

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591929

研究課題名（和文）

卵子の遺伝子発現プロファイリング解析に基づく抗加齢生殖研究

研究課題名（英文）

Anti-aging research on the oocyte reproductive function based on the gene expression profiling

研究代表者

末岡 浩 (SUEOKA KOU)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：90162833

研究成果の概要(和文): 細胞質内に生命活動に必要な酸化的リン酸化代謝機能を司るミトコンドリアは卵子内に多く存在する。そのミトコンドリア DNA (mtDNA) はヒト未受精卵・未分割胚において 30 歳台より 40 歳台で copy 数の減少を認めた。また, 分割胚において割球の体積と mtDNA copy 数との間に正の相関関係を認めた。ゼブラフィッシュ胚を用いて, 胚の形態と胚発生速度について検討を行った。形態不良胚は胚発生速度が遅く, 老化したゼブラフィッシュ(12 ヶ月齢, 18 ヶ月齢)からの胚発生効率は低下した。また, ゼブラフィッシュ胚のアポトーシスに関わるカスパーゼ遺伝子発現胚発生不良胚(遅延胚)におけるカスパーゼ遺伝子発現が亢進し, アポトーシスが亢進している事が認められた。

研究成果の概要(英文): Mitochondria exists in cell as an organelle that takes part in the role of oxidative phosphorylation to supply ATP to the cell. Our studies demonstrated that lower mtDNA copy number existed in unfertilized oocytes and uncleaved embryos originated from over 40 years of age women significantly. A positive correlation was demonstrated between mtDNA copy number and the cell volume of blastomere. We examined the quality of embryo in zebrafish, in terms of the implication between morphological classification of embryo and embryonic development. Glowing of poor form embryo was delayed and the efficiency of embryonic development tended to be reduced by aging. From the respect of apoptosis on the oocyte, microarray analysis was applied to caspase gene expression in zebrafish. Embryo was revealed in apoptosis through the increased expression of caspase genes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
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：遺伝子発現プロファイリング, アポトーシス, ミトコンドリア, 加齢変化, 胚

1. 研究開始当初の背景

近年、社会生活の多様化を認め生殖に携わる年齢は大きく変化した。

女性の高齢化による生殖能維持は困難であり、さらに環境ホルモンやSTD、種々の人為的要因にて低下の危機が指摘されている。近年多様な生殖補助技術が発展し、重症不妊に対しても妊娠成立を可能にした。しかし高齢による生殖能低下への有効な解決策は提示されていない。

生殖補助医療において、高齢婦人では、卵の質が低下することが知られており、妊娠率の低下につながっているが、その原因については不明な点が多い。卵子の機能低下の明確なエビデンスとして、米国において50歳以上の女性に移植した若年女性由来の提供卵子による胚移植の妊娠成績が20%に及び、若年女性の妊娠率に比較して低下しないことが報告された。このことは閉経期に入り内分泌機能の低下や子宮機能の低下は大きな問題とはならず、卵子の老化による機能低下が高齢女性の妊娠の抑制因子となっていることを明確にし、この機能改善が高齢女性の生殖能改善に関する標的であることを証明した事実となった。具体的にはそのメカニズムの解明が卵子生殖能の低下に対する予防や治療に関わる重要な鍵となる。

高齢卵子に特異的に生じる変化をヒト、動物双方から探索を行い、とくにミトコンドリアDNA(mtDNA)およびアポトーシス(細胞死)に関与する遺伝子発現に焦点を当てて解明することが必要となった。

2. 研究の目的

(1) mtDNA 解析

独自の遺伝子と、それに基づく独自のタンパク質合成機能を持つ細胞内小器官である、

ミトコンドリアは生命活動に必要な酸化リン酸化代謝機能を司る。細胞の内部にあるmtDNAは近年卵老化との関係が示唆されている。

mtDNAは環状一本鎖DNAで、核タンパクとの結合を有しないため不安定で、そのために変異が生じやすいことが知られている。他の細胞では加齢とともに変異比率(ヘテロプラスミー)が上昇し、ミトコンドリア機能の低下につながることが知られている。生殖細胞において精子側のmtDNAは存在するコピー数がきわめて少量で、それに比較して卵子の有するmtDNAは少なくとも 10^5 以上存在し、初期胚においては卵子由来のmtDNAにその機能は依存していることが知られている。

