

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23791827
 研究課題名(和文) プロテオーム解析を用いた良好胚獲得のための基礎的検討および新規排卵誘発方法の開発
 研究課題名(英文) Assessment of non-invasive biomarkers for evaluating oocyte quality by proteomic analyses
 研究代表者
 後藤 真紀 (GOTO MAKI)
 名古屋大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：90378125

研究成果の概要(和文)：

1. 研究開始当初の背景：卵胞内の微小環境は卵胞発育に影響するため、良好胚のマーカーとなりうる可能性がある
2. 研究の目的：プロテオーム解析を用いた良好胚獲得のための基礎的検討および新規排卵誘発方法の開発
3. 研究の方法：体外受精採卵時に得られた卵胞液を用いた解析
4. 研究成果：受精卵由来および非受精卵由来の卵胞液において、細胞発育やシグナル伝達、代謝に関与するタンパクの検出数に差を認めた。これらは今後、卵胞発育や卵成熟に関わる因子や良好胚成立のマーカーとなる因子の同定につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：

Non-invasive biomarkers for evaluating oocyte quality might be helpful to improve success rates of assisted reproduction technology. To identify specific biomarkers of the good quality oocytes and bioactive peptides/proteins possibly involved in folliculogenesis. We collected 24 follicular fluids (FFs) from 12 patients who undergone IVF-ET at Nagoya University Hospital. Proteomic analyses were performed by LC/MS. Among all quantitatively-detected proteins, 476 proteins were present in both FFs derived from oocytes of resulting in pregnancy and from degenerated oocytes. 18 proteins were present only in FFs derived from oocytes resulting in pregnancy and 9 proteins were present only in FFs derived from degenerated oocytes. The proteomic analysis using FFs revealed that FFs contain many proteins. Analysis of these peptides/proteins might be helpful to identify biomarkers implicated in folliculogenesis and oocyte quality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 生殖医学

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： 卵胞液 胚発育 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

生殖医学が発展した現在でも卵の質の低下による妊孕性の低下は解決されていない問題である。良好胚獲得は不妊治療成績向上のための最重要課題であるが、卵の質に影響を及ぼす具体的因子は解明されておらず、卵の質の低下に対して有効性が確立された治療は少ない。卵胞発育過程の初期段階において、顆粒膜細胞層の内側に卵胞腔が形成され、卵胞液が貯留する。また、卵胞を構成する卵・顆粒膜細胞・莢膜細胞の間には paracrine, autoaraine, endocrine を介した双方向性のシグナル伝達が存在し、卵胞の正常な発育には不可欠である。良好卵の獲得には莢膜細胞および顆粒膜細胞からのステロイドホルモン分泌や顆粒膜細胞増殖も必要不可欠だが、詳細は未だに明らかになっていない。卵胞液は卵胞発育・卵成熟に影響を与える微小環境のひとつであり、卵胞液の性状や内容物の解析が、卵胞発育に関与する因子や良好卵のバイオマーカーの同定につながる可能性がある。

2. 研究の目的

卵胞液のプロテオーム解析にて、卵胞発育に関与する因子を明らかにし、卵成熟機構の解明および、良好卵のバイオマーカーの同定につながる因子を同定する。また、非黄体化顆粒膜細胞株を用いた検討にて、卵胞発育や卵成熟機構に関与する因子を探索する。

3. 研究の方法

【ヒト卵胞液のプロテオーム解析】

当院倫理委員会の承認およびインフォームド・コンセントを得た上で、体外受精-胚移植を施行した症例に対して採卵時に卵胞液を採取した。12 症例 24 卵胞液（同一症例から受精卵由来卵胞液と未成熟卵もしくは変性卵由来卵胞液を 1 検体ずつ採取）を用い、ハイブリットフリーエ変換型質量分析計を用いた LC/MS により卵胞液のプロテオーム解析を行った。同一症例において受精の有無や胚グレード、妊娠成立胚であるかどうかなどの因子について比較検討した。また年齢、卵巣の反応性、多嚢胞性卵巣症候群/PCOS の有無などとの関連を解析した。

【非黄体化顆粒膜細胞株の機能解析】

我々がすでに不死化遺伝子導入により樹立した、ステロイド産生能を有する

不死化ヒト顆粒膜細胞株を用いて、この細胞株の性質を解析し、FSH や卵細胞由来の卵発育制御因子と考えられている GDF-9 を添加した際の遺伝子発現を microarrar、定量的 RT-PCR を用いて解析した。

