後に、長きにわたり学生生活の支援ならびに本研究の完遂に集中させていただいた家族に心から感謝いたします。

2023 年 9 月

参考文献

日本産婦人科学会会告「生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解」．日本産科婦人科学会雑誌,61: 139, 2009.

Wei X, Enatsu N, Furuhashi K, Iwasaki T, Kokeyuchi S, Shiotani M, Otsuki J. Developmental trajectory of monopronucleated zygotes after in vitro fertilization when they include both male and female genomes. *Fertil Steril*. 2022 Jan;117(1):213-220. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.08.036. Epub 2021 Sep 20.

A. Capalbo, N. Treff, D. Cimadomo, X. Tao, S. Ferrero, A. Vaiarelli, et al., Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles, *Fertil Steril*, 108, 2017, 1007–1015.e3.

A. Krukowska and A.K. Tarkowski, Mouse zygotes with one diploid pronucleus formed as a result of ICSI can develop normally beyond birth, *Mol Reprod Dev*, 72, 2005, 346–353.

Alazami AM, Awad SM, Coskun S, Al-Hassan S, Hijazi H, Abdulwahab FM, et al. TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic lethality. *Genome Biol*. 2015 Nov 05;16: 240.

Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril*. 2014

Jun;101(6):1637-48. e1-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.050.

Balakier H, Squire J, Casper RF. Characterization of abnormal one pronuclear human oocyte by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1993;8: 402–8.

C. Staessen, C. Janssenswillen, P. Devroey and A.C. Van Steirteghem, Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization, *Hum Reprod*, 8, 1993, 221–223.

C.K. Bradley, M.V. Traversa, N. Hobson, A.J. Gee and S.J. McArthur, Clinical use of monopronucleated zygotes following blastocyst culture and preimplantation genetic screening, including verification of biparental chromosome inheritance, *Reprod Biomed Online*, 34, 2017, 567–574.

Chen C, Huang X, Sheppard D. ADAM33 is not essential for growth and development and does not modulate allergic asthma in mice. *Mol Cell Biol.* 2006 Sep;26(18):6950-6.

Choi HY, Saha SK, Kim K, Kim S, Yang GM, Kim B, et al. G protein-coupled receptors in stem cell maintenance and somatic reprogramming to pluripotent or cancer stem cells. *BMB Rep.* 2015 Feb;48(2):68-80.

Chuang TH, Hsieh JY, Lee MJ, Lai HH, Hsieh CL, Wang HL, Chang YJ, Chen SU. Concordance between different trophoctoderm biopsy sites and the inner cell mass of chromosomal composition measured with a next-generation sequencing platform. *Mol Hum Reprod.* 2018 Dec 1;24(12):593-601. doi: 10.1093/molehr/gay043.

Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD. Somatic cell nuclear transfer in humans: pronuclear and early embryonic development. *J Regen Med.* 2001; 2:25–31. [Google Scholar]

Dasig D, Lyon J, Behr B, Milki AA. Monozygotic twin birth after the transfer of a cleavage stage embryo resulting from a single pronucleated oocyte. *J Assist Reprod Genet.* 2004; 21:427–9. doi: 10.1007/s10815-004-8758-2.

Desai N, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertil Steril.* 2018 Apr;109(4):665-674. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.025. Epub 2018 Feb 13. PMID: 29452698.

Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011 Jun 08;474(7350):179-83.

E. Otsu, A. Sato, M. Nagaki, Y. Araki and T. Utsunomiya, Developmental potential and chromosomal constitution of embryos derived from larger single pronuclei of human zygotes used in in vitro fertilization, *Fertil Steril*, 81, 2004, 723–724.

Edwards AW. G. H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetics.* 2008 Jul;179(3):1143-50.

F. Itoi, Y. Asano, M. Shimizu, H. Honnma and Y. Murata, Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes, *J Assist Reprod Genet*, 32, 2015, 1401–1407.

F.J. Longo and D.Y. Chen, Development of surface polarity in mouse eggs, *Scan Electron Microsc*, (Pt 2), 1984, 703–716.

F.J. Longo and E. Anderson, The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, *Arbacia punctulata*, *J Cell Biol*, 39, 1968, 339–368.

