

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10656

研究課題名(和文) ヒト卵子流産因子としてのオーロラ蛋白機能と関連因子の相互作用：卵子老化抑制の試み

研究課題名(英文) Relationship between aurora and cohesin proteins in human oocytes with maternal age-relating chromosome abnormality

研究代表者

渡邊 誠二 (Watanabe, Seiji)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：10241449

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)：ヒトの生殖の特徴は自然妊娠における出産率が約23%と著しく低い上に、母体年齢があがるにつれて更に10%程度まで減少する点です。この現象は卵子の老化として知られ染色体異常が大きく関わっていますが、原因が明らかではなく現時点では克服が困難です。そこで、私たちは生殖医療の過程で得られる成熟不良な卵子をヒト老化卵子モデルとして研究を行った結果、ヒト卵子特有の老化メカニズムを見出しました。これには、オーロラ蛋白とコーヒシン蛋白が密接に関わっており、これらの量を人為的に変化させることで老化現象を緩和することが可能であることが明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：The successful birth rate in human is known to be very low (about 23%) and decreases with maternal age. This phenomenon called as "oocyte aging" is accompanied by chromosome abnormality in general. We have been studying mechanism of the oocyte aging using low quality oocytes obtained from infertile women. In this study, we found that aurora and cohesin proteins, which control oocyte maturation and development, are responsible for oocyte aging. When the proteins were increased in human oocytes by treatment with a chemical treatment, chromosome aberrations were decreased, resulting in improving oocyte development.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：卵子老化

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生殖の特徴は自然妊娠における出産率が約 23%と他の哺乳動物に比べて著しく低い上に、母体加齢により更に 10%程度まで減少する点である。この現象が染色体異常を伴った不良卵子(老化卵子)が多く排卵され受精後に淘汰される結果であることが確認された(Kamiguchi 等 1996)。これにより卵子老化メカニズムの解明と克服が課題となった。

ヒト卵子の老化は、卵母細胞が減数分裂の途中で長期にわたり卵巣内に保存されるために起こると理解されている。既に、げっ歯類の老化卵子を用いてミトコンドリア機能低下・MPF 活性異常・紡錘体異常・染色体異常増加を報告した文献が散見される。しかし、短命なげっ歯類卵子は老化現象が極めて軽度(マウスでの染色体異常増加は僅か数%)なのに加え、細胞分裂を制御する中心体が哺乳類で唯一卵子由来という特殊性は実験材料として問題があった。したがって、ヒト卵子での老化メカニズム解明が必須であるが、ヒト卵子入手の困難さから国内外でほとんど研究報告がない。

申請者は、生殖医療の過程で得られる成熟不良卵子がヒト老化卵子モデルとして利用可能なことを既に見出していた。老化卵子に特徴的な姉妹染色体分離(PSC)がほぼ 100%に生じ、発生も極めて不良(胚盤胞発生率 3%)であった(Tanaka 等 2009)。さらに、モデル卵子に対し卵核胞崩壊前に微小管安定剤のタキソール処理を試みると、PSC が抑制され受精後の胚盤胞発生率が有意に上昇した(3% 16%)。このタキソール処理法の確立により、処理及び未処理卵子を未老化及び老化卵子と想定した比較研究が可能となり、老化因子探索の道が開かれた。

2. 研究の目的

最終目標はヒト卵子老化メカニズムの解明と人為的に老化現象を抑制する方法の確立である。本申請ではヒト老化卵子モデルのタキソール処理系及びマウス老化卵子を用いて以下の検討を行った。

(1) 微小管関連のオーロラ蛋白発現(ヒト老化卵子モデル)

オーロラ蛋白は主に三種類が知られている。タキソール処理で卵核胞内に増加したリン酸化オーロラ蛋白の種類と局在を調査し、染色体異常との関連性を検討する。

(2) 染色体接着関連蛋白の発現(ヒト老化卵子モデル)

姉妹染色体の接着する蛋白に各種コーヒシンが知られており、これらが染色体から脱落することで染色体異常が誘発される可能性がある。そこでタキソール処理と関連して変化するコーヒシン関連蛋白の有無を検討する。

(3) マウス卵子におけるオーロラ蛋白及びコーヒシン蛋白の発現
ヒト卵子特有の老化現象であるか否かを確認するため、オーロラ及びコーヒシン蛋白の発現の変化をマウス卵子で確認する。

(4) マイクロアレイ結果に基づく、オーロラ蛋白関連因子の検索(ヒト)

既に行った卵核胞期マイクロアレイに加えてオーロラ蛋白を注入した卵核胞におけるマイクロアレイデータを比較し、オーロラ蛋白の発現変化と関連して変動する遺伝子の抽出を行う。