【ラット PCOS モデルの作成と解析】

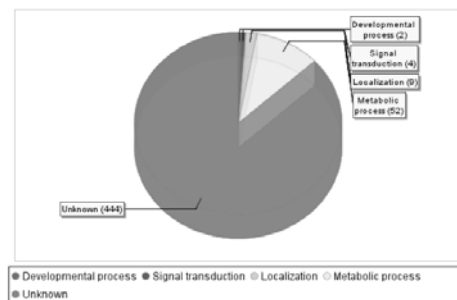
8 週齢 WKY/Ncr1Cr1j 雌ラットを抗プロゲステロン剤である RU486 単独投与群、インスリン単独投与群、RU486+インスリン投与群、コントロール群に分けて浸透圧ポンプを利用した持続皮下投与による薬剤投与を行い、PCOS モデルを作成した。さらにそれぞれの群を短期間投与群、長期間投与群に分類し、卵巣重量や発育卵胞数、血中ホルモン値（FSH, LH, エストラジオール, テストステロン, プロゲステロン）などを比較検討した。

4. 研究成果

【ヒト卵胞液のプロテオーム解析】

対象患者の年齢は、 34.5 ± 4.3 歳 (mean \pm SD, 29 ~ 45 歳) であった。検出したタンパク総数は 503、検出したペプチド総数は 1658 であった。検出したタンパクを生体内作用で分類すると、developmental process, signal transduction, localization, metabolic process に関与するものがそれぞれ 2, 4, 9, 52 種類存在した。その他は作用不明であった。

図 1. 同定された総タンパクの生体内



作用別の内訳

検出ペプチドに関しては、受精卵由来卵胞液のみ、未成熟卵もしくは変性卵由来卵胞液のみ、両者共通で検出されたペプチドがそれぞれ、349, 211, 1098 であった。検出タンパク質（総数 503）に関しては同様に、18, 9, 476 であった。受精卵由来卵胞液のみに検出されたタンパク質として、Fibronectin-binding protein A (Fbp), Acetate kinase, lens

gamma-s-crystallin-human (fragments), Mitochondrial enolase superfamily member 1, phosphoprotein phosphatase, 5-methylcytosine-specific restriction endonuclease などが同定された。

表 1. 受精卵由来卵胞液のみで検出されたタンパクの内訳

Identified Proteins(18/503)受精	Molecular W	Accession N
1 Fibronectin-binding protein A (Fbp)	112kDa	FNSA_STAA8
2 Protein yibA OS	32kDa	YIBA_EC057
3 Acetate kinase	44kDa	ACKA_ANAVT
4 lens gamma-s-crystallin - human (fragments)	0	g 1362852
5 Mitochondrial enolase superfamily member 1	50kDa	ENOF1_KENLA
6 phosphoprotein phosphatase	0	g 227878881
7 5-methylcytosine-specific restriction endonuclease	0	g 300310547
8 hCG2040526, isoform CRA_b [Homo sapiens]	0	g 119587144
9 Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G OS	23kDa	RSMG_SHEAM
10 Immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]	0	g 118406175
11 Agmatine deiminase OS	40kDa	AGUA_PSEFS
12 immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]	0	g 14589225
13 immunoglobulin kappa chain variable region [Homo sapiens]	0	g 14268408
14 immunoglobulin kappa light chain variable [Homo sapiens].	12kDa	g 1568567
15 immunoglobulin kappa chain [Homo sapiens]	12kDa	g 186048
16 immunoglobulin kappa light chain variable region	12kDa	g 98956324
17 Chain A		g 171848737
18 tripartite motif-containing 43		g 119591726

Identified Proteins(9/503)非受精	Accession Number
1 immunoglobulin kappa light chain variable region	g 70797833 (+1)
2 conserved hypothetical protein	g 304437553
3 putative transcriptional regulator	g 125623972
4 diaminoopropionate ammonia-lyase	g 157162332 (+2)
5 50S ribosomal protein L14	g 57238704
6 GTP-binding protein YPT53 OS	YPT53_YEAST
7 anti-HPA-5b immunoglobulin light chain variable region	g 37780335
8 unnamed protein product	g 34531444
9 selenoprotein T precursor	g 42789380

表 2. 非受精卵由来卵胞液のみで検出されたタンパクの内訳

また、PCOS 症例 (n=4) と非 PCOS 症例 (n=20) で検出タンパクを比較し、検出タンパク数はそれぞれ 39.2 ± 16.9 、 82.5 ± 36.3 と差を認めたが、検出タンパクの生体内作用などに一定の傾向は認めなかった。その他の患者背景についても一定の傾向は認めなかった。

【非黄体化顆粒膜細胞株の機能解析】

樹立した細胞株 HGrC1 は、フォルスコリン刺激で培養上清中のエストラジール・プロゲステロン産生が増加した。初期卵胞発育に関する因子の発現を定量的 RT-PCR で確認したところ、BMP-2, -5, -6, AMH, BMP レセプターの発現を認めた。また、BMP-4, -15 添加により Smad-1, -5, -8 のリン酸化を認めた。さらにはアクチビン刺激によって FSH レセプターが誘導された。これらの結果より、HGrC1 は正常顆粒膜細胞のゴナド

