

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592392

研究課題名(和文)手術摘出卵巣からの卵子を用いたヒト加齢に伴う卵子減数紡錘体機能の変化に関する研究

研究課題名(英文) Study of the alteration with aging of human oocyte spindle function using extracted human oocyte in operation.

研究代表者

熊谷 仁 (Kumagai, Jin)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60333936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：8人の子宮体癌 期患者の手術時摘出卵巣から卵胞穿刺して採取した卵子数は、30代群に比べ40代群で有意に減少した。未成熟卵子を体外成熟培養したところ、30代群では成熟卵子が得られたが、40代群では成熟卵子が得られず、成熟能低下が示唆された。体外成熟培養後のヒト卵子を蛍光染色したところ、紡錘体では染色体の配列に異常が観察された。微小管は細胞膜に近接し強く発現しており、細胞膜と相互作用の存在が示唆された。pericentrinは紡錘体の特に細胞膜に接する側の極に発現したが年代での相違はなかった。以上より、手術時摘出卵巣より卵子を回収し、研究に使用可能なヒト卵子を確保する手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：It was used extracted ovaries from eight patients of endometrial carcinoma stage I for this study. We obtained immature oocytes by the puncture on the follicles in ovaries. The number of obtained oocyte of a group of thirties (group A) was more than that of a group of forties (group B) significantly. After the culture in IVM medium, we obtained mature oocytes from immature oocytes of group A, but not from those of group B. It suggests the aging affects the oocyte maturation. We observed irregular arrangement of spindle but also regular one in immunofluorescence staining. The signal of microtubule localized near cell membrane intensely. It suggested the interaction between the microtubule and the cell membrane. The signal of pericentrin existed in contact with spindle and cell membrane and were not different between group A and B.

From the above, we established the method that we obtained the available oocytes for investigations from extracted ovaries in operations.

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：減数紡錘体 加齢 中心体タンパク ポロスコープ 卵巣卵子採取

## 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とんどすべてを決定する」とは近年の人類が展開してきた生殖医学の真実である(Krey et al. 2001)。ヒト卵子の質は患者が30歳過ぎより低下しはじめ35歳を過ぎると急激に下降する。また、21トリソミー(ダウン症)に代表されるヒト染色体異常の発症率は母体加齢により上昇する。女性の結婚年齢が上昇の一途をたどる現在、個体加齢による卵子の機能低下に関する科学的な情報の集積は今後の生殖医学が発展してゆくための急務であるといえよう。現在までに加齢によりその個体が所有する卵子の変化を形態的、機能的に検討した報告は実験動物レベルも含めて極めて少なく、ヒトにおいては殆ど存在しない。その要因は2点考えられ、1つはヒト加齢女性をシミュレートした動物モデルの作成が困難であること、もう1つは現実的に研究に使用するヒト卵子を得る機会自体がなく、ましてや30代後半以降の加齢女性では排卵する卵子の数も限られていることである。

2004年に子宮体がん手術時に摘出される卵巣から未成熟卵子を採取して、体外培養により成熟卵子を得たことがベルギーより報告された。子宮体がんはエストロゲン感受性のがんで、その根治には卵巣を摘出する必要がある。そこで研究分担者の寺田は、旧所属施設(東北大学医学部)倫理委員会の承認と患者同意のもと予備的な検討を行った。患者は35歳の子宮体がんの患者で、摘出卵巣表面の小卵胞を穿刺した。25個の未成熟卵子が得られ、体外培養にて6個が成熟卵子になった(図1)。この結果より、研究に現実的に必要な各年代の卵子が調達可能であることが期待された。

個体加齢による卵子機能の低下の主因として、卵子減数分裂の異常が考えられている。

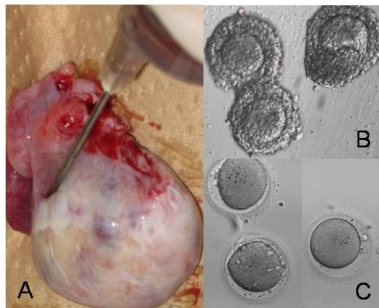


図1: 穿刺による採卵(A)と獲得未成熟卵子(B)および体外培養後の成熟卵子(C)

21トリソミーでは母体の第1減数分裂での姉妹染色体不分離が発症の原因であることが報告されているが、加齢によりその発生率が上昇するメカニズムは明らかになっていない。ヒト卵子減数紡錘体の形態的、機能的

な検討に関して、1996年にBattagliaらが、自然排卵周期のヒト卵子の減数紡錘体を年齢ごとに比較して、40代女性の減数紡錘体はmetaphase plateがdisarrayしている頻度が高いことを報告した。しかし、現在もこの報告が代表的なものとして引用されているほど、ヒト卵子減数分裂紡錘体と個体加齢に関する検討は少ない。また、近年の細胞生物学の発達により、減数分裂紡錘体の機能を調節する諸因子の同定とその機能解析が進んでいる。現在我々は極めて貴重な各年齢層のヒト卵子を調達できる機会を得ている。ヒト個体加齢による卵子の機能低下のメカニズム解明に極めて重要な人卵子紡錘体の形態、機能解析の研究を今回着想した経緯である。