(5) マイクロアレイ結果に基づく、卵子老化関連因子の検索(マウス)

マウス卵子における老化とヒト卵子のそれとが同じメカニズムで起こっているかは明らかでない。幼若マウスおよび老齢マウスから得られた卵子において遺伝子発現を比較し、マウス卵子とヒト卵子の老化において類似して変化する遺伝子および異なる変化を示す遺伝子を検索する。

3. 研究の方法

(1) ヒト卵核胞期のオーロラ蛋白群のリン酸化と局在

インフォームドコンセントに基づいて得られた廃棄対象のヒト卵核胞期卵子を、未処理卵核胞期卵子(老化モデル卵子)と、タキソールで 1 時間培養してリン酸化オーロラ蛋白を上昇させた老化抑制卵子に分けて比較実験を行った。

蛍光免疫染色: 固定した老化モデル卵子および老化抑制卵子において各種リン酸化オーロラ蛋白の蛍光免疫染色を行い、三次元的局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(2) ヒト卵核胞期のコーヒシン蛋白群のリン酸化と局在

方法(1)と同様にコーヒシン蛋白群の蛍光免疫染色を行い、それらの分布を老化モデル卵子および老化抑制卵子において比較した。

(3) マウス卵子におけるオーロラ蛋白及びコーヒシン蛋白の発現

幼若マウスおよび老齢マウスにゴナドトロピンを注射して卵胞発育を促し、卵巣から卵核胞期卵子を採取した。固定後に(1)および(2)と同様に蛍光免疫染色法でオーロラ蛋白及びコーヒシン蛋白の発現を比較した。

(4) オーロラ蛋白の増加に伴う遺伝子発現変化

ヒト卵核胞期の卵子核にマイクロインジェクションにより合成オーロラ蛋白を注入し 1 時間後に急速凍結した。これから mRNA を抽出しマイクロアレイで遺伝子発現を検出し、注入前の遺伝子発現量と比較した。

(5) マウス卵子老化関連因子の検索

幼若マウスおよび老齢マウスにゴナドトロピンを注射して卵胞発育を促し、卵巣から卵核胞期卵子を採取しマイクロアレイに用いる。また、一部の老化卵子をタキソール処理し、ヒト卵子と同様の遺伝子発現変化が起こるか検討した。

4. 研究成果

(1) タキソール処理したヒト卵核胞期卵子では染色体分離異常が抑制されると共に発生能の向上が見られる。このとき、卵核胞において発現が亢進するのは三種のオーロラ蛋白のうち一種のみであった。一方で、マウスにおいては、当該オーロラ蛋白は老齢期も高発現が持続しており、マウス卵子では老化に伴う染色体分離異常がほとんど見られない事実と一致した。したがって、ヒト老化卵子の染色体分離異常をマウス卵子で行うことが困難なことが改めて確認された。すでにノックアウトマウスにおいてオーロラ蛋白群が染色体接着に不可欠であることが判明しているが、ヒト特有のオーロラ蛋白低下がどのようなメカニズムで起こっているかを明らかにすることが重要である。

(2) 染色体接着に関わる各種コーヒシン蛋白サブユニットの大部分は、ヒト卵核胞期卵子およびタキソール処理により染色体分離異常抑制した卵核胞卵子いずれにおいても強い局在は検出されなかった。しかし、二つのサブユニットにおいて特異な局在と消失がタキソール処理の有無により確認された。このことは、染色体分離異常の増加とこれらのサブユニットの翻訳および局在が微小管依存性に調節を受けている可能性が示唆された。

(3) コーヒシン蛋白の染色体へのローディングは主に G1 期に起こることが酵母における研究で知られている。卵子の卵核胞期はすでに DNA 複製を終えていることから G2 期に相当するステージであり、この時期までコーヒシンのローディングやターンオーバーが持続しているかは十分な証拠がない。実際、マウス卵核胞期卵子では、コーヒシンサブユニットの高発現や強い局在は認められず、コーヒシンの補給を示す証拠は得られなかった。マウス卵核胞期卵子ではオーロラ蛋白が老齢期でさえも高発現していることを述べたが、この現象がコーヒシンのローディングやターンオーバーを防いでいる可能性も考えられる。

(4) 合成オーロラ蛋白をマイクロインジェクションしたヒト卵核胞期卵子では、タキソール処理卵核胞期卵子と共通して複数のコーヒシンサブユニットの遺伝子が高発現していた。これらの一部は蛍光免疫染色におい

て特異な局在を示すサブユニットと隣接して卵核胞内に存在していた。一方、オーロラ蛋白の注入により当該遺伝子の発現が減少していた。このことは何らかのフィードバック機構が存在する可能性を示している。オーロラ蛋白発現は転写後調節を受けており、オーロラ蛋白が亢進するタキソール処理卵核胞期卵子でも mRNA 発現に変化がなかった。したがって、タキソール処理で見られたオーロラ蛋白の亢進は翻訳ではなく主にリン酸化により調節されている可能性が示唆された。他方でオーロラ蛋白注入とタキソール処理において共通した細胞周期関連遺伝子の発現上昇も認められた。タキソール処理卵核胞期卵子では成熟後に授精させた際に発生能が高まることが確認されており、これらの細胞周期蛋白の発現が関与しているかもしれない。

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)

S. Watanabe, A. Fukui, R Nakamura, R Fukuhara, A Funamizu, The inability of human sperm with chromosomal abnormalities to penetrate the oocyte in assisted reproductive technology (ART): risk factors and the role of seminal plasma, *J mammal. Ova Res.*, 査読有, Vol.34, No.2, 2017, 65-73
DOI:10.1274/jmor.34.47

米本 昌平、竹本 洋一、田中 威づみ、山口 貴史、御木 多美登、永吉 基、田中 温、渡邊 誠二、紡錘体および染色体観察を用いた受精判定 - Rescue ICSI 時期の検討 -、産婦人科の実際、査読なし、66 巻、10 号、2017、1291-1295

Miki T, Nagayoshi M, Takemoto Y, Yamaguchi T, Takeda S, Watanabe S, Tanaka A, Genetic risk of Klinefelter Syndrome in ART, *Reprod Med & Biol*, 査読有, Vol.16, 2017, 188-195,
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12029>

A Tanaka, M Nagayoshi, Y Takemoto, I Tanaka, H Kusunoki, S.Watanabe, K Kuroda, S Takeda, M Ito, R Yanagimachi, Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocyte, *PNAS*, 査読有, Vol.112, No.47, 2016, 14629-14634
DOI:10.1073/pnas.1517466112

S. Watanabe, A. Fukui, A. Funamizu, A.Tanaka, Five times lower risk of DNA fragmentation in sperm with slightly narrow heads than the normal sized heads.

Fertil Steril、査読有、Vol.106、2016、e64、
[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(16\)62277-X/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(16)62277-X/fulltext)

T. Miki、A. Tanaka、M. Nagayoshi、S. Watanabe、Hereditary risk in ICSI with sperm from non-mosaic Klinefelter syndrome patients、Fertil Steril、査読有、Vol.106、2016、e64、
[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(16\)61603-5/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(16)61603-5/fulltext)

A. Tanaka、M. Nagayoshi、Y. Takemoto、H. Kusunoki、S. Watanabe、Clinical outcome of treatments for azoospermia、Fertil Steril、査読有、Vol.104、2015、e237-e238、
[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)01252-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)01252-2/fulltext)

A. Tanaka、M. Nagayoshi、Y. Takemoto、H. Kusunoki、S. Watanabe、Development of new procedure to reduce the amount of recipient cytoplasm (mitochondria) at the M-II karyoplast transfer for the treatment of mitochondrial diseases、Fertil Steril、査読有、Vol.104、2015、e182、
[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)01066-3/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)01066-3/fulltext)

〔学会発表〕(計6件)

渡邊 誠二、ROSI における卵子核及び精子細胞核の動態、第34回日本受精着床学会、2016

渡邊 誠二、クラインフェルター症患者のX-chromosome STR 構成、第61回日本生殖医学会、2016

Seiji WATANABE、A relationship between sperm head shapes and DNA fragmentation、IFFS / JSRM International Meeting、2015

Seiji WATANABE、Effect of taxol on chromosomal cohesion and blastocyst formation rate in human oocytes、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015

渡邊 誠二、ヒト1PN 卵子は受精卵か否か？ 第56回日本卵子学会、2015

渡邊 誠二、ICSI における精子染色体異常リスク、第33回日本受精着床学会、2015

〔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

6. 研究組織
(1)研究代表者
渡邊 誠二 (WATANABE, Seiji)
弘前大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：10241449

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
田中 温 (TANAKA, Atsushi)
セントマザー産婦人科医院・院長
研究者番号：70590313

福井 淳史 (FUKUI, Atsushi)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00321969

(4)研究協力者
竹本 洋一 (TAKEMOTO, Yoichi)
セントマザー産婦人科医院・胚培養士

中村 理果 (NAKAMURA, Rika)
弘前大学・医学部附属病院・胚培養士