

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592455

研究課題名(和文) 卵子成熟と関連したヒト及びマウス流産因子の検索と人為的卵子改良の検討

研究課題名(英文) Factors involved in an increase of the miscarriage rate with maternal age: Attempt to improve artificially oocyte quality in human

研究代表者

渡邊 誠二 (Watanabe, Seiji)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10241449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの未熟卵子を人工的に成熟させた卵子(ヒト老化モデル卵子)は、40代女性の老化した卵子と同じ性質を示します。このモデル卵子を使って卵子の老化現象の解明を試みました。その結果、老化モデル卵子をある薬剤で処理すると老化現象が緩和され、受精したあとの成長が促進されることが明らかになりました。さらに、この卵子老化の緩和は、細胞分裂を調節する蛋白の量が卵子の内部で変化したこと引き起こされていた。その他にも様々な遺伝子を比較した結果、卵子の老化に伴って働きが変化している可能性のある蛋白が多数認められました。これらのデータを更に解析することで人為的に卵子を若がえらす手段を確立して行きます。

研究成果の概要(英文)：It is well known that an increase of the miscarriage rate and cytogenetically abnormal infants is related to maternal age. This phenomenon is called "oocyte aging". Immature human oocytes, which are obtained in the treatment of infertile female patients, are useful as a model of the oocytes obtained from aged females. We attempted to reveal mechanism of oocyte aging using the model oocytes. As a result, it becomes clear that oocyte development is improved when the oocytes are treated with a kind of chemical. The fact was also found that the improvement of oocyte quality was caused by an increase of cell cycle dependent proteins, which control chromosome distribution during cell division. Furthermore, cytogenetic analysis showed that expression of many genes altered in the model oocytes after the chemical treatment. As a next step, we are going to examine relationships between the genes and oocyte aging.

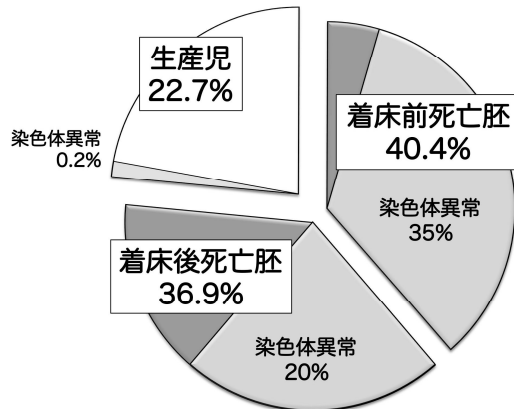
研究分野：精子、卵子および受精卵の発生遺伝学

キーワード：卵子の老化

1. 研究開始当初の背景

ヒトの自然妊娠における出産率が約23%と他の哺乳動物に比べて著しく低いのは、母体の加齢に伴って成熟不良や加齢変性で生じた染色体異常を伴う卵子が多く排卵され、受精後に淘汰されるためである(図1)。

(図1) ヒトの胚淘汰と染色体異常



「卵子の老化」と呼ばれるこの現象のメカニズムには不明な点が多く、これを抑制する試みはこれまで報告されていない。

これまでの研究により、我々は生殖医療の過程で得られたヒト未成熟卵子を人為的に成熟させた場合、染色体の分離異常が高頻度に出現し受精後の発生も極めて不良である点で高齢女性の卵子と類似していることを見出していた。この事実は、卵子の成熟不良と老化には共通した現象が認められることを示している。さらには、細胞分裂を制御する微小管蛋白質を安定化する薬剤でこれを処理すると卵子老化現象が緩和されることを発見した。これらの結果から、薬剤による老化現象緩和前と後でヒト未成熟卵子の性質を比較することにより卵子老化に関わる因子を特定することができ、同時に老化を抑制する手法の開発が可能であるとの着想に至った。

