

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462473

研究課題名(和文)手術時摘出卵巣から得られる各年代のヒト卵子と核移植術を用いた減数紡錘体機能解析

研究課題名(英文)The functional analysis of spindle body using the human ovum of each generation to be removed during surgery and nuclear transplantation.

研究代表者

熊谷 仁(KUMAGAI, JIN)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：60333936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新技術の電界攪拌法を用いて、ヒト卵子の蛍光免疫染色法を経済的・時間的に効率化できる応用法を開発した。この方法によりマウス卵子蛍光免疫染色において第一抗体である抗-tubulin抗体を従来法の80倍の16000倍希釈で染色可能であり、反応時間を5分間まで短縮できること、を明らかにした。今後の研究において貴重な抗体の消費量節約と時間短縮が期待される。

一方、ヒト卵子の輸送に関して、秋田・仙台間250kmの未成熟卵子輸送症例では有意に体外成熟培養の成績が低下したが、輸送容器にセルポーターを用いて気相を安定させることで改善した。この結果は悪性腫瘍患者の卵子凍結への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using non-contact alternating-current electric-field mixing of microdroplets, we developed the economical fluorescence immunostaining of the human ovum with time efficiency. We could stain the mouse ovum by this method using the anti-tubulin antibody which was the first antibody by 16,000 times dilution that 80 times as large as recommended dilution and could shorten discrimination time until five minutes. It is expected the saving precious antibodies and shortening the staining time in a future study.

On the other hand, concerning the human ovum transportation, in vitro maturation rate of human ovum significantly decreased in the immature ovum transportation case of 250km between Akita and Sendai, but improved it by stabilizing a vapor phase using a cell porter in a transportation container. This result is expected to bring the application to the ovum freeze of women with malignant tumor.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：卵子 蛍光免疫染色 卵子の輸送 電界攪拌

1. 研究開始当初の背景

『卵子の質がそのカップルの生殖能力のほとんどすべてを決定する』とは、近年の人類が展開してきた生殖医学の真実である(Krey et al. 2001)。ヒト卵子の質は加齢により下降し、21トリソミー(ダウン症)に代表される染色体異常の発症率は母体加齢により上昇する。女性の晩婚化傾向が上昇の一途をたどる現在、個体加齢による卵子の機能低下に関する科学的な情報の集積は今後の生殖医学が発展してゆくための急務である。現在までに加齢によりその個体が所有する卵子の変化を形態的、機能的に検討した報告は実験動物レベルも含めて極めて少なく、ヒトにおいては殆ど存在しない。その要因は2点考えられ、1つはヒト加齢女性をシミュレートした動物モデルの作成が困難であること、もう1つは現実的に研究に使用するヒト卵子を得る機会がなく、ましてや30代後半以降の加齢女性では卵子数も限られてしまうことである。

申請者らの施設では、子宮体癌手術時に摘出される卵巣より未成熟卵子を採取し、IVM(In Vitro Maturation)により成熟卵子を得る手法を確立している(Shirasawa, Kumagai et al. 2013)。子宮体癌はエストロゲン感受性の癌であり、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。本手法を用いれば、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期待できる。

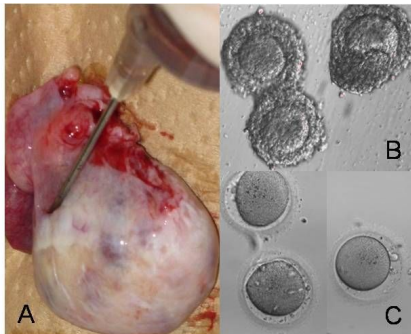


図1: 穿刺による採卵(A)と獲得未成熟卵子(B)および体外培養後の成熟卵子(C)

21トリソミーでは母体の第一減数分裂での姉妹染色体不分離が発症の原因であると考えられている。しかし、加齢によりその発生率が上昇するメカニズムは明らかになっていない。ヒト卵子紡錘体の形態的、機能的な検討に関しては、1996年にBattagliaらが自然排卵周期のヒト卵子の紡錘体を年齢ごとに比較し、40代女性の紡錘体はmetaphase plateがdisarrayしている頻度が高いことを報告した。ところが、15年以上を経た現在もこの報告が代表的なものとして引用されているほど、ヒト卵

