

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790334

研究課題名（和文） ヒト卵母細胞のコヒーシン分布と染色体不分離の加齢依存性増加機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the distribution of cohesin in human oocytes to figure out the mechanism of age-related increase of chromosomal nondisjunction.

## 研究代表者

堤 真紀子（TSUTSUMI MAKIKO）

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：30377907

研究成果の概要（和文）：ヒトでは母親の加齢により卵由来の染色体数の異常が増加し、このことはダウン症児の出生や一部の流産の原因となることが知られている。本研究課題では染色体数の異常が起こるのは、加齢により卵における細胞分裂時の染色体分配に関わるタンパク質、コヒーシンが減少するためであると考え、実際のヒトの卵母細胞におけるコヒーシンの量に加齢による変化があるかどうか解析を試みた。その結果、加齢女性でもコヒーシンを検出することができたが、サンプル数不足のため各年齢間での有意な比較には至っていない。

研究成果の概要（英文）：In humans, age-related increase of aneuploidy in oocytes is known as one of the causes of the birth of offspring with Down's syndrome or miscarriage. It has been suggested that the decrease of the molecules, cohesins, involving chromosome segregation in meiosis contributes aneuploidy. In this study, I asked whether the amount of cohesins has actually decreased in aged human oocytes, and showed that the cohesins of oocytes could be detected in aged women. However, the comparison between ages has not yet proceeded because of the unavailability of enough samples at this time.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、人類遺伝学

キーワード：減数分裂・卵母細胞・高齢出産・不妊症・習慣流産

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 母親の加齢依存的な染色体不分離の増加

① 染色体異数性（トリソミー、モノソミーなど）は減数分裂時の配偶子への染色体の均等な分配の失敗（染色体不分離）が主な原因である。

② 母親の年齢が35歳を過ぎると、トリソミーの発生率が指数関数的に増加する。

③ 染色体不分離は流産の原因の50%以上の割合を占める。

これらの現象は人種や生活習慣等に関わらず全ての人類に共通して見られる。昨今の晩婚化や女性の社会進出が増えるに伴い、女性の出産年齢が高齢化している。また、少子化が重大な社会問題となっており、少子化対策の一環として生殖医療に対する期待や要望はますます高まっている。しかし、現代の医学では不分離の予防法はないとされている。なぜならその加齢依存的な発生メカニズムが解明されていないからである。

## (2) 第一減数分裂時の染色体不分離

① ヒトのトリソミーの多くは母親の卵母細胞での第一減数分裂の不分離に由来する。

② 女性の減数分裂は胎児期に開始し、相同染色体の対合、交叉を経て出生までにdictyate期と呼ばれる10~15年、あるいは最大40~45年の休眠期に入る。そして思春期以降の排卵に伴い減数分裂が再開するまで二価染色体の状態にとどまる。

③ Dictyate期の二価染色体はキアズマ(相同染色体間の交叉部位)とコヒーシンの姉妹染色分体間のコヒーションによって繋ぎとめられており、この構造は第一分裂中期の紡錘系による双方向からの引力を受けとめるのに必須である。

④ コヒーシンサブユニットの1つSMC1beta欠損マウスはメスでコヒーションが早期に失われて加齢依存性第一減数分裂不分離を示す。これはキアズマが解消されたために相同染色体が誤って同じ紡錘体極に移動した結果である。

以上のことから、ヒトでは長いdictyate期の中にコヒーションが劣化し不分離になるという仮説が提唱されている。しかし実際のヒト加齢卵母細胞でのコヒーション状態は明らかにされていない。これは従来の手法による解析では困難であったためと考えられる。

## 2. 研究の目的

加齢に依存した染色体不分離の発生機構を理解するため、本研究課題ではヒト成人の卵母細胞の第一減数分裂中期のコヒーシン分子の局在とキアズマの位置、およびdictyate期の未成熟卵母細胞のコヒーシン分子の量と分布を明らかにし、これらの年齢による違いを比較する。予想される結果として、加齢に伴いコヒーシンが減少すると考えられる。

結果が予想通りならば、染色体不分離の発生機構として、加齢によるコヒーシンの減少のためコヒーションが弱まりキアズマの位

置がテロメア側に移動した末、相同染色体が時期尚早に分離し、娘細胞への均等な分配が妨げられるのではないかと考えられる。

以上のことから加齢依存性の染色体不分離の原因の一つが明らかとなり、近年増加傾向にある高齢女性の不妊症や流産の発症機序を理解するための基礎医学に貢献することが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

① 試料: マウス、およびヒトの成人女性(40歳代まで)の卵巣組織(インフォームドコンセントのうえ入手した、腫瘍摘出手術検体の正常部)。

② 試薬: マウスおよびヒトの減数分裂特異的コヒーシン(SMC1B, REC8)に対する抗体を作製してコヒーシンの検出に用いた。

### (2) 方法

① ウェスタンブロットによるコヒーシンの定量

卵巣組織片よりライセートを調整し、電気泳動後抗コヒーシン抗体を用いてウェスタンブロットを行いバンドの定量を試みた。

② 第一分裂中期の染色体上のコヒーシン局在とキアズマ位置の解析

卵巣組織片から卵母細胞を分離、第一減数分裂を誘導し、染色体標本を作製して免疫染色を行うことにより、キアズマ位置やコヒーシンの染色体上の局在やその定量を行う予定であった。

③ Dictyate期コヒーシンのChIP-on-chipあるいはChIP-seq

卵巣組織片を減数分裂特異的コヒーシン抗体でクロマチン免疫沈降(ChIP)し、その産物からDNAを増幅しマイクロアレイにハイブリダイゼーションあるいは次世代シーケンサーで塩基配列を読み、コヒーシンが結合していたゲノム上の位置と量を同定する予定であった。

④ 組織切片上の卵母細胞のコヒーシンの定量

卵巣組織片から切片を作製し、抗コヒーシン抗体で蛍光免疫染色をおこない、原始~一次卵胞内の卵母細胞における減数分裂特異的コヒーシンを検出した。

⑤ マウス卵巣組織の遺伝子発現解析

コヒーシンの量に影響を及ぼす遺伝子発現について、マウスの胎児、新生児、成獣の卵巣組織を用いてマイクロアレイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 3-(2)で示す方法①については、ウェスタンブロットではコヒーシンを検出することが出来なかった。これは入手できる組織内の卵母細胞の数が少ないことが原因であると考えられた。

同様の理由で3-(2)-②で示すヒト卵巣組織片からの卵母細胞の第一減数分裂誘導、および3-(2)-③は困難であると考え、着手は見送った。

(2) 3-(2)で示す方法④については、免疫染色に用いることのできる抗体を作製し、実際に卵巣組織で減数分裂特異的コヒーシンを検出することが出来た。10歳代と30歳代で比較すると、30歳代ではコヒーシン分子の一つ、REC8が減少している傾向が見られたが、現時点ではサンプル数が少ないため、結論を出すことはできない(図1)。

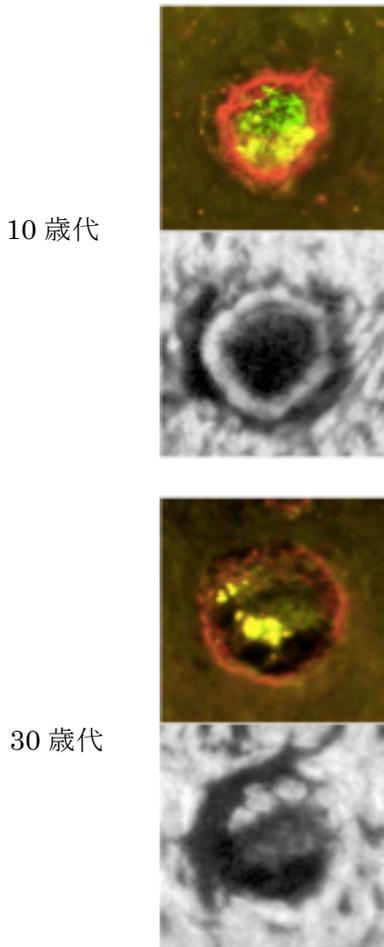


図1. ヒト卵巣組織切片の免疫染色。緑: REC8、赤: c-Kit (卵母細胞マーカー、細胞膜)、白: DAPI (DNA). 黄色は自家蛍光。

(3) 3-(2)で示す方法⑤については、各齢の卵巣から抽出したRNAをマイクロアレイで解析した。胎児、新生児で発現が見られた減数分裂特異的コヒーシン、Rec8とSmc1bは成獣で発現量が大きく減少していた(図2)。このことは、マウスでは胎児期に作られた卵母細胞のコヒーシンが、出生後は補充されないという最近の研究報告と合致する。