一方、哺乳類卵子成熟関連因子についてはマウス及び家畜卵子の体外成熟系を利用した研究により明らかになりつつある。卵成熟には卵子を取り囲む顆粒膜細胞からのギャップジャンクションを介した cAMP 流入が重要で、卵子内に蓄積された cAMP が PDE3 により加水分解されて急激に減少すると抑制を受けていた卵核胞崩壊が誘起されて減数分裂(核成熟)が進行する。平行して、卵成熟中に卵子から分泌される GDF9 や BMP15 などのサイトカインは顆粒膜細胞の Kit リガンド放出を促進し、これが Kit レセプターを介して卵成熟を促進する事が報告されている。我々は短命であるマウスは年齢に伴う発生異常に大きな差が出難いため卵子老化研究には不向きとこれまで考えていた。しかし、未熟なマウス卵子を体外で成熟させる「体外成熟」技術と精子を受精させずに卵子を発生させる「雌性発生」技術を組み

合わせることで発生異常が顕著に現れることを見出した。すなわち、この手法を用いてヒト卵子老化現象に関わる因子の検索が可能であると考えた。

2. 研究の目的

(1) 卵子老化現象の一つである染色体異常が引き起こされる原因を明らかにするため、染色体の分配を制御する細胞周期蛋白質の変化を検証する。未熟な卵核胞期卵子を微小管重合安定剤で処理した老化卵子モデルで確認された老化現象の緩和は、微小管分布とそれにかかわる細胞周期関連蛋白が老化関連因子であることを示唆している。そこでオーロラ蛋白はある種のガン細胞において異常発現をおこしており、細胞ガン化に伴う染色体異常増加の誘因となっている。ヒト卵子の老化においても染色体異常の増加が顕著でありオーロラ蛋白の関与が疑われる。

(2) ヒト未成熟卵子の遺伝子の働きの変化を老化緩和前後で比較し、老化現象に関わる未知の因子を検索・同定する。卵子の老化には染色体異常のような遺伝的要因と蛋白質の変性や分解のような細胞質因子による要因の両者が関わっていると推測される。そのため、マイクロアレイを用いて網羅的に老化因子を検索し、多角的に卵子老化研究を行う。

(3) 体外成熟と雌性発生を組み合わせたマウス卵子発生において、発生異常と染色体異常の増加を検出して卵子老化との共通性を見出すと共に、これを解析する。体外受精を行った場合には、体外成熟における成熟の善し悪しは検出するのが難しい。これは、精子の受精によって卵子の成熟不良が補われるためと解釈できる。したがって、精子の関与する媒精は行わない。

3. 研究の方法

(1) 微小管重合安定剤処理前後においてヒト未成熟卵子の染色体分配に関わるオーロラ蛋白の発現を蛍光免疫組織化学により検出・比較した。微小管重合安定剤(10ng/ml)で1時間処理したヒト未成熟卵子及び未処理のヒト未成熟卵子をホルムアルデヒドで固定し、抗オーロラ蛋白抗体で蛍光標識した後にレーザー顕微鏡によりオーロラ蛋白の分布を検出した。

(2) 微小管重合安定剤(10ng/ml)で1時間処理したヒト未成熟卵子及び未処理のヒト未成熟卵子をマイクロチューブに微量の培養液と共に移して液体窒素により瞬時に凍結した。このサンプルより mRNA を抽出してマイクロアレイ(外注)により遺伝子発現の差を比較した。

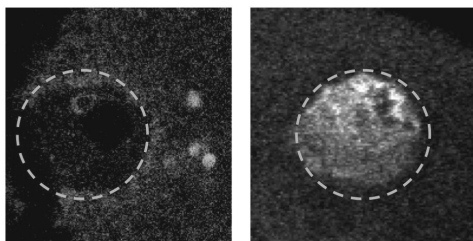
(3) 幼若マウス及び老齢マウスの卵巣から未成熟卵子を採取し、体外培養して成熟卵を