Feng R, Yan Z, Li B, Yu M, Sang Q, Tian G, et al. Mutations in TUBB8 cause a multiplicity of phenotypes in human oocytes and early embryos. *J Med Genet*. 2016 Oct;53(10):662-71.

Frum T, Murphy TM, Ralston A. HIPPO signaling resolves embryonic cell fate conflicts during establishment of pluripotency in vivo. *Elife*. 2018 Dec 11;7.

G. Coticchio, M. Mignini Renzini, P.V. Novara, M. Lain, E. De Ponti, D. Turchi, et al., Focused timelapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability, *Hum Reprod*, 33, 2018, 23–31.

G. Yao, J. Xu, Z. Xin, W. Niu, S. Shi, H. Jin, et al., Developmental potential of clinically discarded human embryos and associated chromosomal analysis, *Sci Rep*, 6, 2016, 23995.

G.W. van der Heijden, I.M. van den Berg, E.B. Baart, A.A. Derijck, E. Martini and P. de Boer, Parental origin of chromatin in human monopronuclear zygotes revealed by asymmetric histone methylation patterns, differs between IVF and ICSI, *Mol Reprod Dev*, 76, 2009, 101–108.

Genevet A, Tapon N. The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. *Biochem J*. 2011

Jun 01;436(2):213-24.

Goolam M, Scialdone A, Graham SJL, Macaulay IC, Jedrusik A, Hupalowska A, et al. Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos. *Cell*. 2016 Mar 24;165(1):61-74.

Gras L, Trounson AO. Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization. *Hum Reprod*. 1999; 14:1869–71. doi: 10.1093/humrep/14.7.1869.

Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*. 2001 Aug 31;293(5535):1666-70.

Guan Y, Wang PJ. Golden opportunity for piRNA in female fertility. *Nat Cell Biol*. 2021 Sep;23(9):936-8.

H. Balakier, J. Squire and R.F. Casper, Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization, *Hum Reprod*, 8, 1993, 402–408.

Hasuwa H, Iwasaki YW, Au Yeung WK, Ishino K, Masuda H, Sasaki H, et al. Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters. *Nat Cell Biol*. 2021 Sep;23(9):1002-12.

Hossain Z, Ali SM, Ko HL, Xu J, Ng CP, Guo K, et al. Glomerulocystic kidney disease in

mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 30;104(5):1631-6.

Huang L, Tong X, Wang F, Luo L, Jin R, Fu Y, et al. Novel mutations in *PATL2* cause female infertility with oocyte germinal vesicle arrest. *Hum Reprod*. 2018 Jun 01;33(6):1183-90.

Itoi F, Asano Y, Shimizu M, Honnma H, Murata Y. Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Sep;32(9):1401-7. doi: 10.1007/s10815-015-0518-y. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26111861; PMCID: PMC4595390.

J. Moos, P.E. Visconti, G.D. Moore, R.M. Schultz and G.S. Kopf, Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs, *Biol Reprod*, 53, 1995, 692–699.

J. Moos, Z. Xu, R.M. Schultz and G.S. Kopf, Regulation of nuclear envelope assembly/disassembly by MAP kinase, *Dev Biol*, 175, 1996, 358–361.

J. Otsuki and Y. Nagai, A phase of chromosome aggregation during meiosis in human oocytes, *Reprod Biomed Online*, 15, 2007, 191–197.

J.R. Gonzalez-Garcia, J. Bradley, M. Nomikos, L. Paul, Z. Machaty, F.A. Lai, et al., The dynamics of MAPK inactivation at fertilization in mouse eggs, *J Cell Sci*, 127, 2014, 2749–2760.

K. Furuhashi, Y. Saeki, N. Enatsu, T. Iwasaki, K. Ito, Y. Mizusawa, et al., Piezo-assisted ICSI improves fertilization and blastocyst development rates compared with conventional ICSI in women aged more than 35 years, *Reprod Med Biol*, 18, 2019, 357–361.

K.M. Sultan, S. Munné, G.D. Palermo, M. Alikani and J. Cohen, Chromosomal status of unipronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, *Hum Reprod*, 10, 1995, 132–136.

Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, et al. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J*. 2000 Dec 15;19(24):6778-91.

L. Santella, M. Alikani, B.E. Talansky, J. Cohen and B. Dale, Is the human oocyte plasma membrane polarized? *Hum Reprod*, 7, 1992, 999–1003.

Lei QY, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, et al. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol*. 2008 Apr;28(7):2426-36.

Lim AS, Goh VH, Su CL, Yu SL. Microscopic assessment of pronuclear embryos is not definitive. *Hum Genet*. 2000; 107:62–68. doi: 10.1007/s004390000335. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Lin H, Lei J, Wininger D, Nguyen MT, Khanna R, Hartmann C, Yan WL, Huang SC. Multi-lineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells*. 2003; 21:152–161. doi: 10.1634/stemcells.21-2-152.

Lin J, Xu H, Chen B, Wang W, Wang L, Sun X, et al. Expanding the genetic and phenotypic spectrum of female infertility caused by TLE6 mutations. *J Assist Reprod Genet.* 2020 Feb;37(2):437-42.

Lo JC, Jamsai D, O'Connor AE, Borg C, Clark BJ, Whisstock JC, et al. RAB-like 2 has an essential role in male fertility, sperm intra-flagellar transport, and tail assembly. *PLoS Genet.* 2012;8(10): e1002969.

Loubalova Z, Fulka H, Horvat F, Pasulka J, Malik R, Hirose M, et al. Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs. *Nat Cell Biol.* 2021 Sep;23(9):992-1001.

Lucas EP, Khanal I, Gaspar P, Fletcher GC, Polesello C, Tapon N, et al. The Hippo pathway polarizes the actin cytoskeleton during collective migration of *Drosophila* border cells. *J Cell Biol.* 2013 Jun 10;201(6):875-85.

M. Li, Y. Dang, Y. Wang, J. Li and P. Liu, Value of transferring embryos derived from monopronucleated (1PN) zygotes at the time of fertilization assessment, *Zygote*, 28, 2020, 241–246.

Maddirevula S, Coskun S, Alhassan S, Elnour A, Alsaif HS, Ibrahim N, et al. Female Infertility Caused by Mutations in the Oocyte-Specific Translational Repressor PATL2. *Am J Hum Genet.* 2017 Oct 05;101(4):603-8.

Malone CD, Hannon GJ. Molecular evolution of piRNA and transposon control pathways in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2009; 74:225-34.

Mansour R. Intracytoplasmic sperm injection: a state of the ART technique. *Hum Reprod Update*. 1998 Jan-Feb;4(1):43-56. doi: 10.1093/humupd/4.1.43.

Mashiko D, Ikeda Z, Yao T, Tokoro M, Fukunaga N, Asada Y, Yamagata K. Chromosome segregation error during early cleavage in mouse pre-implantation embryo does not necessarily cause developmental failure after blastocyst stage. *Sci Rep*. 2020 Jan 21;10(1):854. doi: 10.1038/s41598-020-57817-x.

Mu J, Wang W, Chen B, Wu L, Li B, Mao X, et al. Mutations in. *J Med Genet*. 2019 Jul;56(7):471-80.

Munne S, Tang Y, Grifo J, Cohen J. Origin of single pronucleated human zygotes. *J Assist Reprod Genet*. 1993; 10:276–9. doi: 10.1007/BF01204942.

Okajima N, Xiao W, Lopata A, Sankai T, Yasmin L, Nagai Y, et al. Nuclear-to-cytoplasmic ratios of 1PN and 2PN zygotes after in vitro fertilization of mouse oocytes. *Zygote*. 2022 Feb;30(1):120-124. doi: 10.1017/S096719942100040X.

Otsuki J, Iwasaki T, Enatsu N, Katada Y, Furuhashi K, Shiotani M. Noninvasive embryo selection: kinetic analysis of female and male pronuclear development to predict embryo quality and potential to produce live birth. *Fertil Steril*. 2019 Nov;112(5):874-881. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.07.015.

Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Association of spindle midzone particles with polo-like kinase 1 during meiosis in mouse and human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2009 Apr;18(4):522-8. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60129-0.

P.Y. Xie, Y. Tang, L. Hu, Q. Ouyang, Y.F. Gu, F. Gong, et al., Identification of biparental and diploid blastocysts from monopronuclear zygotes with the use of a single-nucleotide polymorphism array, *Fertil Steril*, 110, 2018, 545–554.e5.

Pan J, Goodheart M, Chuma S, Nakatsuji N, Page DC, Wang PJ. RNF17, a component of the mammalian germ cell nuage, is essential for spermiogenesis. *Development*. 2005 Sep;132(18):4029-39.

Plachot M, de Grouchy J, Junca AM, Mandelbaum J, Salat-Baroux J, Cohen J. Chromosome analysis of human oocytes and embryos: does delayed fertilization increase chromosome imbalance? *Hum Reprod*. 1988; 3:125–7. doi: 10.1093/humrep/3.suppl_1.125.

Plachot M. Chromosome analysis of oocytes and embryos. In: Verlinsky Y, Kuliev A, editors. *Preimplantation genetics*. New York: Plenum Press; 1991. pp. 103–112.

Plachot M, Sato A, Nagaki M, Araki Y, Utsunomiya T. Developmental potential and chromosomal constitution of embryos derived from larger single pronuclei of human zygotes used in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; 81:723–724. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.07.042. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Rauskolb C, Sun S, Sun G, Pan Y, Irvine KD. Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell*. 2014 Jul 03;158(1):143-56.

Ray S, Saha A, Ghosh A, Roy N, Kumar RP, Meinhardt G, et al. Hippo signaling cofactor, WWTR1, at the crossroads of human trophoblast progenitor self-renewal and

differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Sep 06;119(36): e2204069119.

Reichman DE, Jackson KV, Racowsky C. Incidence and development of zygotes exhibiting abnormal pronuclear disposition after identification of two pronuclei at the fertilization check. *Fertil Steril*. 2010; 94:965–70. doi: 10.1016/j.fertnstert. 2009.04.018.

Reichman DE, Jackson KV, Racowsky C. Incidence and development of zygotes exhibiting abnormal pronuclear disposition after identification of two pronuclei at the fertilization check. *Fertil Steril*. 2010;94:965–70. doi:10.1016/j.fertnstert. 2009.04.018.

Rudak E, Dor J, Kimchi M, Goldman B, Levran D, Mashiach S. Anomalies of human oocytes from infertile women undergoing treatment by in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1990 Aug;54(2):292-6.

S. Hondo, A. Arichi, H. Muramatsu, N. Omura, K. Ito, H. Komine, et al., Clinical outcomes of transfer of frozen and thawed single blastocysts derived from nonpronuclear and monopronuclear zygotes, *Reprod Med Biol*, 18, 2019, 278–283.

S. Mateo, F. Vidal, M. Parriego, I. Rodríguez, V. Montalvo, A. Veiga, et al., Could monopronucleated ICSI zygotes be considered for transfer? Analysis through time-lapse monitoring and PGS, *J Assist Reprod Genet*, 34, 2017, 905–911.

S. Mateo, M. Parriego, M. Boada, F. Vidal, B. Coroleu and A. Veiga, In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection, *Fertil Steril*, 99, 2013, 897–902.

Sang Q, Li B, Kuang Y, Wang X, Zhang Z, Chen B, et al. Homozygous Mutations in WEE2 Cause Fertilization Failure and Female Infertility. *Am J Hum Genet.* 2018 Apr 05;102(4):649-57.

Sang Q, Zhang Z, Shi J, Sun X, Li B, Yan Z, et al. A pannexin 1 channelopathy causes human oocyte death. *Sci Transl Med.* 2019 Mar 27;11(485).

Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Apr;12(4):246-58.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1993; 8:221–3.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1993; 8:221–3.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *HumanReprod.* 1993; 8:221–223.

Staessen C, Van Steirteghem AC. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997; 12:321–7. doi: 10.1093/ humrep /12.2.321.

Tadaka S, Katsuoka F, Ueki M, Kojima K, Makino S, Saito S, et al. 3.5KJPNv2: an allele frequency panel of 3552 Japanese individuals including the X chromosome. *Hum Genome Var.* 2019; 6:28.

