

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 6 月 11 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659293

研究課題名(和文) 胚性遺伝子の強発現による卵子の質向上への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to oocyte quality improvement by introduction of embryonic gene.

研究代表者

寺田幸弘 (TERADA YUKIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10260431

研究成果の概要（和文）：

Oct3/4 などの胚性遺伝子は、卵子細胞質独自の機能であるゲノムの初期化に関して機能しているが、卵子の発生能自体に関与していることが近年示唆されている。本研究は、これら胚性遺伝子を卵子に強発現させることにより、卵子自体がもつ発生能力が向上するかを検討した。胚性遺伝子として報告されている Oct3/4, Sox2, Nanog それぞれの cRNA+GFP プローブを作成し、それらが機能することを *In Vivo*, *In Vitro* で検証した。さらに、マウス性成熟期個体および加齢個体から得られた卵を用いた系で cRNA の顕微注入後に IVF/ICSI を行って胚生能の評価及び遺伝子強発現の状況を確認した。胚盤胞までの発育率で cRNA+GFP プローブ注入後の卵子に胚発生能が向上する傾向が認められた。加齢個体からの卵子の発生能向上に関しては明瞭な結論を得るまで至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

The embryonic genes such as Oct3/4 function for genomic initialization. Recently, it is suggested that embryonic genes function for the oocyte/embryonal development.

We examined whether improvement of the ability for embryonic development by introduction of these embryonic genes. We made cRNA+GFP probe of the each Oct3/4, Sox2, Nanog and examined functions in *in vivo and in vitro*.

Furthermore, we evaluated embryonal developmental ability of the egg after introduction of these cRNAs. The tendency that embryonic developmental ability improved after introduction of cRNAs, was found. However, we did not obtain clear conclusions about the developmental improvement of oocytes from an aging individual.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,800,000	450,000	3,250,000

研究分野：産婦人科学

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：卵子発生能、胚性遺伝子、遺伝子導入、体外受精

1. 研究開始当初の背景

「卵子の質がそのカップルの生殖能力のほぼ全てである」とはここ 10 年ほどに我々人類が経験した生殖の真実である。初期胚の多能性維持に重要であり多能性のマーカーとなっている転写因子の Oct3/4 は将来胎仔に発生する胚盤胞初期胚の内細胞塊に特異的に発現している。Oct3/4 などの胚性遺伝子は、卵子細胞質独自の機能であるゲノムの初期化に関して機能しているが、卵子の発生能自体に参与していることが近年示唆されている。

2. 研究の目的

胚性遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Nanog) を卵子に強発現させることにより、卵子自体がもつ発生能力の向上が可能であるかを検証する。その展開は発生工学や近年挙児希望女性の高齢化＝卵子の質の低下、が問題となっている生殖医学（不妊症診療）の効率向上にむけた新技術開発の萌芽になりうる。

3. 研究の方法

●Oct3/4, Sox2, Nanog それぞれ cRNA+GFP プローブの作成

●作成 GFPcRNA プローブの *In Vivo*, *In Vitro* での蛋白合成の確認

●マウス性成熟期卵、加齢個体卵未受精卵および胚における各遺伝子発現様式の解析

●マウス性成熟期卵、加齢個体卵を用いた系で cRNA の Microinjection 後に IVF/ICSI を行って胚生能の評価及び遺伝子強発現の確認

4. 研究成果

●Oct3/4, Sox2, Nanog それぞれの RNA+GFP プローブの作成

マウス胚盤胞より Oct3/4, Sox2, Nanog の鋳型 cDNA をクローニングし、GFP を含む cRNA を合成した。

●作成 GFPcRNA プローブの *In Vivo*, *In Vitro* での蛋白合成の確認。

それぞれの GFPcRNA プローブをマウス未受精卵へマイクロインジェクションし、GFP の発現により蛋白の翻訳を確認した。また、*In vitro translation kit* にて作成したそれぞれのタンパクをウェスタンブロッティングにて確認した。

●マウス卵および胚における各遺伝子発現様式の解析

各発育過程のマウス受精卵を用いて免疫組織化学と Real-time PCR によって検討した。Oct3/4, Sox2, Nanog はマウス卵子、胚の発育各ステージで発現がみとめられた。性成熟期卵と加齢個体卵で発現の相違は認められなかった。

●マウス性成熟期卵、加齢個体卵に GFPcRNA プローブをマウス未受精卵へマイクロインジェクションしたのち、IVF/ICSI を行って胚生能を評価した。胚盤胞までの発育率で GFPcRNA プローブ注入後の卵子に胚発生能が向上する傾向が認められた。加齢個体からの卵子に関しては明瞭な結論を得るまで至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1) Sato N, Terada Y : Temporal expression of functional low density lipoprotein receptors and catalytic enzymes in steroid hormone synthesis of mouse preimplantation embryos. *Akita J Med.* 39(1):1-12(2012)

2) Makino K, Kawamura K, Sato W, Kawamura N, Fujimoto T, Terada Y : Inhibition of Uterine Sarcoma Cell Growth through Suppression of Endogenous Tyrosine Kinase B Signaling. *PLoS One.* 7:e41049 (2012)

3) Kawamura K, Kawamura N, Kawagoe Y, Kumagai J, Fujimoto T, Terada Y : Suppression of hydatidiform molar growth by inhibiting endogenous brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling. *Endocrinology.* 153(8):3972-3981 (2012)

4) Ogawa M, Sato A, Mori K, Nagao D, Kamada K, Sato M, Terada Y : Clinical Significance of amniotic fluid glucose concentration in polyhydramnios. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 25(7):1073-1076 (2012)

5) Ogawa, M., Nagao, D., Mori, K., Sato, M., Sato A., Shimizu, D. and Terada, Y : Elastography for differentiation of subchorionic hematoma and placenta previa. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 39(1):112-114 (2012)

6)Kubo S, Shirasawa H, Fujimoto T, Satoh N, Shimizu D, Satoh A, Nanjo H, Tanaka T, Terada Y : Post-Hysterectomy Ovarian Cancer : Histological Characteristics and a Prediction of Occurrence of Ovarian Cancer by Immunohistological Inspections for Specimens in Initial Operations. *Akita J Med.*38:121-129 (2012)

7)Hayasaka S, Ugajin T, Fujii O, Nabeshima H, Utsunomiya H, Yokomizo R, Yuki H, Terada Y, Murakami T, Yaegashi N: Risk factors for recurrence and re-recurrence of ovarian endometriomas after laparoscopic excision. *J Obstet Gynaecol Res.*37:581-585(2011)

8)Shibuya Y, Terada Y, Kumagai J, Kumazawa Y, Saito M, Hoshiai T, Yaegashi N: Management of pregnancy achieved by oocyte donation to a woman with 47,XXX and POF. *J Mama Ovs Res.*28:139-142 (2011)

9)Ogawa M, Nagao D, Mori K, Kamada K, Sato A, Terada Y: Is a pericardiocentesis need for preventing hypoplastic lung in case with massive pericardial effusion? *Prenat Diag.*31:917-918(2011)

10)Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takase S, Okada A, Kawagoe Y, Mulders S, Terada Y, Hsueh AJ Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Human Reprod.* 26:3094-3101 (2011)

11)Miura H, Ogawa M, Hirano H, Sanada H, Sato A, Obara M, Terada Y: Neutrophil elastase and interleukin-6 in amniotic fluid as indicators of chorioamnionitis and funisitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*158:209-213. (2011)

12)Nabeshima H, Nishimoto M, Utsunomiya H, Arai M, Ugajin T, Terada Y, Yaegashi N : Total laparoscopic conservative surgery for an intramural ectopic pregnancy. *Diagn Ther Endosc.*2010:504062. Equip(2010)

13)Kikuchi-Arai M, Murakami T, Utsunomiya H, Akahira J, Suzuki-Kakisaka H, Terada Y, Tachibana M, Hayasaka S, Ugajin T, Yaegashi N.

Establishment of long-term model throughout regular menstrual cycles in immunodeficient mice. *Am J Reprod Immunol.* 64:324-32(2010)

14)Hasegawa H, Terada Y, Ugajin T, Yaegashi N, Sato K: A novel culture system for mouse spermatid maturation which produces elongating spermatids capable of inducing calcium oscillation during fertilization and embryonic development. *J Assist Reprod Genet.* 27(9-10):565-70(2010)

15)Terada Y, Schatten G, Hasegawa H, Yaegashi N. Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction. *Tohoku J Exp Med.* 220:247-58 (2010)

16)Terada Y, Ugajin T, Arai-Kikuchi M, Hayasaka S, Nabeshima H, Yaegashi N: Laparoscopic removal of the rudimentary uterus followed by colpoepoiesis in a Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome patient with a functional endometrium and peritoneal endometriosis. *J Gynecol Surg.*26: 201-3(2010)

17)Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Velayo CL, Nabeshima H, Yaegashi N: Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography. *Fertil Steril.*93:2723-8(2010)

18)Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Nabeshima H, Suzuki K, Yaegashi N: The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. *J Assist Reprod Genetics.*27(2-3): 75-81(2010)

19)Hayasaka S, Murakami T, Nabeshima H, Terada Y, Yaegashi N: Laparoscopic management of recurrent rupture of an adnexal mass in the second trimester of pregnancy: A case report *Asian Journal of Endoscopic Surgery.*3: 201-3(2010)

〔学会発表〕(計9件)

1)河村和弘, 白澤弘光, 熊澤由紀代, 熊谷仁, 寺田幸弘(2012) 卵子成熟抑制因子(oocyte maturation inhibitor ; OMI)の同定とその機能解析: C-type natriuretic peptide (CNP) による卵子成熟抑制と2次卵胞発育促進作用. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会, 4月, 神戸

2)寺田幸弘(2012) 女性の身体加齢と卵子の構造変化. (招請講演) 第15回日本 IVF 学会学術講演会, 9月, 大阪

3)寺田幸弘(2012) なくなっていくのちのながれを紡ぐ生殖医療の現在と将来. (特別講演) 第25回福島県母性衛生学会, 6月, 福島

4)寺田幸弘(2012) 生殖細胞の形成と融合(受精)における形態変化. (教育講演) 日本臨床細胞学会秋田県支部総会, 6月, 秋田

5)寺田幸弘(2011) 細胞骨格の受精へのかかわり. (シンポジウム) 第52回日本哺乳動物卵子学会, 5月, 栃木

6)寺田幸弘(2011) なくなっていくのちのながれにおける細胞骨格の形成と崩壊. (教育講演) 第56回日本生殖医学会学術講演会・総会, 12月, 横浜

7)寺田幸弘(2011) 受精における精子中心体機能に関する私の研究のすべて. (招待講演) 第144回日本生殖医学会関東地方部会, 7月, 東京

8)寺田幸弘(2010) なくなっていく命の流れ: 生殖医療(不妊症治療から命の誕生まで)の喜び. (特別講演) 日本産科婦人科学会岩手地方部会集談会・日本産科婦人科学会公開講座, 10月, 岩手

9)寺田幸弘(2010) post ICSI event sin fertilization における配偶子の質. 第14回RMB(生殖医学・生物学)研究会シンポジウム, 11月, 徳島

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

研究代表者

寺田幸弘(TERADA YUKIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10260431