我々はこれまで発生しやすいmtDNAの変異に焦点を当て、正常型mtDNAと変異型mtDNAが共存するheteroplasmy比率と卵子老化とのつながりを解明する研究を行ってきたが、明確なる関連性の検出は認められなかった。

そのため、mtDNAの量的関与に焦点を絞り、加齢との関係を解明し、妊孕性改善等に有用な基礎データを集積することを目的とした。

(2) 遺伝子発現プロファイリングに基づく検討

生殖細胞機能の低下にアポトーシスが深く関わっていることも指摘されてきた。アポトーシスの誘導に関するシグナル伝達機構を解明するために、アポトーシスと関わるカスパーゼファミリーを中心として生殖細胞機能に関与している遺伝子発現を網羅的に解析することを目的とした。

卵子生殖能の低下はヒト胚においても、胚の質について形態学的に分類され(Veeck,

1988 ; Goyanes et al.,1990) フラグメンテーションのある胚は、分割が進まず、その移植成績が低く (Plachot and Mandelbaum, 1990) 質の低下した胚は活性酸素が出現し、細胞膜に影響している (Aitken et al,1990), そして胚の質の低下に DNA のフラグメンテーションが関わっている (Halliwell and Chirico, 1993) ことが報告されている。そのため遺伝子発現プロファイリングに基く分子遺伝学的評価を目標とし、さらに、胚の質の低下の原因と質の改善を目標とした。

3. 研究の方法

(1) mtDNA 解析

2005 年 8 月から 2011 年 2 月まで当院当科で行われた IVF で廃棄された未受精卵・未分割胚, 分割異常胚についてインフォームド・コンセントを得て検体とした。

Day3 の 7~8 cell 分割胚から割球を抽出 (n=29)。mtDNA を 1 細胞中に 9100 copy 含むヒトリンパ球由来の細胞株より希釈系を作製した。対応するプライマーと TaqMan® 蛍光プローブを作成し、ABI PRISM 7000 を用いて TaqMan® real time PCR を施行した。各割球の mtDNA copy 数を定量した。またそれぞれの割球の長径 D, 短径 d を倒立顕微鏡にて測定、体積 ($\frac{4}{3}\pi \frac{Dd^2}{6}$) を算出した ($=3.14$)。

未受精卵・未分割胚 (n=29) も同様に 9100 copy/cell ヒトリンパ球由来の細胞株より希釈系を使用し、対応するプライマーと TaqMan® 蛍光プローブより real time PCR を施行し、mtDNA copy 数を定量した。

(2) 遺伝子発現プロファイリングに基く検討

胚発生に関わる機能低下を解析するため

に、胚発生が早く、外部から持続的に胚発生の各時期を形態観察が可能であるゼブラフィッシュの胚を用いて、アポトーシスに関わる遺伝子発現の網羅的解析を行った。

ゼブラフィッシュ胚を用いて、胚の形態・発生速度とゼブラフィッシュの月齢との関わりについて検討を行った。アポトーシスに関わるカスパーゼに注目し、遺伝子発現の検討を行った。

4. 研究成果

(1) mtDNA 解析

Day3 の 7~8 cell 分割胚割球の平均 mtDNA copy 数は $673,722 \pm 12,952$ であった。割球体積と mtDNA copy 数との関連性を確認したところ、強い正の相関を認めた ($r=0.76$)。

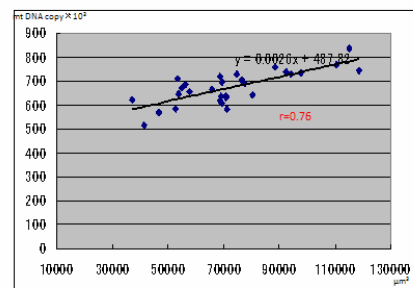


図1 割球体積と mtDNA copy 数

未受精卵・未分割胚は 30 歳台 (31~39 歳、n=15)、40 歳台 (40~44 歳、n=15) に分け、copy 数の比較検討をおこなった。30 歳台の mtDNA copy 数は $784,307 \pm 48,379$ 、一方 40 歳台の mtDNA copy 数は $603,822 \pm 46,153$ であり、有意差 ($t=0.012$) をもって 40 歳台での copy 数の減少を認めた。