Tanos BE, Yang HJ, Soni R, Wang WJ, Macaluso FP, Asara JM, et al. Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev.* 2013 Jan 15;27(2):163-8.

Tong X, Jin J, Hu Z, Zhang Y, Fan HY, Zhang YL, et al. Mutations in OOEP and NLRP5 identified in infertile patients with early embryonic arrest. *Hum Mutat.* 2022 Dec;43(12):1909-20.

Van Bon BW, Oortveld MA, Nijtmans LG, Fenckova M, Nijhof B, Besseling J, et al. CEP89 is required for mitochondrial metabolism and neuronal function in man and fly. *Hum Mol Genet.* 2013 Aug 01;22(15):3138-51.

van der Heijden GW, van den Berg IM, Baart EB, Derijck AA, Martini E, de Boer P. Parental origin of chromatin in human monopronuclear zygotes revealed by asymmetric histone methylation patterns, differs between IVF and ICSI. *Mol Reprod Dev.* 2009; 76:101–108. doi: 10.1002/mrd.20933. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Wang W, Dong J, Chen B, Du J, Kuang Y, Sun X, et al. Homozygous mutations in. *J Med Genet.* 2020 Mar;57(3):187-94.

Wang X, Song D, Mykytenko D, Kuang Y, Lv Q, Li B, et al. Novel mutations in genes encoding subcortical maternal complex proteins may cause human embryonic

developmental arrest. *Reprod Biomed Online*. 2018 Jun;36(6):698-704.

Wasik KA, Tam OH, Knott SR, Falciatori I, Hammell M, Vagin VV, et al. RNF17 blocks promiscuous activity of PIWI proteins in mouse testes. *Genes Dev*. 2015 Jul 01;29(13):1403-15.

Wu L, Chen H, Li D, Song D, Chen B, Yan Z, et al. Novel mutations in PATL2: expanding the mutational spectrum and corresponding phenotypic variability associated with female infertility. *J Hum Genet*. 2019 May;64(5):379-85.

Xu Y, Shi Y, Fu J, Yu M, Feng R, Sang Q, et al. Mutations in PADI6 Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest. *Am J Hum Genet*. 2016 Sep 01;99(3):744-52.

Yan J, Li Y, Shi Y, Feng HL, Gao S, Chen ZJ. Assessment of sex chromosomes of human embryos arising from monopronucleus zygotes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles of Chinese women. *Gynecol Obstet Investig*. 2010; 69: 20–23. doi: 10.1159/000245942.

Zhang H, Zhang F, Chen Q, Li M, Lv X, Xiao Y, et al. The piRNA pathway is essential for generating functional oocytes in golden hamsters. *Nat Cell Biol*. 2021 Sep;23(9):1013-22.

Zhang W, Chen Z, Zhang D, Zhao B, Liu L, Xie Z, et al. KHDC3L mutation causes recurrent pregnancy loss by inducing genomic instability of human early embryonic cells. *PLoS Biol*. 2019 Oct;17(10): e3000468.

Zhang Y, Yan Z, Qin Q, Nisenblat V, Chang HM, Yu Y, et al. Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions. *Mol Cell*. 2018 Dec 20;72(6):1021-34. e4.

Zhang Z, Li B, Fu J, Li R, Diao F, Li C, et al. Bi-allelic Missense Pathogenic Variants in TRIP13 Cause Female Infertility Characterized by Oocyte Maturation Arrest. *Am J Hum Genet*. 2020 Jul 02;107(1):15-23.

Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 2007 Nov 01;21(21):2747-61.

Zhao L, Xue S, Yao Z, Shi J, Chen B, Wu L, et al. Biallelic mutations in CDC20 cause female infertility characterized by abnormalities in oocyte maturation and early embryonic development. *Protein Cell*. 2020 Dec;11(12):921-7.

Zheng W, Zhou Z, Sha Q, Niu X, Sun X, Shi J, et al. Homozygous Mutations in BTG4 Cause Zygotic Cleavage Failure and Female Infertility. *Am J Hum Genet*. 2020 Jul 02;107(1):24-33.