

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591835
 研究課題名(和文) 単一細胞遺伝子増幅とCDNA再利用定量PCRを用いた卵子形成過程の遺伝子発現解析
 研究課題名(英文) Gene expression analysis during oocyte growth by single-cell gene amplification and CDNA recycling method
 研究代表者
 持丸 佳之(MOCHIMARU YOSHIYUKI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：80445238

研究成果の概要(和文):マウス卵形成による遺伝子発現変化を、7日齢マウスからの未熟卵子、およびこれを体外成熟させたMII卵子、そして成熟マウスから得た体内成熟MII卵子各5個由来の遺伝子をサンプルとして、RiboSPIA法による増幅後のマイクロアレイ解析を行い、各群が独立した3つのグループに分かれることがあきらかになった。さらにこの結果をRiboSPIA法による増幅産物を用い、次世代シーケンサーで確認した。

研究成果の概要(英文): To investigate the change of gene expression during oocyte growth we compared the gene expression of 1) the oocytes from 7 day aged mice, 2) the MII oocytes developed from 1) through in-vitro culture and 3) the MII oocytes from adult (8 weeks old) mice. Extracted genes are amplified through Ribo-SPIA method. Each group was differentiated into distinct categories by principal component analysis of the expressed genes, and the results of microarray analysis was confirmed by RT-PCR and also RNA seq analysis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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：移植・再生医療、細胞・組織、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

卵巣内卵子発育に伴う遺伝子発現変化解析は、均一な発育段階の卵子を多量にえることが困難であるため、マウスを含む哺乳動物ではまだ報告されていない。もし単一卵子の信頼できる遺伝子発現解析系が確立できれば、

たとえ均一な発育段階卵子を多数集めることができなくても、正常に発育した卵子が数個あれば各々の単一卵子の遺伝子発現解析結果を比較することにより、各発育段階卵子の遺伝子発現を類推することができる。

我々は従来の T7 プロモータ依存 2 段階増幅

法より方法が簡便で安定性の高い遺伝子増幅法である Ribo-SPIA 法により、単一卵子由来の mRNA を DNA マイクロアレイにて解析する方法を開発した。一方、試料に含まれる mRNA から逆転写される cDNA を磁気ビーズ上に合成し、その後 QPCR にて特定の遺伝子を定量後、磁気ビーズごと cDNA をすべて回収・再利用することにより、1 試料で約 10 回の QPCR を施行可能な方法 (Reusable cDNA library 作成法、以下 cDNA 再利用法) が報告されている。この方法を用いれば、遺伝子解析を行った卵子のサンプルで、多数の mRNA を QPCR により定量可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の卵子細胞質形成過程を、マウスをモデルとした各発育段階卵子の遺伝子発現解析を通して解析する。実験手法として、我々が新たに開発した単一卵子の遺伝子増幅・遺伝子解析法を用い、卵巣由来の *in-vivo* 発育卵子と、未熟卵子を体外成熟・体外培養して得られた *in-vitro* 発育卵子とを試料として、これを比較することにより解析を行う。また、マイクロアレイによる遺伝子解析で必ず必要となる定量的 PCR による mRNA 発現量定量的確認について、新しい定量的 PCR 手法である cDNA 再利用法を用いて効率的に検証することを試み、さらにヒト単一卵子での同様な解析が可能であるかについても検討する。

3. 研究の方法

(1) cDNA 再利用法

8 週齢マウス 5 個から抽出した RNA を用いて、磁気ビーズ上に reusable な cDNA ライブラリを作成、まず卵子で発現している遺伝子 (Aurka, Kif22, Anapc11, H1foo) について、QPCR による定量を行った。

(2) 体外発育に伴う卵子の遺伝子発現解析

7 日齢 BDF1 マウスから採取した前胎状期卵、およびこれを体外成熟・体外培養した MII 卵、対照として 8 週齢成熟マウスから得た MII 卵の 3 群から、各群 3sample、各 sample は各々 5 個の卵から抽出した遺伝子とした。抽出 RNA を Ribo-SPIA 法にて遺伝子増幅後、Whole Mouse Genome Oligo microarray (Agilent) を用いて遺伝子解析を行った。さらに、次世代シーケンサー (MiSeq) により発現遺伝子解析結果の信頼性を検討した。

4. 研究成果

量が変わらない程度に再回収して RTPCR を行うことは困難であると考えられる結果となった。

(1) cDNA 再利用法

cDNA 再利用法の単一卵子由来 RNA 試料への適用については、神原らによる原法を可能な限り忠実に再現するようにして試験的に卵子に特異的に発現する 4 遺伝子を順を変えて増幅、定量値に変化がないかを検討したが、卵子からの抽出遺伝子のような極微量遺伝子では、現時点では各遺伝子の相対量が変わらない程度に再回収して RTPCR を行うことは困難であると考えられる結果となった。

