

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861307

研究課題名(和文) ヒト卵巣組織の異種移植系を用いた卵子供給システムの構築とaging研究への展開

研究課題名(英文) Construction of the oocyte supply system by using the xenotransplantation of the human ovarian tissue

研究代表者

椋嶋 克哉 (Kabashima, Katsuya)

秋田大学・医学部・技術系補佐員

研究者番号：30615422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：染色体分配を担う紡錘体の蛍光イメージングについて、ヒト卵子を用いた試験に先立ち、動物卵子を用いた検討を行った。本学で開発された電界攪拌型迅速免疫染色装置を紡錘体の蛍光染色に導入を試みた。本装置を卵子の蛍光染色に導入することにより、極めて短時間で、かつ少量の一次抗体の使用でも卵子紡錘体の形態をとらえることが可能になった。(Kabashima K et al. Sci Rep 19;5:15371,2015) この手法も併用して減数分裂時の染色体分配にかかわる分子の同定を試みており、現在当科における子宮体癌手術症例摘出卵巣より採取した各年齢層の卵子を用いて検討が進行中である。

研究成果の概要(英文)：For the fluorescent imaging of the meiotic spindle which promotes chromosome segregation/distribution, we performed study by using the animal oocytes prior to a study using that of human. Furthermore, we applied alternating-current (AC) electric field mixing for the fluorescent imaging of the meiotic spindle which was developed in Akita University. By introducing this device into oocyte fluorescence imaging, even use of in a short time and a little primary antibody was able to extremely capture the form of the oocyte meiotic spindle (Shirasawa H, Kabashima K et al. Scientific Reports 19;5:15371,2015). We are trying to identify expression of molecules which coordinate chromosome segregation, by using AC electric field mixing.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵子 加齢 紡錘体 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ヒト卵胞の発育，閉鎖，退行

ヒトは生涯を通じて400個ほどの卵子を排卵するにすぎず，ほとんどの卵胞は利用されることなく閉鎖，退行する。こうした退行する運命にある卵胞内卵子をリクルートすることができれば，ヒト卵子の利用価値は飛躍的に向上するものと考えられる。

退行する運命にある卵胞を救済する手段としては，卵巣から単離した卵胞を体外発育培養 (IVG: In Vitro Growth) する方法，卵巣組織を免疫不全マウスに異種移植する方法，などが挙げられる。ヒト卵胞の体外発育培養は理想的な方法ではあるが，培養条件の確立には至っていない。一方，免疫不全マウスを卵胞発育のホストとして利用する手法については，ヒトにおいても成熟卵子が得られており (Kim et al., *Hum. Reprod.*, 2005; Soleimani et al., *Hum. Reprod.*, 2010)，現時点では実現性の高い唯一の手段であるといえる。

ヒト卵巣組織移植モデルマウスの卵子aging研究への応用，展開

近年の晩産化の急速な進行により，卵子のagingは現在の生殖医学において最も大きな問題の一つとなっている。しかしながら，ヒトの卵子という希少性の問題もあり，研究は進んでいない。本研究では，卵巣を摘出する症例として子宮体癌を想定している。子宮体癌はエストロゲン感受性の癌で，その根治には卵巣を摘出する必要がある。また，患者年齢も20代から多岐にわたる。このため，子宮体癌手術時に摘出された卵巣組織を超免疫不全NOGマウスに移植する系を構築することで，研究に現実的に必要な各年代のヒト卵子を確保することができるものと考えられる。

2. 研究の目的

卵巣内には数十万もの卵胞が含まれるが，その多くは排卵されることなく失われる。こうした退行する運命にある卵胞内卵子をリクルートすることができれば，ヒト卵子の利用価値は飛躍的に向上するものと考えられる。申請者らは，手術時に摘出されたヒト卵巣組織を超免疫不全NOGマウスに移植することで，ヒト卵胞の発育を人体外において誘導することに成功している。本研究では超免疫不全NOGマウス内で発育したヒト卵子の機能的な解析を行い，このヒト卵巣組織移植モデルマウスを新規『研究用ヒト卵子供給システム』として構築，応用展開することを目指す。

3. 研究の方法

超免疫不全NOGマウス内で発育したヒト卵胞内卵子の正常性を明らかにする。さらに，こうしたヒト卵巣組織移植モデルマウスの卵子aging研究への応用を試みる。研究項目は以下の通りである。

超免疫不全NOGマウス内で発育したヒト卵子の正常性について，形態学的特性（紡錘体形状や染色体配列，アクチン繊維の局在）および受精後の発生能の観点から明らかにする。ヒト受精卵を作成することには倫理的問題があるので，単為発生を誘起し，その発生能を調べる。

本研究では，卵巣を摘出する症例として子宮体癌を想定している。各年代の子宮体癌患者の卵巣組織切片を超免疫不全NOGマウスに移植し，発育した卵胞より卵子を回収する。染色体分配機構の解析を行い，母体加齢に伴う変化を明らかにする。また，ミトコンドリア機能についても解析を行うことで，ミトコンドリア機能と染色体異常発症との関連性についても検討する。

ヒトaging卵子における染色体異常の発症期所の解析

染色体分配に関わる機能タンパク質の発現の検討

・平成26年度より凍結保存してプールされている各年代のヒト卵巣組織切片を融解し、超免疫不全NOGマウスに移植する。実験1同様の手法で成熟(第二減数分裂中期, Metaphase : M) 卵子を得る。また、申請者らのこれまでの研究から、アクチン重合阻害剤を添加して培養した卵子は、第一減数分裂中期 (Metaphase : M) で減数分裂が停止することがわかっている。この現象を利用し、M 卵子を得る。

・染色体分配が正常に進行するためには、以下の2点が重要であると考えられる。すなわち、染色体(動原体)と紡錘糸の結合、姉妹染色分体の接着と分離、である。これらの機能を調べるため、上記M, M 卵子を固定後、免疫蛍光染色に供する。

・検討する対象は大別すると、動原体の形成に関わるタンパク質群(CENP, CREST など)、姉妹染色分体の接着と分離に関わるタンパク質群(コヒーシン, シュゴシンなど)、である。今回の研究では秋田大学で開発された電界攪拌装置をもちいて卵子紡錘体の蛍光染色をおこなった。染色したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡(共通設備)を用いて観察を行う。得られた画像から紡錘体の3次元立体画像を構築し、それぞれのタンパク質の局在と発現量を調べる。発現量は、画像解析ソフト(Image J)を用いた蛍光輝度の測定により算出される。

4. 研究成果

染色体分配を担う紡錘体の蛍光イメージングについて、ヒト卵子を用いた試験に先立ち、動物卵子を用いた検討を行った。さらに、本学で開発された電界攪拌型迅速免疫

染色装置を紡錘体の蛍光染色に導入を試みた。本装置を卵子の蛍光染色に導入することにより、極めて短時間で、かつ少量の一次抗体の使用でも卵子紡錘体の形態をとらえることが可能になった。(Shirasawa H, Kabashima K et al. Scientific Reports 19;5:15371,2015) この手法も併用して減数分裂時の染色体分配にかかわる分子の同定を試みており、現在当科における子宮体癌手術症例摘出卵巣より採取した各年齢層の卵子を用いてその検討が進行中である。

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2件)

Shimoda Y, Kumagai J, Anzai M, Kabashima K, Togashi K, Miura Y, Shirasawa H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y: Time-lapse monitoring reveals that vitrification increases the frequency of contraction during the pre-hatching stage in mouse embryos. J Reprod Dev. 62(2)187-193(2016)

Shirasawa H, Kumagai J, Sato E, Kabashima K, Kumazawa Y, Sato W, Miura H, Nakamura R, Nanjo H, Minamiya Y, Akagami Y, Terada Y: Novel method for immunofluorescence staining of mammalian eggs using non-contact alternating-current electric-field mixing of microdroplets. Scientific reports. 5: 15371(2015)
DOI10.1038/srep15371

〔学会発表〕(計2件)

椛嶋克哉、熊谷仁、熊澤由紀代、金森恭子、佐藤亘、白澤弘光、館山奈江、児玉英也、寺田幸弘(2014) ヒト胚盤胞は何回の凍結誘拐が可能か? 第55回日本卵子学会、5月17日(神戸)

椛嶋克哉(2014) 胚の再凍結融解から考える vitrification 法の安全性と有用性、第52回東北生殖医学会(招待講演)、11月15日(秋田)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椛嶋克哉(KABASHIMA, Katsuya)

秋田大学・医学部・技術系補佐員

研究者番号: 30615422