

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861464

研究課題名(和文) ヒト卵子における減数分裂制御蛋白の個体加齢による発現量変化に関する研究

研究課題名(英文) Study on relationship of change of expression of meiosis control proteins and aging in human oocytes.

## 研究代表者

白澤 弘光 (Shirasawa, Hiromitsu)

秋田大学・医学部・医員

研究者番号：60598019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：17症例の未成熟卵子について検討を行った。患者は35歳～43歳と妊娠率が大きく低下する年齢層であり、今回のデータはヒト卵子の個体加齢を検討する上で重要である。166個の卵子を得て、ヒト卵子を効率的に回収できること、回収した各年齢層の未成熟卵子を第2減数分裂期まで体外成熟培養可能であることも明らかにした。また、回収されるヒト卵子が年齢依存性に、つまり加齢によって統計学的に有意に減少することも明らかにした。併せて、コヒーシン蛋白(REC8, SGOL2)の検討を行った。定量方法としては蛍光免疫染色を用いてRelative Intensityで評価した。

研究成果の概要(英文)：We examined the immature oocytes of 17 cases with endometrioid adenocarcinoma. Patients of this study are 35-43 years old and are the age group where pregnancy rate greatly decreases. This data are important in examining human oocytes quality and association of aging. We obtained 166 oocytes in this study. It was found that we could collect human oocytes from resected ovaries effectively. We conducted in vitro maturation for the immature oocytes and, we were able to mature them to meiosis II stage. We made clear that retrievable oocytes from ovaries significantly decreased in age dependency. We reported these in JARG in 2013. Also, we examine it for the expression level of the cohesin protein (REC8, SGOL2). We evaluated them using fluorescence immunostaining as a method of the fixed-quantity evaluation in Relative Intensity. We reported the above in Sanka-to-Fujinka, 2015 (in Japanese). Also, we conducted oral presentation in International Federation of Fertility Societies of 2015.

研究分野：産婦人科学、生殖内分泌学

キーワード：減数分裂 コヒーシン蛋白 体外成熟培養 ヒト卵子 卵子老化 REC8

## 1. 研究開始当初の背景

高齢女性において妊娠率、生児獲得率が低下することは紛れもない事実である。その原因として「**卵子の老化**」が関与することは広く知られている。女性の晩婚化が進んだ現在、本邦においても挙児希望女性の年齢は上昇し、不妊症患者の平均年齢も増加している。体外受精-胚移植においては、患者の年齢が35歳以上になると成績は年齢依存性に低下する。しかし米国CDCの2008年の報告にあるように、若年女性の提供卵を高年齢の患者に移植した場合には、40代後半の女性でも20~30代の女性と同等の妊娠率が得られている。このように妊娠率に大きく関与するのは「**卵子の質**」であり、これが年齢依存性に低下することは事実である。しかし、**なぜ加齢に伴って卵子の質が低下するかということについては、知見が未だ十分に得られていない**。女性の加齢により出生する児の染色体異常率が上昇することは知られている。また、2回の減数分裂過程において発現し、染色体の分離に関与すると考えられている機能タンパクが近年解明されてきている。そのなかの一部は、マウス卵子などの動物実験レベルではその機能異常により減数分裂過程での染色体異常が引き起こされることが推測されている。しかし、それらの検討はヒト卵子では未だ行われていない。加齢による妊孕性の低下はヒトなど長生きする大型動物にのみ認められ、マウス卵子等では検討不能であり、ヒト卵子を用いてその検討が行われる必要がある。

## 2. 研究の目的

母体加齢に伴い誕生する児の染色体異常が増加するという事実は、結婚年齢の上昇などを背景に今後の生殖医学の展開で、そのメカニズムを解明すべき喫緊の事項である。このヒトにかなり特化した現象の解明にはヒト卵子を用いる必要がある。染色体分離に関わる種々の蛋白の機能が、卵子減数分裂のステージでも解明が進んでおり、動物実験系ではその蛋白発現の異常が染色体異常を惹起する可能性が示唆されている。我々は子宮体癌患者の摘出卵巣から各年齢層の研究に供する卵を得る方法を確立している。本研究ではこれらヒト卵子を用いて、第I減数分裂、第II減数分裂に関与する**コヒーシン蛋白である Rec8 の発現**と、コヒーシン蛋白の保護をする**Shugoshin 2 の発現量**を各年齢層の卵子より定量して比較検討する。以上の検討より、「**ヒト個体加齢に伴う卵子の老化**」で重要な、染色体分離異常増加の機序の一端を、**各年齢層のヒト卵を用いて初めて明らかにすること**を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は主に **1)子宮体癌患者からの卵巣摘出 2)摘出卵巣からの卵子回収および体外成熟培養 3)成熟卵子における Rec8, Sgo2 発現の検討** という3点に大きく別れる。また **Rec8, Sgo2 の発現の検討** に関してはそれぞれについて**蛍光免疫染色**による蛋白の分布の確認、および**蛍光 Western blot 法、GFP**を用いた蛋白定量評価を行う。