子紡錘体と個体加齢に関する検討は少ない。また、近年の細胞生物学・分子生物学の発展により、減数分裂の紡錘体形成や染色体分離を調節する諸因子の同定が進んでいる。さらに、本研究の研究協力者である立花らにより、ヒトを含む霊長類の卵子においても核移植などの生殖工学技術が確立されるに至っている(Tachibana et al., Nature, 2009)。このような研究背景のもと、現在我々は極めて貴重な各年代のヒト卵子を調達する機会を得ている。ヒト個体加齢による卵子機能低下のメカニズム解明に極めて重要な、ヒト卵子減数分裂紡錘体の形態、機能解析の研究を今回着想した経緯である。

2. 研究の目的

ヒト個体加齢によりその卵子内で変化する因子を明らかにし、個体加齢による女性の生殖能低下に関する基礎的、臨床的な研究の萌芽を誘起する情報を発信することを目的とする。

3. 研究の方法

子宮体癌手術時に摘出される卵巣より得られる各年齢層のヒト卵子を用いて、以下の検討を行う。

ヒト卵子の確保は月経周期を有する子宮体癌手術時摘出卵巣より未成熟卵子を採取し、成熟培養を行う。適応となる症例数は限られているため、秋田大学の症例の他、東北大学産婦人科の症例も対象としている。得られた結果を各年代で比較し、個体加齢による卵子紡錘体機能の変化を明らかにする。

1) 紡錘体のライブイメージング

ポロスコープを用いた卵子減数分裂紡錘体の細胞質内における配置、大きさ、紡錘体極の形態の生体観察

2) 紡錘体機能タンパクの発現の検討

卵子減数分裂紡錘体のキネトコア、姉妹染色体結合部位、紡錘体極(中心体関連タンパク)での機能タンパクの発現およびその定量

3) 卵子紡錘体形成における核-細胞質間相互作用の検討

核移植術を用いた、若齢-高齢女性卵子間の核と細胞質を相互に入れ替えた再構築卵子の作成と紡錘体機能の評価および極体のkaryotype検査による再構築卵子の染色体分離能ならびに単為発生誘起後の胚発育能

4. 研究成果

ヒト卵子紡錘体の観察の準備として免疫

染色の効率化を検討し、新技術である電界攪拌技術を用いて、卵子の蛍光免疫染色法の経済的および時間的効率化を可能にした応用を開発し、論文として報告した。

概要は卵子の免疫染色法をより経済的かつ迅速に行えるように、新技術である電解非接触攪拌法に着目した。秋田県産業技術センターと秋田大学医学部が電界非接触攪拌技術を利用し、術中迅速病理診断に用いるために共同開発した「ヒスト・テック R-IHC」を、三次元構造を持つ卵子研究へ応用した(図2、3)。

マウス卵子を用いて、蛍光免疫染色の過程に電解攪拌法を用いることにより、第一抗体である抗 α -tubulin 抗体を従来法の 200 倍希釈より 80 倍の 16000 倍希釈で染色可能であり、かつ、反応時間を 1/12 の 5 分間まで短縮できること、を明らかにした。加えて蛍光発色の時間経過による減衰も抑制できた(図4)。この結果は平成 27 年 4 月開催の IFFS/JSRM で報告し、Scientific Reports (2015)に掲載された。この卵子染色法を用いる事で、今後の全ての研究において貴重な抗体の消費量節約と実験時間短縮が期待される。

図2 電界攪拌染色装置とその内部



図3 周波数による水滴の変化

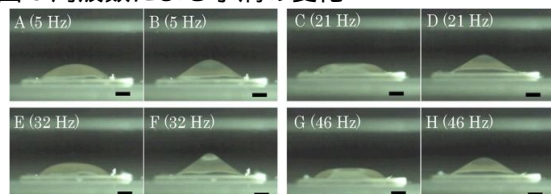
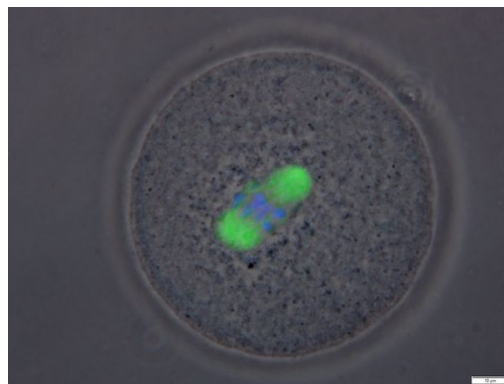