得た。この卵子をストロンチウム処理により人為的に活性化させて胚盤胞への発生を段階的に観察した。同時に各発生段階で漸進固定空気乾燥法を用いて染色体標本作製し、染色体分析により成熟不良卵子に起こる染色体異常のパターンを確認した。

4. 研究成果

(1) ヒト老化卵子モデルではオーロラ蛋白の発現量が低下：老化卵子モデル系と微小管重合安定剤処理の組合せが老化関連蛋白の検索に有効であることが明らかになった。

図2 卵核胞でのオーロラ発現



処理 (-) 処理 (+)

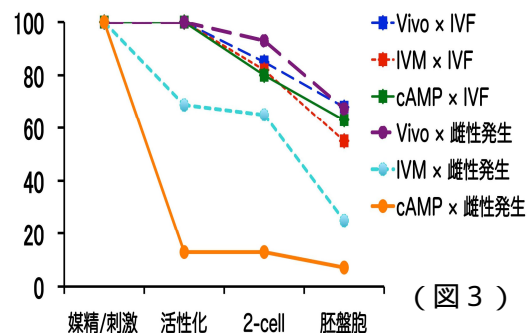
そこで、がん細胞において核分裂に先立ち細胞質から核に移行して染色体凝集と分配を制御するオーロラ蛋白の蛍光免疫染色を試みた。その結果、陽性コントロールのマウス卵子ではオーロラ蛋白は未成熟卵子の核及び成熟卵子の紡錘体に局在するのに対し、ヒト老化モデル卵子では卵核胞内にオーロラ蛋白が検出されなかった。一方、微小管重合安定剤処理後には卵核胞内で特にリン酸化オーロラ蛋白の発現上昇が認められ、卵子老化現象の一因がオーロラ蛋白の発現異常であることが示唆された(図2)。

(2) マイクロアレイによる老化モデル卵子の遺伝子発現変化：マイクロアレイを用いて微小管重合安定剤処理前後にヒト未成熟卵子の mRNA 転写量を比較した。その結果、サイクリンを含む細胞周期蛋白、エンドサイトシス/エキソサイトシス関連膜輸送蛋白、微小繊維関連蛋白に大きな発現量の差が認められた。この結果は微小管との相互作用により調節を受ける因子が予想以上に多いことを示していた。老化卵子では受精後の極体放出が乱れることで染色体異常が増加することが認められている。この現象には微小線維による収縮環形成とその収縮機能の低下が関わっている可能性が十分に考えられ、今後、微小繊維関連蛋白の分布を可視化する必要がある。一方、エンドサイトシス/エキソサイトシスには微小管上の小胞輸送が関わっていることが知られている。エキソサイトシスでは微小管の安定化により細胞膜方向に向かう物質輸送が促進されている可能性がある。卵子の成熟には卵子の放出するサイトカインが影響することは先に述べた通りで、細胞質の老化に関わる因子として注目

に値する。エンドサイトシスでは核方向に向かう物質輸送が促進されている可能性がある。サイクリン関連蛋白は細胞分裂を直接的にコントロールする因子である。これらの因子の変化を経時的にモニタリングしてその機能変化をとらえることが重要と考えられた。今後、以上の点について卵子老化改善にかかわる因子としてさらに詳細に解析を行っていく。

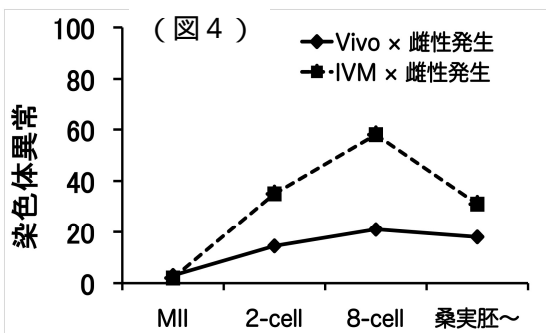
(3)

