

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19791136

研究課題名（和文）排卵期ヒト卵巣顆粒膜細胞の変化とその機能

研究課題名（英文）Changes and functions of pre-ovulatory human granulosa cells.

研究代表者

岸 裕司 (KISHI HIROSHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：10375545

研究成果の概要（和文）：不妊症例に対して行われる顕微授精の際に、副次的に得られるヒト顆粒膜細胞を使用し、そこで発現する、排卵に関わる一連の遺伝子について、定量的 PCR の手法を用い、その発現量及び発現動態の解析を行った。

この系で得られる顆粒膜細胞は、微量であったが、これを用いた定量的 PCR については、一部の遺伝子につき、発現解析を行うことができた。しかし、当初目的としていた遺伝子群については、その発現解析にまでは至ることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：With pre-ovulatory human granulosa cells, which are obtained on the occasion of ICSI therapy for infertile women and usually disposed, we analyzed the patterns of gene expression using quantitative PCR method.

The amount of the cells obtained with this therapy is extremely small. Nevertheless, we succeeded in quantifying the expression of one gene. For other genes, we could not get enough result.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生殖内分泌学

科研費の分科・細目：外科系臨床科学・産婦人科学

キーワード：生殖生理、シグナル伝達、発現制御

1. 研究開始当初の背景

難治性不妊症例に対して行われる生殖補助医療では、卵子採取を目的に、性腺刺激ホルモンの注射による卵巣の刺激が行われる事が多い。通常、hMG または FSH により刺激が開始され、卵胞径が一定の大きさに達したところで、hCG の投与により卵の成熟及び排卵へ機転が促される。卵の回収（採卵）は、排卵の寸前で行われている。卵巣刺激の第一

の目標は、受精の準備の整った、成熟した卵子を得ることであるが、この刺激に対する、個々の症例の反応は様々であり、回収される卵子の個数やその質には、大きな差が存在する。この為、排卵誘発は、症例毎の個別化と、それに対する最適な刺激が行われる事が望ましいが、現状では、卵巣の反応については、まだまだ、我々の予測がつかない部分が多く残されている。

治療過程での hCG 投与は、生理的月経周期における LH サージに代わるものとして行われる。LH サージは、受精可能な状態にまで成熟した卵子を排卵への促す為の、最終段階での引き金となっており、その刺激は、第一段階の途中で止まっていた、減数分裂の再開や、顆粒膜細胞での種々の蛋白発現を促す効果がある。これらの蛋白には EGF like growth factor である amphiregulin(Areg), epiregulin(Ereg), betacellulin(Btc) 等が含まれており、これらの因子が、排卵に重要な役割を果たすことがわかって来ている。

顆粒膜細胞には、卵胞の壁を形成する mural granulosa cells と卵子の周りを取り巻いている cumulus cells とがあるが、興味深いことに cumulus cells 及び卵子自体には LH 受容体は殆ど発現しておらず、LH の効果は mural granulosa cells 等を介して、間接的に cumulus cells 及び卵子に到達すると考えられている。上述の Areg, Ereg, Btc は mural granulosa cells の表面に発現した後、cleavage を受けて放出され、cumulus cells において、これらの受容体である EGFR に結合する。この結果 cyclooxygenase2(COX2), hyaluronan synthase 2(HAS2), tumor necrosis factor stimulated gene 6(TSG6) といった遺伝子の発現が促され、cumulus cells の膨張が起こると共に、排卵が起きると考えられている。

この様に、LH サージから排卵に至るまでの過程は、複数の因子により調節を受けているが、その過程に障害が発生した場合、排卵障害から女性不妊が起こりうると考えられる。

2. 研究の目的

私達は、以前より動物及びヒトの顆粒膜細胞を使用しての研究を行ってきた。これまでは主としてゴナドトロピン受容体を中心として、受容体自体の動態及びそこに影響を与える因子について調べてきた。今回の研究では、ゴナドトロピン刺激の、更に後に引き起こされてくる顆粒膜細胞内及び細胞間での変化について、実際の臨床症例より得られる細胞を用いて調べ、その臨床所見との関連を調べていくことを計画している。

使用に供する sample は体外受精胚移植治療を行った際に、副次的に得られる顆粒膜細胞である。体外受精胚移植治療周期では、卵採取を行う際、卵子(oocyte)は cumulus cells に覆われた cumulus oocyte complex(COC)の形で回収される。conventional method での媒精を行う場合はこのままの状態では調整精子と混和する形となるが、精子数に問題がある症例や、受精障害の見られる症例では、顕微授精が施行されることとなる。顕微授精の際には、COC より cumulus cells のみを剥がし取り、卵子単体の状態として、顕微鏡下に

穿刺針を用いて精子の注入を行う。通常、この cumulus cells や卵胞穿刺とともに吸引されてくる mural granulosa cells は廃棄されてしまうこととなるが、これらを回収し、そこで発現している遺伝子(mRNA)の状態を調べることにより、その卵胞の状態を把握できる可能性がある。対象となる遺伝子は、mural granulosa cells に関しては、Areg, Ereg, Btc そして LHR, cumulus cells に関しては COX2, TSG6, HAS2 及び EGFR 等を対象と考えた。

排卵は、性腺刺激ホルモンによる適切な刺激の結果として引き起こされるが、この過程に於いて、卵子を取り巻く様に存在する卵巣顆粒膜細胞内及び細胞間には、上述の複数の生理活性物質の発現が認められる。本研究ではこれら物質の発現パターンを解析し、患者臨床像(成熟卵子の割合、受精率、回収卵子数、使用薬剂量等)との関連を検討する事を目的としている。将来的には、患者毎に治療の個別化を行うための技術確立を目指している。

排卵誘発に際しては、複数個の卵採取を目指した刺激を行うため、一回の治療周期で複数個の卵胞を穿刺することが多いが、この個々の卵胞の間にも、その大きさの差が存在し、これは、そこから回収される卵子の成熟度と関連がある。この卵胞間での遺伝子発現状態の差についても、検討を行うことを試みた。

3. 研究の方法

実験に使用する、ヒト顆粒膜細胞は、患者同意の下、群馬大学医学部附属病院にて体外受精胚移植治療(顕微授精治療)を受けた女性より回収された。この治療では、卵採取迄、患者は GnRH analog により内因性のゴナドトロピン分泌の抑制された状態となっている。ここに hMG 又は FSH の連日筋肉注射が行われ、複数個の卵胞発育が促される。卵胞がある程度の大きさまで育った時点で hCG の筋注が行われ、この 34 時間後に採卵を施行。卵子及び卵丘細胞の複合体(COC)が回収され、体外受精のため卵胞液より分離される。この COC から卵丘細胞が剥がしとられ、卵子単体の状態とされた後、顕微授精に供される。今回の研究では、残った卵胞液中に含まれる顆粒膜細胞(mural granulosa cells)を、複数の卵胞液より遠心により回収。また、COC から剥離した卵丘細胞(cumulus cells)も回収。そのそれぞれを、実験に供する。mural granulosa cells は、その使用に際し、パーコール処理等により、その他の血球細胞等から分離する必要があるが、cumulus cells は、比較的純粋な状態での回収が可能であるため、より迅速に実験に供することができた。尚、この細胞の回収は、個々の卵胞毎に行い、

保存も別々に行った。

回収した細胞は、total RNA 抽出の為、直ちに抽出用試薬 (ISOGEN) と混和された後 -70°C に保存される。一定数の試料が集まったところで、total RNA の抽出を行う。この後、reverse transcription を行い、cDNA を作成。この cDNA に対し、定量したい遺伝子に対して特異的なプライマーを使用した定量的 PCR を行い、それぞれの遺伝子の発現量を定量する。

mural granulosa cells に関しては、amphiregulin (Areg)、epiregulin (Ereg)、betacellulin (Btc) 及び LH receptor (LHR) 等につき、その発現量を調べた。

cumulus cells に関しては、cyclooxygenase2 (COX2)、hyaluronan synthase 2 (HAS2)、tumor necrosis factor stimulated gene 6 (TSG6) 及び EGF receptor (EGFR) 等について発現量を調べた。