トロピン非依存性から依存性の獲得を再現できる細胞株であると考えられた。

図 2. HGrC1 培養上清中のステロイドホルモン産生

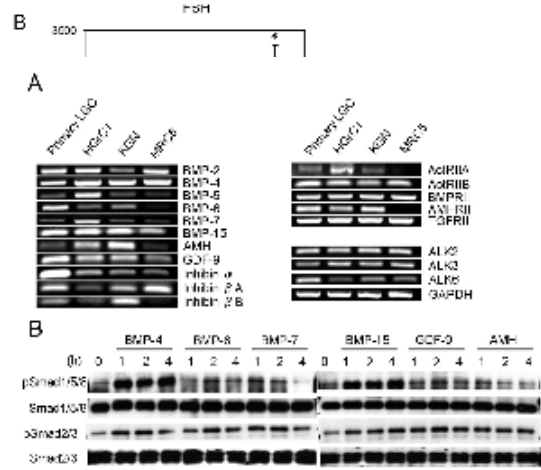


図 3. 定量的 PCR による各因子の発現および BMP 刺激による smad リン酸化の変化

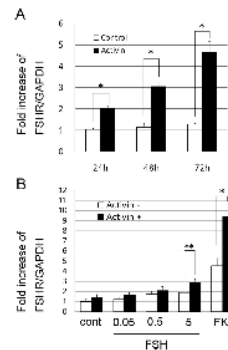


図 4. アクチビン刺激による FSH レセプターの発現変化

次に HGrC1 に GDF-9 添加をすることにより、顆粒膜細胞間 gap junction を主に構成する CX43 とコレステロール合成経路にある酵素である HMGCS, HMGCR, FDFT1, SQLE, LSS, CYP51 などの mRNA 発現上昇を認めた。これらは FSH 添加によりさらに発現量は増加し、CX43, HMGCS, CYP51 では相加効果を認めた。CYP51 は卵細胞の減数分裂を再開させることで知られている FF-MAS を合成する酵素であり、CYP51 発現に GDF-9 と FSH が相加効果を示したことは、卵胞と卵発育における両者の相互関係を示唆していると考えられる。

【ラット PCOS モデルの作成と解析】

RU486 単独投与群、インスリン単独投与群、RU486+インスリン投与群、コントロール群の各群において体重変化には有意差はなかった。RU486 投与群では短期間投与で血中エストラジオール値、テストステロン値が増加した。インスリン単独投与群では血中ホルモン値に変化を認めなかったが、RU486+インスリン投与群では RU486 単独投与群と比較して血中エストラジオール値が増加する傾向を認めた。インスリンは RU486 による視床下部-下垂体-卵巣系への影響を修飾している可能性は示唆された。

今後これらの研究結果をさらに比較解析することにより、卵の質、加齢による変化などに関係するマーカーが同定できる可能性がある。

引用：

Establishment of a human nonluteinized granulosa cell line that transitions from the gonadotropin-independent to the gonadotropin-dependent status.

Bayasula et. al.
Endocrinology. 2012 Jun;153(6):2851-60.
(図2、図3、図4)

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)

Establishment of a human nonluteinized granulosa cell line that transitions from the gonadotropin-independent to the gonadotropin-dependent status.

Bayasula, Iwase A, Kiyono T, Takikawa S, Goto M, Nakamura T, Nagatomo Y, Nakahara T, Kotani T, Kobayashi H, Kondo M, Manabe S, Kikkawa F.

Endocrinology. 2012 Jun;153(6):2851-60.
査読有

[学会発表] (計 4 件)

卵胞プロテオーム解析を用いた卵胞発育および卵成熟機構に関与する因子についての検討

後藤真紀, 岩瀬明, 中村智子, 廣川和加奈, 中原辰夫, 小林浩治, 滝川幸子, 眞鍋修一, 吉川史隆

第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会
2011. 8. 30 (大阪市 大阪国際会議場)

卵胞発育に関与する因子探索を目的とした卵胞液プロテオーム解析

巴雅蘇拉, 岩瀬明, 杉田敦子, 近藤美佳, 中村智子, 中原辰夫, 滝川幸子, 小林浩治, 眞鍋修一, 後藤真紀, 吉川史隆

第 56 回日本生殖医学会学術講演会
2011. 12. 8 (横浜市 パシフィコ横浜)

インスリンおよび RU486 投与による PCOS モデルラット作成の試み

近藤 美佳, 岩瀬明, 杉田敦子, 中村智子, 中原辰夫, 滝川幸子, 眞鍋修一, 後藤真紀, 吉川 史隆

第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会
2012. 4. 14 (神戸市 神戸国際展示場)

ヒト顆粒膜細胞における CX43 とコレステロール合成酵素の発現解析

中村智子, 岩瀬明, 杉田敦子, 近藤 美佳, 中原辰夫, 滝川幸子, 眞鍋修一, 後藤真紀, 吉川 史隆

第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会
2012. 4. 14 (神戸市 神戸国際展示場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 真紀 (GOTO MAKI)

名古屋大学医学部附属病院・助教

研究者番号：90378125

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし