

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591910  
 研究課題名（和文） ヒト体外培養卵子・受精卵に発現する遺伝子プロフィール解析と不妊症診療への応用  
 研究課題名（英文） Gene expression analysis of single human oocyte and preembryo, and its application to clinical infertility  
 研究代表者  
 久慈 直昭（KUJI NAOAKI）  
 慶應義塾大学・医学部・講師  
 研究者番号：80169987

研究成果の概要：本研究ではマウス単一卵子から抽出した total RNA を Ribo-SPIA 法にて遺伝子増幅した場合の、遺伝子発現解析結果の信頼性を検討した。卵子に高頻度に発現する 4 遺伝子(H1foo, GAPDH, Actin, Eef1a)は、単一卵子からの微量 RNA をサンプルとしても高い再現性を持って線形に増幅され、この増幅法により加齢による卵子の遺伝子発現変化を解析可能であった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：1.移植・再生医療 2.医療・福祉 3.遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

（1）ヒト体外受精の成功率が上昇しない最大の原因は、染色体異常の有無も含めて、作成された体外受精胚の発生能を示す確立した指標がないことにある。もし受精卵細胞内部で起きている細胞機能を直接検討することができれば、これを資料として作成された形態学的には正常な受精卵の着床不全の原因、症例ごとの至適排卵誘発法の設定、反復不成功例における予後推定、様々な施設にお

ける培養条件の標準化、あるいはこれを指標とした非侵襲的な受精卵の細胞活性推定など、生殖補助技術の様々な分野での研究が促進されると考えられる。

（2）しかし、DNA マイクロアレイ技術をヒト卵子・初期胚に応用するには、DNA チップが高価であるという経済的理由以外に、1) どのようにして良質な RNA を一つの胚、あるいは単一割球から得るか、2) その RNA サンプルを個々の mRNA 同士の比率を保ったままど

のように増幅するか、という解決すべき二つの命題がある。この分野での世界の研究状況をみると、Dobson ら (2004) の day3 までのヒト胚、およびヒト発生停止胚の遺伝子発現解析の試みや、Corcoran らの (2006) ウシ体外培養胚盤胞における解析の報告があるが、個々の mRNA 同士の構成比はわかるものの、抽出された mRNA の絶対量など、実験の信頼性検証については課題がのこっている。

## 2. 研究の目的

(1) 一般的に housekeeping 遺伝子とされる beta-actin、G3PDH の他に、我々がすでに同定した H1foo、UCHL1 等を指標として、マウス各発生段階卵子からの totalRNA の至適抽出法とその信頼性を検討し、さらにマウス卵子・受精卵 1 個からの全発現遺伝子の定量的増幅法を開発するとともに、その信頼性検証を行う。

(2) (1)の方法論を用いてヒト卵子・受精卵における正常発生・異常発生卵子の遺伝子プロフィール解析を DNA マイクロアレイを用いて行い、最終的に卵子・受精卵の遺伝子発現プロフィールと受精卵妊孕性(着床率)との関連を検討することを目的とする。

特に、DNA マイクロアレイによる実験が一回あたり現時点では非常に高価であるため、本研究の重点は増幅 cDNA サンプルをもとのサンプル(卵子・受精卵)における遺伝子間の量的構成を保ったままいかに調整するかに重点をおくこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵子への新しい遺伝子増幅法の応用とその信頼性検討

本研究では、DNA 増幅を基本とする Ribo-SPIA™法を遺伝子増幅に用いた。この増幅法は従来の 2-round T7 RNA polymerase を用いた方法と異なり、1-round の増幅操作で約 10000 倍程の遺伝子増幅ができ、また増幅産物が DNA であるため安定しているという特徴がある。

卵子 500 個から抽出した RNA を二分して、Ribo-SPIA™法で遺伝子増幅した場合と、しない場合で、卵子に高頻度に発現する H1foo.GAPDH. actin.Eef1a の 4 遺伝子量

について RT-PCR を用いて検討した。

卵子 1 個から 500 個までから抽出した totalRNA を増幅、解析し、その結果の相関を調べた。

卵子から抽出した RNA を希釈して作成した 500pg の total RNA(卵子 1 個の totalRNA 量に相当)を 2 回増幅し、microarray で解析してその再現性を検討した。

### (2) 加齢による卵子遺伝子発現変化とその個体差、卵子間の差についての検討

加齢による遺伝子発現の変化を検討するため、8 週齢マウス(young)3 個体と、44 週齢および 60 週齢マウス(aged)2 個体から、それぞれ卵子 3 個ずつを採取し、1 卵子ずつ Ribo-SPIA™法で増幅、microarray にて解析した(図 1)。

## 4. 研究成果

### (1) 卵子への新しい遺伝子増幅法の応用とその信頼性検討

Ribo-SPIA™増幅群では actin の推定発現量が高くなり、機序は不明だが遺伝子により増幅効率が異なる可能性がある。しかし、増幅効率は遺伝子間で差がある一方で、同じ遺伝子では一定しており、本増幅法を常に用いることによって卵子間の差は検出できることが推測される。また、他の 3 遺伝子については相互のコピー数の比を保ったまま増幅できていることが確認された。