各症例については、その内分泌的データを始め、年齢、治療に要したゴナドトロピン製剤の量・内容、獲得卵子数、成熟卵子数、受精卵数等の臨床的データを収集した。

排卵障害・受精障害の認められない若年症例での遺伝子発現状態のデータを基準とし、これらに対して、高齢症例や、排卵・受精障害を持つ症例でのデータを収集し、そこに遺伝子の発現異常が無いかを調べる。手技的には煩雑となってしまったが、個々の卵胞間の差についても比較を行うため、顆粒膜細胞の回収・保存は、一つ一つの卵胞毎に行った。

これらの結果を比較する事により、発現遺伝子のパターンと患者臨床像との間の関連性について検討を行う形をとった。

4. 研究成果

顆粒膜細胞については、患者さんの同意を得た上で、予定通りに臨床での治療の際に回収を行った。顆粒膜細胞も、一つ一つの卵胞毎に回収・保存とした。

細胞の回収後、以下に示す手技により、微量の顆粒膜細胞より RNA を抽出し、一部の遺伝子では RT-real time PCR での定量が可能となった。

顕微授精を行う際に、採卵後の cumulus oocyte complex より卵丘細胞を回収。この細胞を 0.8ml の ISOGEN (日本ジーン) で融解し、 -80°C で保存した。卵丘細胞は、穿刺を行った個々の卵胞毎に分けて保存した。

Mural granulosa cells については、回収に伴っての夾雑物が多く、迅速な単離が困難であったため、今回の研究での使用は断念した。

上記の、ISOGEN で保存した細胞に 0.2ml の CHCl_3 を添加し、30 秒間の激しい振盪の後、 4°C で 5 分間静置。

その後 12,000xg にて 4°C 、15 分間の遠心分

離を行った。この上清をピペットで回収し、3M 酢酸ナトリウム 16ul とエタ沈メイト (日本ジーン) を加えた後に、0.8 倍量のイソプロパノールを加え振盪。その後 4°C で 30 分以上静置。次いで、サンプルを 12,000xg にて 4°C 、15 分間遠心分離し、この上清を取り除くと、RNA の沈殿がマイクロチューブの壁に付着する。これに 70%エタノール 1ml を加え、軽く vortex。その後、7,500xg で 4°C 、5 分間遠心を行った。上清を取り除き、RNA の沈殿を乾燥させた後、DEPC 処理された水でこれを溶解。RNA の濃度は、分光吸光度計を使用して測定した。

抽出された RNA を 2ug/ul となるように希釈した後、DNase I (Invitrogen) を加え、genomic DNA を完全に除去した後、500ng の oligo(dT)12-18primer と 10mM dNTP 1ul, RNase Inhibitor を加え、SuperScript III reverse transcriptase を用いて逆転写反応を行い、1st strand cDNA 合成を行った。反応条件は、 50°C で 60 分間インキュベートした後、 70°C で 15 分間反応させた。この反応物に RNaseH を添加し、残存 RNA を除去した。

この cDNA 溶液 2.5ul に SYBR Green realtime PCR master mix (東洋紡) 12.5ul を加え、遺伝子特異的な primer pair を 0.4uM ずつ添加し、最終液量が 25ul となる様、滅菌水を加えた。定量的 PCR は ABI PRISM 7000 (アプライドバイオシステムズ) を用いて以下の反応条件で行った。 95°C 60 秒間インキュベートした後、 95°C 15 秒- 60°C 15 秒- 72°C 45 秒の一連の反応を 40 サイクル行った。各サンプルにおいて、内部標準として、GAPDH mRNA の発現量も測定し、これにより補正を行った。

今回、当初標的遺伝子として考えていた一連の遺伝子については、有効なシグナルを得ることが出来なかったが、hGRP78 については、結果を得ることができており、現在の手技の最適化によって、今後シグナルを得られる可能性は十分あると考えている。最大の問題は RNA 収量が少ない事である。今回の研究では、卵胞間での差異も比較して行きたいと考えていたため、顆粒膜細胞は個々の卵胞を一つの単位として回収を行ったが、今後は、症例毎を単位として考えることで、複数個の卵胞からの卵丘細胞を回収し、収量の改善をはかりたい。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸 裕司 (KISHI HIROSHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：10375545