

平成 22 年 3 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791133

研究課題名（和文） 新規卵巣由来パラクライン因子を用いた卵子体外成熟法の確立とその臨床応用

研究課題名（英文） Establishment of in vitro maturation of oocytes by using of novel ovarian paracrine factors and its clinical application

研究代表者 河村 和弘（KAWAMURA KAZUHIRO）

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：10344756

研究成果の概要：

我々は卵の成熟に必要な因子を同定・解析してきた。本研究では、既知の全ての因子を体外で未熟卵に作用させ、体内で成熟した卵と比較して、その卵成熟の効率と遺伝子レベルでの正常性について検討した。その結果、マウスでは体内とほぼ同等の卵成熟を誘導することができた。遺伝子レベルの差違については、大きな違いを認める遺伝子はなかったが、一部の遺伝子で増減が認められ、未知の重要な因子の存在を含めさらなる検討が必要である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

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：神経栄養因子、卵胞発育、胚発育、着床、絨毛発育

1. 研究開始当初の背景

体外受精胚移植では、複数の成熟卵を得るため、ゴナドトロピンによる卵巣刺激を行う。しかし、ゴナドトロピン刺激に過剰に反応し腹水の貯留、血栓症などを主徴とする卵巣過剰刺激症候群（ovarian hyperstimulation syndrome:OHSS）を引き起こす者も少なからず存在する。OHSSは完全に医原性の疾患であり、重傷化すれば生命の危険に陥る可能性がある。近年、OHSSを防ぐ方法として、未熟卵体外成熟-体外受精胚移植法の開発が試みられている。しかし、その成績は通常の体外受精胚移植と比較して非常に劣り、未熟卵体外成熟法のさらなる向上が望まれる。

卵巣内に存在する第一減数分裂前期の卵母細胞は、完全に成長したものでも、受精・発生能をもたない未成熟な卵である。未熟卵体外成熟-体外受精胚移植法では、この未成熟卵を採取し体外培養により成熟卵を得た後、体外受精胚移植を行うものである。完全に成長した卵は卵胞から単離されることで自発的に成熟することが知られている。この成熟は核成熟と呼ばれ、第一減数分裂前期に静止している卵が減数分裂を再開し、第二減数分裂中期に達することである。これらの卵は核成熟が完了しているにもかかわらず、受精やその後の初期発生の能力が、体内で成熟した卵よりも劣る。この卵子が

成熟するに伴って獲得する卵の受精能および初期胚へと発生する能力を「細胞質成熟」と呼び、核成熟とは区別されるものである。未熟卵体外成熟で得られた卵は、この細胞質成熟が欠如すると考えられる。未熟卵体外成熟で得られた卵は、この細胞質成熟が欠如すると考えられる。卵の核成熟および細胞質成熟は、下垂体前葉から分泌される luteinizing hormone (LH) の急峻な増加 (LH サージ) によって誘導されることが知られている。しかし、卵巣における LH 受容体は、顆粒膜細胞、莖膜細胞に局在しており、卵には発現していないため、卵の核成熟および細胞質成熟には、顆粒膜細胞、莖膜細胞由来のパラクライン因子が関与していると考えられる。

2. 研究の目的

我々はオーファン受容体とその生理的リガンドの研究から卵成熟に重要な新規卵巣由来パラクライン因子として、insulin-like 3 を見出した。さらに DNA マイクロアレイに基づく研究から brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を新規卵巣由来パラクライン因子として報告してきた。この研究ではマウスに follicle stimulating hormone (FSH)、LH を投与し、経時的に採取した卵巣を DNA マイクロアレイに供し、ゴナドトロピン投与による遺伝子の発現量変化を網羅的に調べた。この方法は、これまで不明であった卵成熟因子を、LH サージ後に急増する分泌タンパクとして抽出することができ、さらにその分子のシグナル伝達経路についても検討することが可能である。現在、他の候補因子について研究を進めており、複数の新規卵巣由来パラクライン因子が卵成熟に関与していることが明らかになってきた。しかし、未受精卵の体外成熟で個々の因子を単独で使用しても、体外受精後の胚発育は体内成熟卵に及ぼす、卵成熟は依然未完成なものであった。この結果は、卵成熟に必要な卵巣由来パラクライン因子の相互作用が重要であることを示唆している。従って、他の研究室から報告されてきた、Epidermal growth factor (EGF) like growth factors, meiosis-activating sterol (FF-MAS), leptin, insulin-like growth factor-I を含め、これらの卵成熟に必要な卵巣由来パラクライン因子を適切に組み合わせることで、体内成熟に近い環境を作り出すことが可能になると期待される。