本研究においては卵巣を摘出する際に婦人科腫瘍専門医が、摘出卵巣からの卵子回収および体外成熟培養に関しては生殖医学会生殖医学指導医および胚培養士が、Rec8, Sgo2 に関しては産婦人科専門医の他、実験技術補佐員が複数名担う。

### 子宮体癌患者からの卵巣摘出

対象は45歳以下の子宮体癌患者で、進行期がI期であり、同意を得られた患者とする。子宮体癌I期患者を対象としたのは、**比較的若年にも認められ、標準術式として卵巣摘出が必須であり、卵巣には転移が認められないため病理検索にも影響を与えない**という利点があるからである。当院の過去の手術件数で照らし合わせると年間10件程度の患者が対象になると考えられる。

具体的な手順としては手術開始後に腹腔内を検索し、腹腔内に病変が及んでいないことを腹腔洗浄細胞診および視診で確認した後、両側卵巣を摘出する。卵巣の摘出に関しては研究協力者として婦人科腫瘍専門医もしくは産婦人科専門医が担う。

### 摘出卵巣からの卵子回収および体外成熟培養

摘出卵巣を速やかに研究室に運び、19ゲージの針を用いて卵胞液が存在しそうな部位を穿刺する[図1A]。片側の**卵巣あたり15か所程度を穿刺**し、顕微鏡下で卵胞液内から卵丘細胞に覆われた未熟な卵子を探し回収する。得られた卵子の体外成熟培養に関しては20% Systemic Serum Substitute と 75 mIU/mL recombinant follicle stimulating hormone を含んだ M199 メディウム(Gibco Labs, Grand Island, NY)内で行う。培養器内で24時間培養し、卵丘細胞を除去した後に顕微鏡下に極体の放出の有無を確認する。極体の放出が確認され図1Cのような成熟卵子が得られた後に固定に移り、極体を確認できなかった場合は再度24時間の培養を行った後固定をする。摘出卵巣からの卵子回収および体外成熟培養に関しては研究協力者として生殖医学会生殖医学指導医、産婦人科専門医および胚培養士が担う。

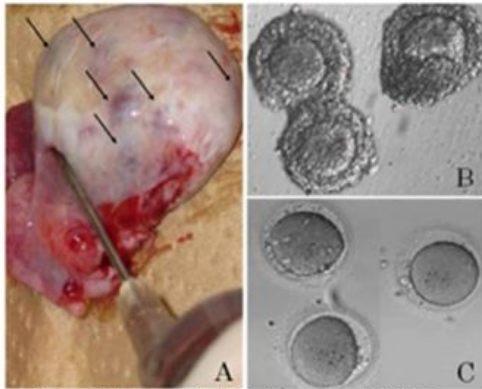


図1 摘出卵巣からの未成熟卵子および成熟卵子

### 成熟卵子における Rec8, Sgo2 発現の検討

**コヒーシン蛋白である Rec8** は、第 1 減数分裂では相同染色体が紡錘体のそれぞれの極に正しく分離するように、微小管と染色体をつなぎ合わせる役割を担い、第 2 減数分裂では除去されることで姉妹染色分体が正しく分離する。**Sgo2** はこの Rec8 の安定性に寄与する蛋白である。

マウスにおいては Chiang T (Curr Biol, 2010) が高齢マウスで Rec8 の発現が低下していることを報告している。また Sgo2 についても Lister LM (Curr Biol, 2010) が高齢マウスで発現が低下し、低下によって染色体配列異常が増加することを報告している。

ヒトの卵においても Rec8, Sgo2 ともに発現することが知られているが、**ヒトにおいては各年齢層による発現の変化についてこれまで報告されていない**。今回は研究 で得られた卵を用いて Rec8, Sgo2 の発現を検討する。

#### -1 蛍光免疫染色による発現の評価

研究 によって得た GV 期から第 2 減数分裂に至る各ステージのヒト卵を用いて Rec8, Sgo2 の発現が各年齢層のヒト卵によってどのように異なるかを検討する。Rec8 の発現の確認については蛍光免疫染色を行う。また Sgo2 の発現の確認については抗 Sgo2 抗体を用いて染色する。

これらの**蛍光免疫染色による発現の所見を各年齢層の卵子ごとに評価**する。また各蛋白の発現が染色体の部位によって程度が異なるかといった、形態学的な評価も試みる。

#### -2 Western blot による Rec8 の定量的評価、Western blot および GFP を用いた Sgo2 の定量評価

研究 で得られた各年代の卵子を用いて Rec8 の定量化による評価は**蛍光 Western blot 解析**(トランスプロット Turbo プロテイングシステム使用)を行って評価する。

以上のデータを、各年齢層(35 歳以下、35 歳-40 歳、40 歳以上などの各群)ごとに検討し、年齢によって Rec8, Sgo2 の卵子における発

現に差があるかを確認する。これらの検討によって、卵子の染色体異常に關与する蛋白の発現率が各年齢層によって異なるという、ヒト卵子の老化に關わる知見を、染色体分離の観点から**世界で初めて得ることができる**。

これまでは**倫理的問題、法的規制のため、研究用のマテリアルとしてヒト卵を十分に得る事は難しく**、ヒト以外で得られた卵子老化の機序をヒト卵を用いて確認することが困難であった。特に日本では、ボランティアの各年齢層の女性から、経腔的に穿刺して卵子を得るシステムの構築は不可能であると考える。体外受精時の余剰胚を研究用に供するというのも、未受精卵を研究に使用するには難しい。今回の研究は悪性婦人科腫瘍の手術件数が多く、体外受精件数が全国の大学病院の中でも上位である**当大学病院であるからこそ、症例数が集まり実現可能**であると考える。

#### 4. 研究成果

我々は期間中に計 17 症例において、子宮体癌患者の摘出卵巣から回収した未成熟卵子について検討を行った。婦人科悪性腫瘍患者の手術時に未成熟卵子を得る報告は複数存在するが、我々が検討した症例数はこれまでの報告の中で最も多い。また、未成熟卵子を用いて検討を行った患者の年齢も 35 歳から 43 歳と、生殖年齢において妊娠率が大きく低下する年齢層であり、今回得たデータはヒト卵子の個体加齢を検討する上で重要である。我々は 17 症例、計 166 個のヒト未成熟卵子を用いて検討を行った。ヒト卵子を検討する上でマテリアルの確保が非常に重要であるが、子宮体癌患者から研究に用いるヒト卵子を効率的に回収できることをまず明らかにした。また、回収した各年齢層の未成熟卵子を第 2 減数分裂期まで体外成熟培養可能であることを、つまり、研究に用いる各分裂期の卵子をそれぞれ確保可能であることも明らかにした。また、子宮体癌患者の卵巣から回収されるヒト卵子が、年齢依存性に、つまり加齢によって統計学的に有意に減少することも明らかにした。

これらの新知見は研究代表者である白澤が 2013 年 9 月に J Assist Reprod Genet. において英文誌として報告している。これにより、各年齢層の卵子において減数分裂過程で重要となるコヒーシン蛋白の発現量を検討することが可能となった。

年齢と未成熟卵子の体外成熟培養率と併せて、コヒーシン蛋白である REC8 および SGOL2 などの検討を行った。定量方法としては蛍光免疫染色を用いて Relative Intensity で評価した。その結果および評価法は白澤が 2015 年 2 月の「産科と婦人科」において論文発表し、また同年 4 月の国際学会である

International Federation of Fertility Societies で口演した。

#### 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2件)

\*すべて査読あり

白澤弘光(2015) 若手の最新研究紹介コーナー ヒト卵子における減数分裂制御蛋白の個体加齢による発現量変化に関する研究. 産科と婦人科. 82:313-315  
Shirasawa H, Yoshioka T, Sawada K, Terada Y(2014) Repeated recombinant activated factor VII administration in a patient with congenital factor VII deficiency undergoing modified radical hysterectomy : a case report. Haemophilia. 20(1):e101-103  
doi: 10.1111/hae.12312.

[学会発表](計4件)

白澤弘光, 熊谷仁, 富樫嘉津恵, 佐藤亘, 熊澤由紀代, 井原基公, 宇都宮裕貴, 八重樫伸生, 寺田幸弘(2015) 卵胞液の施設間輸送方法の改善が、摘出卵巣由来のヒト未成熟卵子に対する体外成熟培養結果へ与える影響に関する検討. 第67回日本産科婦人科学会, 4月10~12日、パシフィコ横浜(横浜)

Shirasawa H, Kumagai J, Sato E, Kumazawa Y, Sato W, Togashi K, Terada Y(2015) Novel rapid immunofluorescence staining method for the murine egg using the non-contact alternating current electric field mixing of the microdroplet. IFFS/JSRM International Meeting 2015. 4月26~29日、パシフィコ横浜(横浜)

白澤弘光, 熊谷仁, 熊澤由紀代, 佐藤亘, 富樫嘉津恵, 佐藤恵美子, 椋嶋克哉, 館山奈江, 寺田幸弘(2014) 電界攪拌技術を応用した、マウス・ヒト卵子紡錘体に対する蛍光免疫染色の試み. 第55回日本卵子学会, 5月17~18日、神戸国際会議場(神戸)

白澤弘光, 熊谷仁, 富樫嘉津恵, 佐藤亘, 佐藤敏治, 熊澤由紀代, 井原基公, 宇都宮裕貴, 八重樫伸生, 寺田幸弘(2014) 非卵巣刺激周期に手術を施行した子宮体癌患者 15 症例における、摘出卵巣由来の未成熟卵子に対する IVM 結果の検討. 第59回日本生殖医学会. 12月4~5日、京王プラザホテル(東京)

[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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

白澤弘光 (Shirasawa Hiromitsu)

秋田大学・医学部・医員

研究者番号: 60598019