マウスにおいて一般的な体外受精(IVF)による評価法では卵子成熟の度合いによる発生率に差が出難い(IVF 群)。これに対し体外成熟と雌性発生を組み合わせた評価法では卵子成熟の度合いにより発生率に大きな差が出た(図3、雌性発生群)。また、IVF では cAMP を人為的に上昇させた卵子(cAMPxIVF)は IVM 卵子(IVMxIVF)に比べ発生率が上昇するが新法では全く異なる性質を示す(cAMPx雌性発生)。この結果は IVF では受精刺激や精子 DNA の発現が卵子の質的低下を潜在化させることを示唆しており、IVM 卵子での胚盤胞形成率の改善が必ずしも出産率の上昇に繋がらない事実とよく一致する。



以上から、雌性発生評価法は成熟不良及び加齢変性卵子に生じる変化をより正確に評価でき、そのメカニズム解明に有効と期待される。他方、雌性発生評価ではマウス成熟不良卵子において卵活性化と極体放出が著しく乱れることが明らかになり、細胞膜の流動性が変化していると考えられる。

また、この現象が卵割初期のモザイクや倍数性染色体異常増加の一因であることも示唆された。体外成熟させたマウスの成熟不良卵子では極体放出が乱れ易くなり、本来、一倍体であるべき雌性発生卵子が二倍体とな



る染色体異常頻度が高まった(図4)。この点は、高齢女性から得られるヒト卵子と類似しており、老化研究に良いモデルとなる。

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 2件)

. Tanaka, I. Tanaka, M. Nagayoshi, H. Kusunoki, S. Watanabe. Rescue of aged oocytes using metaphase-II nuclear transfer with various kinds of fusion techniques. Fertility and Sterility, Vol. 100, 2013, S232

. M. Nagayoshi, A. Tanaka, I. Tanaka¹, H. Kusunoki, and S. Watanabe. Pgd or natural conception: recommendations for couples with recurrent miscarriages caused by translocation chromosomal aberrations. Hum. Reprod. 28. 2013 (suppl 1): i291-i311.

[学会発表](計 8件)

. 渡邊 誠二、染色体接着および胚盤胞発生率に及ぼす微小管重合安定剤の影響、国際生殖学会 2015、2015年4月26-29日、パシフィコ横浜(横浜)

. 田中 威づみ、渡邊 誠二、他、イオノマイシンによるヒト卵子単為発生の誘発、国際生殖学会 2015、2015年4月26-29日、パシフィコ横浜(横浜)

. 渡邊 誠二、染色体接着および胚盤胞発生率に及ぼす微小管重合安定剤の効果、日本解剖学会、2015年3月21-23日、神戸国際会議場(神戸)

. 森 麻理奈、渡邊 誠二、他、イオノマイシン・ピューロマイシン併用法によるヒト卵子活性化能の検討、日本受精着床学会、2014年7月31-8月1日、ハイアットリージェンシー東京(東京)

. 田中 威づみ、渡邊 誠二、他、イオノマイシン・ピューロマイシン併用法によるヒト卵子活性化能の検討、日本生殖医学会、2013年11月15-16日、神戸国際会議場(神戸)

. 渡邊 誠二、ARTにおける卵子及び精子染色体異常、東北生殖医学会、2013年11月2日、ワラッセ(青森)

. 渡邊 誠二、ヒトIVM卵子及びマウス卵子におけるオーロラ蛋白分布の比較、日本受精着床学会、2013年8月8-9日、別府B-Con Plaza(別府)

. 加藤 由香、渡邊 誠二、他、電気刺激

及び Ionophore、Puromycin を用いた卵子活性化の検討、2012年11月8-9日、長崎ブリックホール(長崎)

[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

(1)研究代表者

渡邊 誠二(WATANABE, Seiji)

弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10241449

(2)研究協力者

田中 温(TANAKA, Atsushi)

セントマザー産婦人科医院・医学博士

森 真理奈(MORI, Marina)

セントマザー産婦人科医院・胚培養師