本研究の最終目的は、卵の核成熟および細胞質成熟機構を明らかにし、未成熟卵の体外成熟法を確立することである。現在の未熟卵体外成熟-体外受精胚移植は、技術先行の形で行われており、妊娠・出産例の報告はあるものの、その安全性の検討は十分になされていない。先に述べた、体外成熟卵の細胞質成

熟不全が出生児にどのような影響を及ぼすかは全く不明であり、次世代への影響も懸念される。従って、未熟卵体外成熟-体外受精胚移植の安全性の確立は急務であり、早急な対策を要する。移植胚の選別は形態学に基づいてなされており、これだけでは遺伝子レベルでの変化は捉えられない。我々のもつ体外成熟と DNA マイクロアレイの技術を応用し、体外成熟卵と体内成熟卵を体外受精して得られた胚をそれぞれ DNA マイクロアレイに供し、その遺伝子プロファイルを比較検討することで、細胞質成熟不全によって引き起こされる胚の遺伝子異常を網羅的に調べることが可能である。本研究では、

(1) 体外成熟がもたらす卵の核・細胞質成熟不全が、受精後の胚にどのような遺伝子レベルでの影響を及ぼすか検討するため、DNA マイクロアレイを用いてマウス体外成熟卵と体内成熟卵を体外受精して得られた胚の遺伝子発現プロファイルを比較し、胚発生およびその後の着床・胎芽 (胎児) 発育に重要な遺伝子群の変化を調べる。

(2) 我々が見出した新規卵巣由来パラクライン因子と既知の因子を組み合わせ、理想的な体外成熟培養環境を作り出す。この際、体内成熟卵由来の胚の遺伝子発現プロファイルをマーカーにし、形態学的な卵核成熟-胚発生 (卵細胞質成熟) だけではなく、遺伝子レベルでも体内成熟卵と相違のない体外成熟卵を得ることを目標とする。このことにより、未熟卵体外成熟-体外受精胚移植の安全性の確立の基礎が構築されたと考える。

(3) これらの動物実験から得られた結果を、ヒト未熟卵体外成熟において検討し、安全なヒト未熟卵体外成熟-体外受精胚移植法の確立をめざす。

3. 研究の方法

(1) マウス体外成熟卵および体内成熟卵の体外受精・胚培養

排卵刺激を行った hCG 未投与のマウス卵巣より卵丘細胞-未成熟卵複合体 (cumulus-oocyte complexes: COCs) を採取し、体外成熟培養液にて 24 時間体外培養を行う。卵に付着している卵丘細胞を除去した後、第 1 極体の放出の有無を顕微鏡下に観察し、核成熟が完了した卵を体外受精に用いる。一方、体内成熟卵は過排卵刺激後に hCG を投与し、12 時間後に卵管内に排卵された COCs を採取し、卵丘細胞を除去後に体外受精を行う。マウス卵の体外受精は、精巣上体尾部の精子を用いて定法に従い行う。得られた受精卵は培養を続け、2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑実胚、胚盤胞の各発育段階に達した着床前期胚をそれぞれ 50 個集め DNA マイクロアレイに供する。

(2) 体外成熟による卵成熟不全が胚に及ぼ

す遺伝子レベルの変化の DNA マイクロアレイによる検討

上記により得られた着床前期胚から total RNA (tRNA) を抽出し、T7 プロモーターを持つプライマーを用いて cDNA を合成する。さらに T7RNA ポリメラーゼによる in vitro transcription で cRNA を合成する。この際ビオチンラベルされたリボヌクレオチドを取り込ませる。生成された cRNA は断片化の後、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し、Affymetrix 社の GeneChip (Mouse Genome 430-2.0) とハイブリダイゼーションを行う。洗浄および streptavidin-phycoerythrin による染色を行い、GeneChip Scanner 3000 にてシグナルを検出する。解析は GeneChip Operating Software ver. 1.4 にて初期データをまとめ、さらに我々が独自に開発したデータマイニングソフトにより体外成熟卵と体内成熟卵から得られた胚の遺伝子発現の比較検討を進める。

(3) 卵巣由来パラクライン因子を用いたマウス未成熟卵の体外成熟

卵の核成熟は未成熟卵の①卵核胞崩壊 (germinal vesicle breakdown: GVBD)、②第1極体放出により評価される。一方、細胞質成熟の評価は形態学的には、③卵の受精率、④胚発生率 (胚盤胞到達率、胚盤胞細胞数) が主に用いられてきた。これまで報告されてきた卵巣由来パラクライン因子のうち、各至適濃度の Insulin-like 3, BDNF, EGF like growth factors, FF-MAS, leptin, insulin-like growth factor-I, glial cell line-derived neurotrophic factor, kit-ligand, endothelin-I を全て体外成熟培養液に加え、①-④のパラメーターを用いて卵巣由来パラクライン因子の相互作用による未成熟卵の体外成熟誘導への効果を形態学的に検討する。さらに上記 DNA マイクロアレイの手法を用いて、卵巣由来パラクライン因子の相互作用の遺伝子レベルでの効果を検討する。

①GVBD の検討

GVBD は、第1減数分裂前期で停止している卵母細胞が、減数分裂を再開し第2減数分裂中期で再停止するまでの過程で、最初に観察される形態学的変化である。従って「核成熟」の指標と考えられている。卵巣由来パラクライン因子の GVBD の作用を調べるため、未熟マウスに FSH を投与し、48 時間後に排卵前卵胞を実体顕微鏡下で採取する。排卵前卵胞を卵巣由来パラクライン因子を加えたメディアウムの入ったバイアルにいれ、95%酸素、5%二酸化炭素の混合ガスを充填し、1 時間毎に攪拌しながら 8 時間培養する。培養後に卵胞内の卵を取り出し、卵丘細胞を除去し、GVBD を判定する。対照群および卵巣由来パラクラ

イン因子添加群において GVBD を比較し、卵巣由来パラクライン因子の GVBD への影響を調べる。

②第1極体放出の検討

第1極体放出は、核成熟の最終段階で認められる形態学的変化である。第1極体放出を経て第2減数分裂中期に至った卵は成熟卵となり、受精能を有するようになる。第1極体放出への卵巣由来パラクライン因子の影響を調べるため、未熟マウスに FSH を投与し、48 時間後に卵巣から COCs を実体顕微鏡下で採取する。24 時間培養をおこない、培養後に卵丘細胞を除去し、第1極体放出を判定する。対照群および卵巣由来パラクライン因子添加群において第1極体放出率を測定し、卵巣由来パラクライン因子の第1極体放出への影響を調べる。

③・④卵の受精率および胚発生率の検討

卵の細胞質成熟の検討は、対照群および卵巣由来パラクライン因子添加群において体外培養をおこない、卵成熟を促したマウス卵に対して体外受精を施し、受精率、胚盤胞発生率および胚盤胞細胞数を調べることでおこなう。卵巣由来パラクライン因子が細胞質成熟を促進するのであれば、受精率、胚盤胞発生率の上昇、胚盤胞細胞数の増加が期待される。上記の方法により、体外成熟-体外受精を行い、媒精後 6 時間で前核の有無により受精率を測定する。受精した卵は新たな培養液に移し、胚発育を経時的に観察して胚盤胞発生率および胚盤胞細胞数を調べる。

(4) ヒト卵への応用

上記の動物実験と同様の研究を、インフォームドコンセントが得られた不妊治療中の患者から採取した卵を用いて行う。

①体外成熟による卵成熟不全が胚に及ぼす遺伝子レベルの変化の DNA マイクロアレイによる検討

ヒト体内成熟卵は通常体外受精胚移植治療における卵巣刺激および hCG 投与後に採取される。一方、体外成熟卵は卵巣刺激後に hCG を投与しないで未成熟卵を採取し、体外成熟培養液中で 24 時間培養して得る。将来の臨床応用を考え、透明帯硬化による受精障害を防ぐため動物実験で体外成熟培養液に添加していた fetal bovine serum はヒトには使用しない。透明帯硬化の影響を回避するためには、体外受精の際には全ての卵に顕微受精を行う。顕微受精後の受精の判定は 24 時間後に行い、実体顕微鏡下で前核の有無にて判定する。体内成熟卵を用いた体外受精によって得られた余剰胚を対照群として用い、動物実験と同様に DNA マイクロアレイによる解析を行う。

②卵巣由来パラクライン因子を用いたヒト未成熟卵の体外成熟

動物実験と同様の方法を用いて検討する。

ただし、排卵前卵胞培養による卵巣由来パラクライン因子の GVBD への効果の検討は、ヒトの場合は確立されていないので行わない。第 1 極体放出への作用の検討は上記により採取した未成熟卵を用いて行う。形態学的な卵成熟の評価のほか、DNA マイクロアレイの手法を用いて、卵巣由来パラクライン因子の相互作用の遺伝子レベルでの効果を検討し、ヒト未受精卵の体外成熟において、体内成熟卵に近い理想的な体外培養環境の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) 実験計画においては、マウス体外成熟卵と体内成熟卵を体外受精により受精させ、受精後の着床前期胚の遺伝子発現プロファイル DNA マイクロアレイにより検討する予定であった。しかし、受精前の metaphase II 卵での遺伝子発現プロファイルを検討したところ、体外成熟卵と体内成熟卵で差を認めた。そこで、正常な成熟卵としてのマーカーとして、この時点での卵の遺伝子発現プロファイルを採用することにした。また、卵成熟因子を全く用いないで得られた metaphase II 卵から得られる着床前期胚の遺伝子発現プロファイルも差があることも確認した。

(2) 各至適濃度の Insulin-like 3, BDNF, EGF like growth factors, FF-MAS, leptin, insulin-like growth factor-I, glial cell line-derived neurotrophic factor, kit-ligand, endothelin-I を全て体外成熟培養液に加えたものを用いて、マウス卵の GVBD、第一極体の放出、受精率、胚発生率 (胚盤胞発生率および胚盤胞細胞数) について検討したところ、卵成熟因子を全く用いない対照群と比較して全てのパラメータを促進した。その程度は、胚発生率を除いて体内成熟卵とほぼ同等の値を示した。胚発生率に関しては、胚盤胞細胞数は体内成熟卵と比較して有意な差は認めなかったが、胚盤胞発生率は低かった。

(3) 上記卵成熟因子を全て作用させて得られたマウス metaphase II 卵と体内成熟で得られた metaphase II 卵の遺伝子発現プロファイル DNA マイクロアレイにより検討したところ、卵成熟因子を全く用いないで得られた metaphase II 卵で認めた有意な差はほぼ消失していたが、それらの遺伝子とは異なる一部の遺伝子において発現量の増減が認められた。我々が進めている別のプロジェクトにおいて、新規卵成熟因子の候補があがっており、今後さらに、新規因子が同定された際には、その因子を追加した研究を行う予定である。

(4) ヒト卵での検討は、当研究室では残念ながら未だ十分な検体数が揃わず、行えていない。H22 年度において中国の北京大学との共

同研究を開始した。そこで、十分な検体数を得た上で、一連の実験を試みる予定である。

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 8 件)

- ① Sasaki M, Kawamura K, Ye Y, Kumazawa Y, Kumagai J, and Tanaka T: Increasing levels of amphiregulin in follicular fluids are associated with human oocyte maturation. Akita J Med, 2010, in press.
- ② Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Gelpke MD, Kumagai J, Fukuda J, and Tanaka T: Leptin promotes oocyte development into preimplantation embryos and involvement of Ob-Ra/MEK signaling in the leptin mediated oocyte nuclear maturation. Reprod Biomed Online. 2009, 19, 181-190, 2009
- ③ Kawamura K, Kawamura N, Sato W, Fukuda J, Kumagai J, and Tanaka T: Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. Endocrinology, 150, 3774-82, 2009
- ④ Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Gelpke MD, Rauch R, Hsueh AJ, and Tanaka T: Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. Reprod Biol Endocrinol, 7, 26, 2009
- ⑤ Kawamura K, Ye Y, Liang LC, Kawamura N, Gelpke MS, Rauch R, Tanaka T, and Hsueh AJW: Paracrine regulation of the resumption of oocyte meiosis by endothelin-1. Dev Biol, 327, 62-70, 2009
- ⑥ Kawamura K, Ye Y, Kawamura N, Jing L, Groenen P, Gelpke MS, Rauch R, Hsueh AJW, and Tanaka T: Completion of meiosis I of preovulatory oocytes and facilitation of preimplantation embryo development by glial cell line-derived neurotrophic factor. Dev Biol 315, 189-202, 2008
- ⑦ Kawamura K: Preimplantation embryo development and its regulatory factors. Akita J Med 35, 113-122, 2008
- ⑧ Kawamura K: Regulation of oocyte maturation and preimplantation embryo development by maternal paracrine factors. Acta Obst Gynaec JPN 60, 1778-1788, 2008

[学会発表] (計 10 件)

- ① 河村和弘, 河村七美, 田中俊誠: 新規母体由来卵成熟因子の同定: endothelin-1/EDNRA signaling system. 第50回日本哺乳動物卵子学会, 2009年, 東京
- ② 河村和弘, 熊澤由紀代, 熊谷仁, 田中俊誠: 新規母体由来卵成熟因子の固定: endothelin-1/EDNRA signaling system. 第27回日本受精着床学会総会・学術講演会, 2009年, 京都
- ③ Kawamura K, KumazawaY, Kumagai J, Hsueh JW Aaron, and Tanaka T: Regulation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by ovarian paracrine factors. The International Ovarian Conference 2009, December 5, Tokyo
- ④ 河村和弘: 中枢神経関連生理活性物質の卵成熟・胚発育・着床への影響. 第61回日本産科婦人科学会学総会・学術講演会, 2009年, 京都
- ⑤ 河村和弘: パラクライン・オートクライン因子による胚発育、卵成熟調節. 第61回日本産科婦人科学会学総会・学術講演会, 2009年, 京都
- ⑥ 河村和弘: 母体由来パラクライン因子による卵成熟および胚発育の調節. 第60回日本産科婦人科学会学総会・学術講演会, 2008年, 神奈川
- ⑦ 河村和弘, 河村七美, 佐藤亘, 熊谷仁, 福田淳, 田中俊誠: 新規母体由来卵成熟・胚発育調節因子の同定: Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF). 第49回日本哺乳動物卵子学会, 2008年, 名古屋
- ⑧ 河村和弘, 佐藤亘, 天野祐湖, 熊谷仁, 福田淳, 田中俊誠, 金森恭子, 児玉英也: 新規母体由来卵成熟・胚発育調節因子の同定: Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF). 第26回日本受精着床学会総会・学術講演会, 2008年, 福岡
- ⑨ 河村和弘, 佐藤亘, 熊谷仁, 福田淳, 田中俊誠, 児玉英也: 新規母体由来卵成熟・胚発育調節因子の同定: Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF). 第51回日本生殖医学会総会・学術講演会, 2008年, 神戸
- ⑩ 河村和弘, 河村七美, 佐藤亘, 熊谷仁, 福田淳, 田中俊誠: 卵成熟誘導および胚発育促進作用を示す新規因子の同定: Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF). 第13回日本生殖内分泌学会学術集会, 2008年, 大阪

[その他]

DNA マイクロアレイデータの公開
<http://receptome.stanford.edu/edi/init/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 和弘 (KAWAMURA KAZUHIRO)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 10344756