## 2. 研究の目的

本研究は「個体加齢によるヒト卵子の質の低下」というヒト生殖の真実のメカニズムを細胞周期制御の現場の作業員である卵子減数紡錘体機能に着目し明らかにする試みである。婦人科悪性腫瘍の手術時に摘出されるヒト卵巣より卵子を採取し、サンプル収集がきわめて困難なヒト卵子をマテリアルソースとする。得られた卵子の減数紡錘体機能を機能タンパクや実際の極体放出能の観点から解析し、実験動物卵子では得られないヒト個体加齢による卵子機能低下の原因に迫る。すなわち、卵子機能の観点から個体加齢による女性の生殖能低下に関しての基礎的、臨床的な研究の萌芽を誘起する情報を発信する。本研究は生殖医学と婦人科腫瘍学の機能を共に有する当科のような大学病院産婦人科のみで施行可能なチャレンジである。

## 3. 研究の方法

1: 子宮体がん手術時摘出卵巣からの卵子の採取

月経周期の存在する子宮体がん手術前患者より、術前に当院倫理委員会で承認後の卵巣卵子採取に関する説明と同意の所得を行う。手術時に摘出された卵巣表面の小卵胞内容を図1に示すように穿刺、吸引して未成熟卵子を採取する。

2: 減数分裂各相の卵子の採取と体外成熟培養

得られた未成熟卵子は体外成熟培地に供され、成熟(Metaphase : M : 図3上)卵子が採取される。一部の卵子は微小繊維阻害剤であるサイトカラシンD添加培地で成熟が誘導された卵子はMetaphase (M : 図3下)の段階で減数分裂が停止する。これらの卵子を実験に供する。

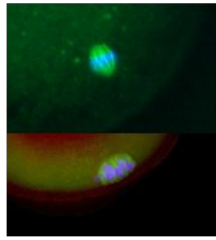


図3. M II 期卵子紡錘体(上)  
とM I 期卵子紡錘体(下)

### 3: 個体年齢による卵子の形体の相違の検討

得られた卵子をポロスコブにて観察することによりその減数紡錘体の成体観察が可能である(図4)。紡錘体の大きさ(極間距離)、第一極体との位置関係、紡錘体の卵子内での位置(卵子細胞膜と紡錘体極との距離と角度)などを観察、計測した上で、年齢群別に比較検討する。

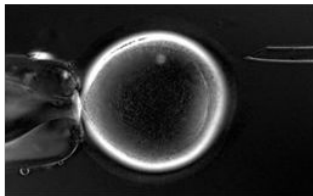


図4. ポロスコブによる紡錘体観察

### 4: 卵子紡錘体機能タンパクの発現の検討

3で生体観察した卵子を固定して、免疫蛍光染色に供する。図5に示すような減数分裂紡錘体の形体を正確に捉えるには固定液温等に細心の注意を払う必要がある。蛍光染色で検討するタンパク群は図5に示すが、大別して  $\alpha$ -tubulin などの中心体機能タンパクとそれを制御する因子群 キネトコアタンパク群、である。さらに、一部の卵子は染色体分離タンパクを標的とした固定法(Hodges, 2002)により処理し、染色体標本を作成する。それらにおける姉妹染色分体接着タンパクであるコヒーシンタンパク(Rec8 など)とそれらを制御するタンパク(セパラゼ、シユ

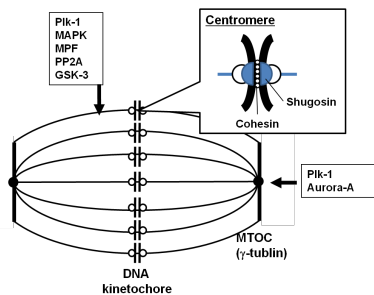


図5. 卵子紡錘体の機能タンパク

ゴシン等)の発現を検討する。それぞれのタンパクの発現度は蛍光抗体法によるその強度の画像解析にて算出される。それらの発現度と採取個体年齢と比較検討し、染色体結合、分離に係る分子の発現と個体年齢との関連を考察する。さらに、年齢別で明らかに発現度が異なるタンパクに関して、AmpliSpeed slide cycler を用いて卵子 1 個あたりの

mRNA を定量し、発現度が相違する裏付けをとる。

### 5: ヒト各年齢層卵子における BRCA-1 の発現の検討

BRCA-1 遺伝子は細胞周期のチェックポイントにおいて染色体分離が正しく行われることに必要とされており、欠損もしくは変異した細胞では染色体分離に異常を生じるとされる。(Wang et al, 2004) 近年、加齢マウスから得られた卵は BRCA-1 発現が低下しており、卵成熟過程において異数紡錘体が発現し染色体の不整列を生じるとの報告がある。BRCA-1 は紡錘体の形成に深く関わっており、発現低下によって紡錘体形成不全を引き起こす。このことから加齢に伴う BRCA-1 の発現低下は、卵における異数体出現の増加に関連があると結論づけている。(Pan et al, 2008)以上の基礎的な知見がヒトの個体加齢で認められないかを、3での紡錘体の生体観察をしたのちの卵子を AmpliSpeed slide cycler を用いて卵子 1 個あたりの BRCA-1 遺伝子の発現を定量する。