異なった量の卵子由来 totalRNA で解析した DNA マイクロアレイの解析結果は卵子 500 対卵子 1 個の場合でも相関係数 0.83 と高く、卵子 1 個からの遺伝子増幅産物もある程度正確にその transcriptome を反映していると考えられた。このとき、(1) で解析した H1foo、GAPDH、actin、Eef1a の 4 遺伝子は、出発した RNA 量にかかわらず、全遺伝子中の中の構成比は常に一定となり、これら単一卵子に数千コピー存在する発現量の比較的多い遺伝子が内部標準となる可能性を示唆するものであった(図 1)。

500pg の total RNA を増幅後 microarray で解析した場合の、結果の相関係数は 0.99 で、Ribo-SPIA™法での高い再現性が確認

された。

(2)加齢による卵子遺伝子発現変化とその個体差、卵子間の差についての検討(図2) young と aged mouse の2グループ間でそのシグナル値にこうした有意な差がある probe が計 1419 個あり、これらに対し MetaCore によるパスウェイ解析を施行したところ、aged mouse では細胞周期や細胞分裂の安定性に関する遺伝子の発現が低下する傾向が認められた(図3)。

(3)まとめと本研究の国内外における位置づけ

Ribo-SPIA<sup>TM</sup>法は、第一に増幅後の遺伝子間の量的比率が(卵子に比較的多量に存在する遺伝子では)一定であること、第二に異なった total RNA 量から増幅した増幅産物の各遺伝子の構成比が DNA マイクロアレイ解析で一定であることから、第三に同一の微小 RNA を増幅した場合の遺伝子構成比の再現性が高いことから、単一卵子から抽出された RNA を高い再現性と信頼性を持って線形に遺伝子増幅することができる方法である。さらに、この方法で加齢によるマウス卵子の遺伝子発現の変化が検出可能であり、さらにこれまで報告されている加齢に伴る細胞周期・細胞分裂の安定性に関する遺伝子発現低下を検出できたことから、少なくともマウスにおいては単一卵子の transcriptome 解析を可能とする方法であると考えられる。単一卵子から抽出した微小遺伝子増幅法の信頼性を、簡便な新しい増幅法で、かつ卵子に比較的多く含まれる遺伝子を target として検証した報告は著者の知る限りこれまでないことから、この方法を用いてマウスの単一卵子の transcriptome 解析、さらに同一の手法を用いてヒト単一卵子の transcriptome 解析を、信頼性を持って行うことが可能であると考えられる。

図1.異なる卵子数から抽出したtotal RNAのmicroarray解析

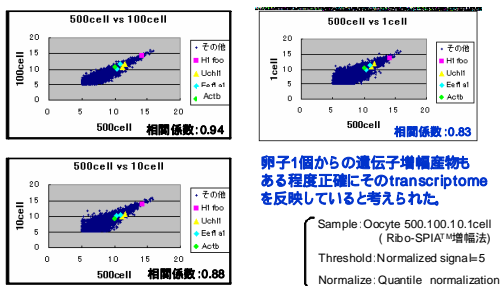


図2.加齢による卵子遺伝子発現変化の検討

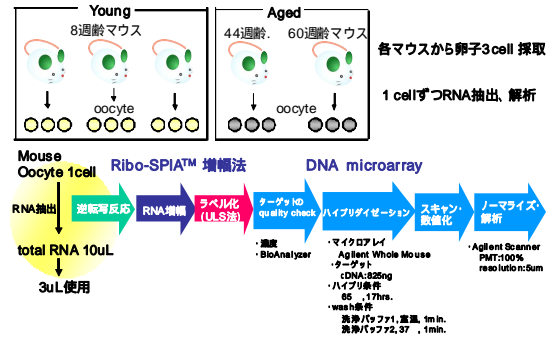
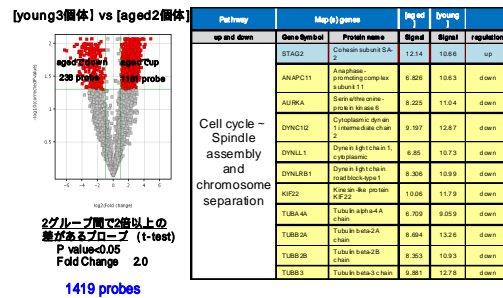


図3. youngおよびaged で差がある遺伝子



### 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 3 件)

Mizusawa Y, Kuji N, Tanaka Y, Tanaka M, Ikeda E, Komatsu S, Kato S, Yoshimura Y.

Expression of human oocyte-specific linkere histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. Fertil Steril. 13:Epub ahead of print. 2009,査読有り

Hamatani, T, Yamada M, Kkutsu H, Kuji N, Mochimaru Y, Takano M, Toyoda M, Miyado K, Umezawa A, Yoshimura Y. What can we learn from gene expression

profiling of mouse oocytes? *Reproduction*.  
135(5):581-592, 2008. 査読有り  
Kuji N, Yoshii T, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S. Buoyant  
density and sedimentation dynamics of  
HIV-1 in two density-gradient media for  
semen processing. *Fertil Steril*.  
90(5):1983-1987, 2008. 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

久慈 直昭 (KUJI NAOAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80169987

### (2)研究分担者

浜谷 敏生 (HAMATANI TOSHIO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60265882

吉村 泰典 (YOSHIMURA YASUNORI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：10129736

加藤 真吾 (KATO SHINGO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10177446

水澤 友利 (MIZUSAWA YURI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10348716

### (3)連携研究者

なし