とりわけSmc1bの減少が顕著であるが、本解析ではこれと同様の発現パターンを示す機能未知の遺伝子を約10個同定した。これらの中にはコヒーシンの構築、維持、そして分解に関わる遺伝子が含まれていると考えられ、加齢依存性のコヒーシンの減少機構を解明する手がかりとなることが期待される。

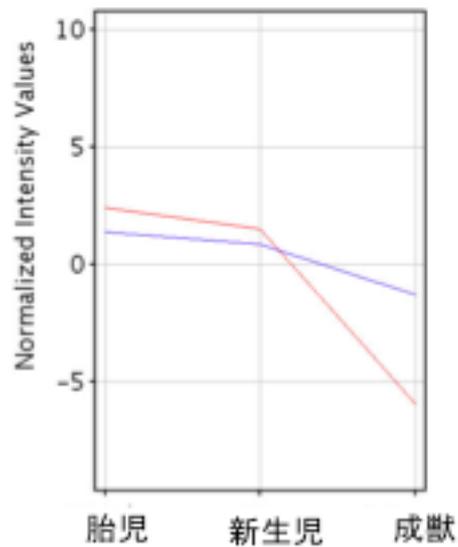


図2. マウス卵巣におけるコヒーシンの遺伝子発現量の変化。赤: Smc1b、青: Rec8.

これまでに、国内外でさまざまな年齢のヒトにおいて dictyate 期の卵母細胞のコヒーシンタンパク質を定量した例は報告されていない。本研究の最も困難な点はヒト卵巣検体の入手であるが、今後も継続してサンプル数を増やすことにより、ヒトでの加齢依存的なコヒーシンの減少を証明できると考えている。

前述のように母親の加齢に伴う染色体不分離の増加は遺伝的背景に関わらず全人類に共通する現象で、社会的関心も高い問題であるが、コヒーシンの変化が大きな原因であることがわかれば、予防法あるいは対処法の開発への道が開けると考えられる。このことは、少子化対策や出産年齢の高齢化といった社会的ニーズに対し大きく寄与することが期待される。

教

研究者番号：30377907

## 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)

Makiko Tsutsumi, Hiroe Kowa-Sugiyama, Hasbaira Bolor, Hiroshi Kogo, Hidehito Inagaki, Tamae Ohye, Kouji Yamada, Mariko Taniguchi-Ikeda, Tatsushi Toda and Hiroki Kurahashi

Screening of genes involved in chromosome segregation during meiosis I: *in vitro* gene transfer to mouse fetal oocytes. Journal of Human Genetics, 査読有、Advance online publication, 31 May 2012.

[学会発表] (計4件)

### ① 堤 真紀子

Mutation in the *SYCP3* gene identified in a woman with recurrent pregnancy loss affects pairing of the homologous chromosomes during the prophase of meiosis. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜(神奈川)

### ② Makiko Tsutsumi

Mutation in the *SYCP3* gene identified in a woman with recurrent pregnancy loss affect the synaptonemal complex conformation at meiotic prophase I. 第12回国際人類遺伝学会、2011年10月12日、モントリオール・コンベンションセンター(カナダ)

### ③ 堤 真紀子

*SYCP3*変異による習慣流産の発症メカニズムの解析 第43回藤田学園医学会、2011年10月6日、藤田保健衛生大学(愛知)

### ④ 堤 真紀子

卵母細胞の体外培養系を用いた習慣流産原因遺伝子の解析。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月9日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堤 真紀子 (TSUTSUMI MAKIKO)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助