### 6: ライブイメージングによる卵子成熟あるいは単為発生誘起後の染色体分離の観察と個体年齢によるその比較

採取した未成熟卵子に微小管結合タンパ EB1-GFP あるいは核を標識する H2B-GFP それぞれをコードする mRNA を顕微注入する(Yamagata, 2005)。注入 2 時間後よりタイムラプス蛍光顕微鏡にて卵子を経時的に観察する。得られた画像を解析して、染色体の結合、分離の挙動を観察し、患者年齢との関連を検討する。さらに、紡錘体形成時期とその形態も観察し、年齢との関連を検討する。さらに、成熟卵子にも同様の処置を施行し分担者の寺田によりすでに報告されている方法でヒト卵子の単為発生誘起を行い、第 2 極体放出時の染色体分離の状況も観察し、患者年齢との関連を検討する。

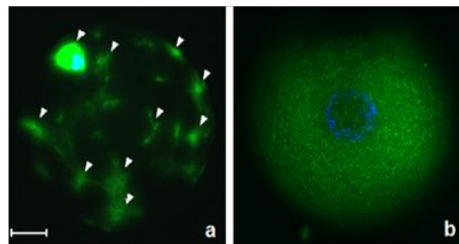


図6. 単為発生誘起2時間後(a)と6時間後(b)の卵子内微小管形成(Terada. Fertil Steril. 2009)

### 4. 研究成果

本研究は、「個体加齢によるヒト卵子の質の低下」というヒト生殖の真実のメカニズムを、卵子減数紡錘体機能の変化に着目し明らかにする試みである。

本研究に先立ち、学内倫理委員会の承認とインフォームドコンセントによる患者同意を取得した。35歳から44歳までの8人の子宮体癌 期患者の手術時に摘出された卵巣を研究に供した。卵巣重量は、30代群

(18.5±0.9 g) に比べて 40 代群 (12.9±1.1 g) で有意に減少していた (P<0.01)。摘出された卵巣表面の卵胞を穿刺して未成熟卵子を採取した。回収卵子数は、30 代群 (21.7±3.8 個) に比べ 40 代群 (4.4±1.8 個) で有意に低下した (P<0.01)。回収した未成熟卵子を体外成熟培養に供したところ、30 代群では成熟卵子が得られたのに対し、40 代群では成熟卵子が得られず、成熟能が低下している可能性が示唆された。体外成熟培養後のヒト卵子を微小管と DNA の蛍光染色に供し減数分裂の様々なステージが観察した。紡錘体については、形態的に正常なものばかりでなく、染色体の配列に異常を認めるものも観察された。ヒト微小管のシグナルは細胞膜に近接する部分で発現が強く、細胞膜との何らかの相互作用の存在が示唆された。中心体関連タンパク質である pericentrin の発現を検討したところ、pericentrin は紡錘体の特に細胞膜に接してする側の極付近に発現し、その発現に 30 代群と 40 代群での相違は認められなかった。以上より、手術時摘出卵巣より卵子を回収し、研究に使用可能なヒト卵子を確保する手法を確立した。本研究成果の一部は、Journal of Assisted Reproduction and Genetics 誌に発表された (Shirasawa H., Kumagai J. et al., 2013)。

#### 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 1 件)

Shirasawa, H., Kumagai, J., Sato, W., Kumazawa, Y., Sato, N., Terada, Y.

(2013) Retrieval and in vitro maturation of human oocytes from ovaries removed during surgery for endometrial carcinoma: a novel strategy for human oocyte research. J Assist Reprod Genet., **30**(9), 1227-30.

〔学会発表〕(計 2 件)

熊谷仁, 舘山奈江, 白澤弘光, 金森勝裕, 金森恭子, 熊澤由紀代, 兒玉英也, 寺田幸弘 (2013) 重症子宮内膜症不妊に対する Ultra-long 法の有効性の検討. 第 54 回日本卵子学会, 5 月, 東京  
熊谷仁 (2013) 染色体異常を有する患者の ART 治療. (シンポジウム) 第 58 回日本生殖医学会, 11 月, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

熊谷仁 (Kumagai Jin)  
秋田大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：60333936

##### (2) 研究分担者

佐藤直樹 (Sato Naoki)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：40447199

寺田幸弘 (Terada Ykihiro)  
秋田大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：10260431

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：