(2) 体外発育に伴う卵子の遺伝子発現解析

7 日齢マウスからの卵子、これを体外成熟させた MII 卵子、そして成熟マウスから得た体内成熟 MII 卵子は、RiboSPIA 法による増幅後のマイクロアレイ解析により、17084 プローブで主成分分析を行ったところ、3 つのグループに分けることが可能であった。このことから 3 つのグループを分ける遺伝子群が存在することが推測された。

また 7 日齢マウス卵子を体外成熟・体外培養して得られた MII 卵子と性成熟マウスからえられた MMII 卵子の遺伝子発現パターンについて、発現変動がある遺伝子のうち、Hyou1、Lzts1、Idi1 の 3 遺伝子について

RT-PCRによる確認を行い、この3遺伝子については有意に発現量が増加していることを確認した。

さらに、microarrayで差があった *Plagl1*、*Hyou1*、*Lzts1*、*Idi1*、*Arpc4* の5遺伝子については、次世代シーケンサーでも同方向の差が認められた。

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)

[雑誌論文] (計5件)

(1) 久慈直昭、山田満稔、井上治、福永朝子、小川誠司、菅原かな、奥村典子、浜谷敏生、吉村泰典。【不妊と周産期医療】ART 妊娠児の長期予後研究 42 巻 8 号 Page991-1000(2012.08) 査読無し

(2) 佐藤卓、藤井多久磨、浜谷敏生、久慈直昭、杉山重里、西尾浩、青木大輔、吉村泰典。【難治性不妊の病態と治療法】子宮頸癌に対する妊孕能温存術式 広汎性子宮頸部摘出術の適応と不妊治療の実際 産婦人科の実際 61 巻 8 号 Page1179-1183(2012.08) 査読無し

(3) 久慈直昭、吉村泰典【生殖医療の現状と課題】ART 出生児のフォローアップとその長期的予後 Medical Science Digest(1347-4340)38 巻 6 号 Page245-248(2012.06) 査読無し

(4) Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation

development. Sci Rep. 2012;2:930. 査読有り DOI: 10.1038/srep00930

(5) 菅原かな、久慈直昭、岸見有紗、西尾浩、峰岸一宏、宮越敬、藤井多久磨、田中守、市川義一、長谷川清志、青木大輔、吉村泰典。子宮頸部早期浸潤癌に対する radical abdominal trachelectomy 後の妊娠転帰 日本受精着床学会雑誌 28 巻 2 号 2011 395-398 査読有り

[学会発表] (計16件)

(1) 久慈直昭 婦人科悪性腫瘍と妊孕能温存産科的立場より 第53回日本婦人科腫瘍学会 (招聘講演) 2012年11月23日~24日岡山コンベンションセンター

(2) 井上治、浜谷敏生、進伸幸、山上亘、阪埜浩司、内田浩、丸山哲夫、久慈直昭、末岡浩、青木大輔、吉村泰典。若年性子宮体癌/複雑型子宮内膜異型増殖症に対する妊孕性温存療法後の生殖医療に関する検討 第57回日本生殖医学会学術講演会 2012年11月8日~9日 長崎ブリックホール

(3) 菅原かな、浜谷敏生、小川誠司、山田満稔、奥村典子、福永朝子、井上治、久慈直昭、梅澤明弘、吉村泰典。ヒト間葉系幹細胞から子宮内膜間質細胞への分化誘導 第57回日本生殖医学会学術講演会 2012年11月8日~9日 長崎ブリックホール

(4) 小川誠司、浜谷敏生、山田満稔、阿久津英憲、奥村典子、菅原かな、井上治、山田朝子、久慈直昭、吉村泰典。着床前期胚発生に関わる新規遺伝子 *Zfp1* の発現および機能解析 第57回日本生殖医学

会学術講演会 2012年11月8日～9日 長崎ブリックホール

(5)鈴木 孝太, 久慈 直昭, 田中 温, 宇津宮 隆史, 吉村 泰典, 山縣 然太郎。 ART 出生児の発育・発達に関する研究 第 57 回日本生殖医学会学術講演会 2012年11月8日～9日 長崎ブリックホール

(6)久慈 直昭 非配偶者間生殖医療の問題点 我が国に於ける非配偶者間人工授精治療の現状と展望 第 57 回日本生殖医学会学術講演会 2012年11月8日～9日 長崎ブリックホール

(7)菅原 かな, 浜谷 敏生, 小川 誠司, 山田 満稔, 奥村 典子, 福永 朝子, 井上 治, 久慈 直昭, 梅澤 明弘, 吉村 泰典。 ヒト間葉系幹細胞から子宮内膜間質細胞への分化誘導 第 146 回関東生殖医学会 2012年6月9日 株式会社持田製薬ルークホール

(8)久慈 直昭 生殖医療の現状と問題点 性同一性障害カップルにおける非配偶者間人工授精 GID 学会第 13 回研究大会 (招聘講演) 2012年6月4日 ゲートシティ大崎

(9)井上 治, 久慈 直昭, 福永 朝子, 小川 誠司, 菅原 かな, 奥村 典子, 山田 満稔, 浜谷 敏生, 青木 大輔, 吉村 泰典。 HIV-1 感染男性精液に対し連続密度勾配法と swim up 法を用いた生殖補助医療の有用性 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日～4月15日 神戸ポートピアホテル

(10)山田 満稔, 浜谷 敏生, 阿久津 英憲, 井上 治, 福永 朝子, 小川 誠司, 菅原 かな,

奥村 典子, 梅澤 明弘, 久慈 直昭, 青木 大輔, 吉村 泰典。 マウス着床前期胚発生に関与する代謝物質の網羅的メタボローム解析 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日～4月15日 神戸ポートピアホテル

(11)奥村 典子, 阿久津 英憲, 浜谷 敏生, 山田 満稔, 菅原 かな, 小川 誠司, 梅澤 明弘, 久慈 直昭, 青木 大輔, 吉村 泰典。 胚発生および胚性幹(ES)細胞特性に果たす β -カテニンの機能解析 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日～4月15日 神戸ポートピアホテル

(12)小川 誠司, 浜谷 敏生, 阿久津 英憲, 山田 満稔, 奥村 典子, 菅原 かな, 井上 治, 福永 朝子, 梅澤 明弘, 久慈 直昭, 青木 大輔, 吉村 泰典。 着床前期胚発生に関わる新規遺伝子 *Zfp1* の発現解析 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日～4月15日 神戸ポートピアホテル

(13)浜谷 敏生, 山田 満稔, 阿久津 英憲, 小川 誠司, 菅原 かな, 奥村 典子, 福永 朝子, 井上 治, 梅澤 明弘, 久慈 直昭, 青木 大輔, 吉村 泰典。

着床前期初期から発現し多分化能細胞に特異的に発現する新規転写因子 *Kzpi* の機能解析 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日～4月15日 神戸ポートピアホテル

(14)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, 久慈 直昭, 吉村 泰典
年齢における卵子ミトコンドリア DNA copy 数の重要性

第 56 回日本生殖医学会 2011年12月8日

～9日 パシフィコ横浜

(15)近澤 奈々, 浜谷 敏生, 山田 満稔, 阿久津 英憲, 奥村 典子, 小川 誠司, 菅原 かな, 井上 治, 福永 朝子, 久慈 直昭, 吉村 泰典
着床前期および未分化維持に関わる新規 C2H2-zinc finger 遺伝子の解析
第 52 回哺乳動物卵子学会 2011 年 5 月 21 日
～22 日 国際福祉大学本校

(16)INOUE O, KUJI N, FUKUNAGA T,
OGAWA S, SUGAWARA K, YAMADA M,
HAMATANI T, HANABUSA H,
YOSHIMURA Y and KATO S.

Processing of semen from an HIV-1-positive male and its use in the IVF-ICSI procedure –clinical efficacy.
27th Annual meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology, July 3-6, Stockholm, 2011 Sweden

〔図書〕 (計 2 件)

(1)KUJI N, KATO S, HANABUSA H and YOSHIMURA Y.
FORMATEX

Separation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from motile sperm using a continuous density gradient and swim-up. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, ed. Mendez-Vilaz A, 2011 : 344-352

(2)久慈直昭, 井上治, 福永朝子, 菅原かな, 小川誠司, 奥村典子, 内田明花, 山田満稔, 佐藤卓, 浜谷敏生, 吉村泰典。
産婦人科治療【社会医学的ハイリスク妊娠とその対策】 不妊治療後の妊娠とその予後
2011 375-382

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 : なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

持丸 佳之 (MOCHIMARU YOSHIYUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 80445238

(2) 研究分担者

井上 治 (INOUE OSAMU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 10464976

浜谷 敏夫 (HAMATANI TOSHIO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 60265882

山田 朝子 (YAMADA TOMOKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 60464955

久慈 直昭 (KUJI NAOAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 80169987

高野 光子 (TAKANO MITSUKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 20445240

奥村 典子 (OKUMURA NORIKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員 (非常勤)
研究者番号 : 30571369

(3) 連携研究者

なし