図4 電界攪拌免疫染色法を用いた卵子紡錘体



一方、ヒト卵子の確保を本検討では、性周期を有する子宮体癌手術時摘出卵巣から未成熟卵子を採取し、体外成熟培養を行った。症例数確保のため、東北大学産婦人科と共同研究を行っていたが、秋田・仙台間 250km と遠方からの未成熟卵子輸送は体外成熟培養に悪影響を及ぼす懸念があり、予備実験として未成熟卵子輸送方法の検討を加えた。輸送症例では有意に体外成熟培養の成績が低下したが、輸送容器にセルポーターを用いて気相を安定させることで改善した。この結果は平成 27 年 4 月開催の第 64 回日本産科婦人科学会で報告し、現在、英文誌に投稿中である。この結果は最近世界的に注目されている悪性腫瘍患者の卵子凍結への応用が期待される。悪性腫瘍患者が手術を受ける場所と卵子凍結を行う場所が遠距離でも可能にできるため、全身状態の悪い患者が、卵子凍結のためだけに移動するリスクを回避できるようになる。即ち、卵子凍結施設の集約化の可能性を示すことができた。

図4 卵子輸送に用いたセルポーター



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)

Shirasawa H, Kumagai J, Sato E,
Kabashima K, Kumazawa Y, Sato W,
Miura H, Nakamura R, Nanjo H, Minamiya
Y, Akagami Y, Terada Y. Corrigendum:
Novel method for immunofluorescence
staining of mammalian eggs using
non-contact alternating-current electric-field
mixing of microdroplets. Sci Rep. 6: 31941.
2016

〔学会発表〕(計 5 件)

¹ 白澤弘光, 佐藤恵美子, 熊谷仁, 富樫嘉
津恵, 下田勇輝, 佐藤亘, 熊澤由紀代, 井原
基公, 宇都宮裕貴, 八重樫伸生, 寺田幸弘.
ヒト卵胞液の大学病院間輸送方法および輸
送後の体外成熟培養結果に関する検討. 第 56
回日本卵子学会. 平成 27 年 5 月 30 日, 宇都
宮市

² Shirasawa H, Kumagai J, et. Al. :Novel
rapid immunofluorescence staining method
for the murine egg using the non-contact
alternating current electric field mixing of
the microdroplet . IFFS/JSRM inter-
national meeting 2015. 平成 27 年 4 月 28
日, 横浜市

³ 白澤弘光, 熊谷仁, 富樫嘉津恵, 佐藤亘,
熊澤由紀代, 井原基公, 宇都宮裕貴, 八重
樫伸生, 寺田幸弘. 卵胞液の施設間輸送方
法の改善が, 摘出卵巣由来のヒト未成熟卵子
に対する体外成熟培養結果へ与える影響に
関する検討. 第 67 回日本産科婦人科学会.
平成 27 年 4 月 9 日. 横浜.

⁴ 白澤弘光, 熊谷仁, 富樫嘉津恵, 佐藤亘,
佐藤敏治, 熊澤由紀代, 井原基公, 宇都宮裕
貴, 八重樫伸生, 寺田幸弘. 非卵巣刺激周期
に手術を施行した子宮体癌患者 15 症例に
おける, 摘出卵巣由来の未成熟卵子に対する
IVM 結果の検討. 第 59 回日本生殖医学会.
平成 26 年 12 月 4 日, 東京都新宿区

⁵ 白澤弘光, 熊谷仁, 富樫嘉津恵, 佐藤亘,
熊澤由紀代, 井原基公, 宇都宮裕貴, 八重樫
伸生, 寺田幸弘. 約 250km 離れた施設間の卵
胞液輸送後も, 子宮体癌患者由来の未成熟卵
子は MII 期まで培養可能である. 第 52 回東
北生殖医学会. 平成 26 年 11 月 15 日, 秋田市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 仁 (KUMAGAI, Jin)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60333936

(2) 研究分担者

寺田 幸弘 (TERADA, Yukihiro)
秋田大学・医学(系)医学研究科(研究院)・
教授
研究者番号: 10260431

佐藤 直樹 (SATO, Naoki)
秋田大学・医学(系)医学研究科(研究院)・
准教授
研究者番号: 40447199

白澤 弘光 (SHIRASAWA, Hiromitsu)
秋田大学・医学部・医員
研究者番号: 60598019

佐藤 亘 (SATO, Wataru)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 10726441

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()