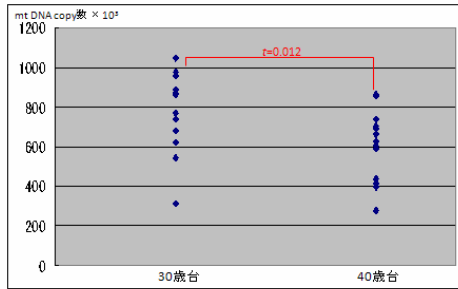


図2 年齢別未受精卵・未分化胚 mtDNA copy数

(2) 遺伝子発現プロファイリングに基づく検討

受精後約6時間後の50% epiboly Gastrula期において、分割スピードが遅れたもの1時間以上であるものを発生不良胚として分類した。形態不良胚は胚発生速度が遅く、胚が発生しなかった。加齢した女性ほど、胚発生効率が低く、胚発生速度による分類は、良好胚の選別に有用であることが示唆された。

ゼブラフィッシュ胚におけるアポトーシス中心的役割を果たすカスパーゼファミリーの遺伝子配列が明らかとなっている。そのため、発生速度により分類した胚のカスパーゼ活性について、胚1個より抽出・増幅したRNAより、マイクロアレイ解析を行い、評価を行なった。ゼブラフィッシュ胚を、2時間後の発生速度良好胚と不良胚に、6時間後の発生速度良好胚と不良胚の計4通り(それぞれ2個ずつ)に分類した。1個の胚より得られたRNA(平均521.2pg/ μ l)を抽出し、RNA増幅を1回行い(平均105ng/ μ l)得られたRNAをzebrafish microarray(Agilent)を用いて、カスパーゼ活性の定性比較を行った。

ゼブラフィッシュにおけるアポトーシスの中心的役割を果たすカスパーゼファミリー(10種類)の遺伝子発現について、受精後2時間後の形態不良胚、2時間後の形態良好胚(これを基準とした)、8時間後の形態良好胚、8時間後の形態不良胚を対象に検討した。

形態不良胚において、カスパーゼ活性が亢進していることが示唆された。発生速度による分類においても、発生速度が遅い胚ほどアポトーシス(カスパーゼ活性)が進んでいることが、マイクロアレイ解析により示された。生殖細胞機能の加齢による機能低下は、細胞質機能を多く有する卵子の機能低下に依存している可能性が強いことが示唆される。そのメカニズムとしてミトコンドリアの機能低下をmtDNAの減少から証明し、各種のmtDNA変異の増加による機能低下よりもdepletionによるエネルギー産生の低下が有力な原因の一つとして示唆された。またカスパーゼの遺伝子発現解析からアポトーシスが胚発生速度や形態不良の発生に関与し、胚成長の抑制的因子となりうることを示唆する結果を得た。

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)

[学会発表](計4件)

村越行高, 末岡 浩, 高橋香織,
佐藤 卓, 櫻井友義, 渡邊広是,
田島博人, 佐藤健二, 中林 章,
大澤淑子, 橋場剛土, 久慈直昭,
吉村泰典: 卵子ミトコンドリア DNA copy
数が受精能・胚発生能へ与える影響.

第54回日本生殖医学会, 石川県立音楽
堂, 2009年11月23日, 金沢市.

村越行高, 末岡 浩, 佐藤 卓,
櫻井友義, 渡邊広是, 田島博人,
中林 章, 浅田弘法, 橋場剛土,
久慈直昭, 吉村泰典: 卵子, 顆粒膜細胞
のミトコンドリア DNA copy 数・変異が
受精能・胚発生能へ及ぼす影響.

第 50 回 日本哺乳動物卵子学会
都市センターホテル，2009 年 5 月 8 日，
東京都。

櫻井友義，末岡 浩，佐藤 卓，
吉村泰典，中林 章，田島博人，
渡邊広是：ゼブラフィッシュ胚を用いた
形態と分割速度による胚の分類とその
検討．第 26 回日本受精着床学会学術講
演会，福岡国際会議場，2008 年 8 月 28
日，福岡市。

村越行高，末岡 浩，佐藤 卓，
櫻井友義，渡邊広是，田島博人，
中林 章，橋場剛士，岩田壮吉，
久慈直昭，青木大輔，吉村泰典：卵子、
顆粒膜細胞におけるミトコンドリア DNA
の加齢因子が受精能・胚発生能へ及ぼす
影響．第 60 回日本産科婦人科学会学
術講演会，パシフィコ横浜，
2008 年 4 月 12 日，横浜市。

6．研究組織

(1)研究代表者

末岡 浩 (SUEOKA KOU)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：90162833

(2)研究分担者

吉村 泰典 (YOSHIMURA YASUNORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：10129736
橋場 剛士 (HASHIBA TSUYOSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60245553