

平成22年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591917

研究課題名（和文）糖鎖バリデーションシステムを利用したヒト卵細胞の老化と試験管内成熟

研究課題名（英文）Validation system for aging in human egg cells based on carbohydrate structures and in vitro maturation

研究代表者

豊田 雅士（TOYODA MASASHI）

国立成育医療センター（研究所）・生殖・細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号：50392486

研究成果の概要（和文）：

本研究では、受精可能となる卵子の発生から成熟過程について細胞表面糖鎖によるバリデーションを試み、その結果として卵子の成熟度を規定する指標を得ることを目的とした。マウスの加齢変化に伴う卵子形成および成熟過程における周辺環境を含めた組織の糖鎖情報を取得した。それに基づいて卵成熟度に応じた糖鎖構造変化をパネル化した。その結果、卵子成熟に重要な役割を果たしている糖鎖構造があることが示された。また得られた糖鎖構造が、*in vitro*で安定して良好な卵成熟が起こるかどうかについて検討を行い、鍵となる数種類の候補分子を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanism of maturation of ovum is not clear. For validation of mammalian egg maturation processes during development and aging, we investigated the cell surface carbohydrate expression patterns of ovum and ovary using carbohydrate specific antibodies and lectins. As a result, we showed that some specific carbohydrate structures had important roles for development and aging processes of ovum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：糖鎖バリデーション・レクチン・卵子・発生

1. 研究開始当初の背景

卵子の元となる細胞は1個の卵母細胞とそれ

を取り囲む卵胞上皮細胞群からなる原始卵胞としてすでに胎生期には出来上がってい

るものの、性成熟期にいたるまで休止状態にとどまっている。卵子形成および成熟には精子との結合を可能とする糖タンパク質が重要であることが推定されているが、詳細は全く不明である。卵子の発生・成熟過程における分子メカニズムの解明は、不妊治療における卵子診断への分子基盤を築くことになる。また採卵に対して女性にかかる身体的・精神的さらには経済的な負担軽減へ大きく貢献できるものと考えられる。

2. 研究の目的

卵細胞の発生から成熟・排卵にいたるまでに関与する因子についての情報はほとんどなく、分子機構についてはいまだ不明な点が数多く残されている。

本研究では、受精可能となる卵子の発生から成熟過程を、細胞表面糖鎖によるバリデーションを試み、その結果として卵子の成熟度を規定する指標を得ることを目指した。

卵子の胎生期から成熟期にかけての状態を特異的な糖鎖認識を持つレクチンおよび抗糖鎖抗体をもちいてその構造変化を時間軸をもって明らかにし、決まった時期に決まった数だけ排卵される分子機構を解明した。さらに排卵、着床に向けての環境の影響を考査し、生体内環境を反映させた最適な卵子の体外培養法の確立を探索した。上記結果を速やかに臨床の場につなげるための基盤を構築した。

3. 研究の方法

① 卵子の発生・成熟過程における細胞表面糖鎖解析

マウスの生殖腺が性分化を開始する胎生13.5日以降、性成熟が終わる出生8週までの卵巣を取り出し組織切片を作製する。そのうえで、糖鎖を認識するレクチンや抗糖鎖抗体を用いて免疫染色をおこなうことによって発生・成熟過程にある卵子の状態を規定するレクチンの選定をおこなう。

② 排卵周期における卵子の細胞表面糖鎖解析

マウスにおいては性成熟後約3日で排卵周期がおこる。また排卵数はほぼ一定で決まっている。この選択が生体内でどのように行われているのかの検証を、排卵周期に応じた形で卵巣を採取し組織切片を作製し各種糖鎖抗体やレクチンにより染色を行う。さらに排卵誘発剤投与における卵成長過程における影響についても検証する。さらに卵巣内環境と卵維持機

構、特に卵細胞の加齢による影響についても考慮したサンプリングをおこなう。

③ 糖鎖関連遺伝子の発現

糖鎖解析で関連が強く示唆された糖鎖構造に関して関連する糖転移酵素や糖トランスporterなどの関連遺伝子の発現動態をRT-PCRで検証する。その上ですでに持っている未受精卵での網羅的遺伝子発現解析の情報と比較検討をおこない、糖鎖構造に關与するタンパク質の探索をおこなう。

4. 研究成果

本研究では、受精可能となる卵子の発生から成熟過程について細胞表面糖鎖によるバリデーションを試み、その結果として卵子の成熟度を規定する指標を得ることを目的とする。実験は、マウス生殖細胞の胎仔期における分化過程の中で、特に雌配偶子形成過程へと進行する13.5日齢以降の卵巣を摘出して組織切片を作成し、市販レクチンならびに糖鎖抗体を用いて免疫染色を行った。時間軸を通してその変化を丹念に追うことにより卵子細胞内でおこっている現象をパネル化し、取り囲む環境因子との相互作用とともに検証した。さらに特異的な糖鎖構造についてそれを規定する糖鎖関連遺伝子の発現を検証した。市販レクチンと糖鎖認識抗体で、発生・成熟過程にある卵子の状態に応じた陽性/陰性率をパネル化した。さらに卵成熟過程を規定するレクチンの絞り込みをおこなった。新たな試みとして組織より疎水性画分のタンパク質を抽出して網羅的糖鎖構造解析としてレクチンマイクロアレイ解析をし、プロファイルを得た。このプロファイルに基づく統計解析により卵成熟時期特異的なレクチンを選定し、免疫染色の結果との相関を行った。この相関から糖鎖構造に關連する糖転移酵素や糖トランスporterなどの関連遺伝子の発現動態を定量的RT-PCRで検証した。これまでにデータとして得ている未受精卵での網羅的遺伝子発現解析の情報を加味して、推定された特異的な糖鎖構造に關与するタンパク質の探索、卵成熟過程での成熟度の指標となる有用なマーカー分子の候補を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Hamatani T, Yamada M, Akutsu H, Kuji N,

Mochimaru Y, Takano M, Toyoda M, Miyado K,

Umezawa A, Yoshimura Y. What can we learn from

gene expression profiling of mouse oocytes?

Reproduction. 135(5): 581-592, 2008.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 雅士 (TOYODA MASASHI)

国立成育医療センター（研究所）・生殖細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号：5 0 3 9 2 4 8 6

(2) 研究分担者

秦 順一 (HATA JUNICHI)

国立成育医療センター（研究所）・名誉総長

研究者番号：9 0 0 5 1 6 1 4

梅澤 明弘 (AKIHIRO UMEZAWA)

国立成育医療センター（研究所）・生殖細胞医療研究部・部長

研究者番号：7 0 2 1 3 4 8 6

(3) 連携研究者

なし