

- (47) Kumasako Y., Goto K., Koike M., Utsunomiya T., Araki Y., Abe H. (2011) Respiration activity of a single blastocyst: the relationship between pre-freezing and post-thawing. The 8th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong, May 27-29, 2011)
- (48) 阿部靖之、高倉啓、海藤康平、小川拓、横尾正樹、阿部宏之 (2011) ウシGV期卵胞卵子におけるガラス化保存が細胞骨格へ与える影響、第52回日本哺乳動物卵子学会 (栃木県大田原市、国際医療福祉大学本校、2011年5月21-22日)
- (49) 長畑仁美、大江将司、栢本亮太、阿部靖之、黒谷玲子、阿部宏之 (2011) リアルタイム培養細胞観察システムを用いた異なる遺伝的背景をもつマウス胚の発生解析、第52回日本哺乳動物卵子学会 (栃木県大田原市、国際医療福祉大学本校、2011年5月21-22日)
- (50) 山中昌哉、橋本周、天羽杏実、伊藤隆広、阿部宏之、森本義晴 (2011) 呼吸量測定による凍結融解胚盤胞の品質評価、第52回日本哺乳動物卵子学会 (栃木県大田原市、国際医療福祉大学本校、2011年5月21-22日)
- (51) 坂上信忠、山本禎、西田浩司、秋山清、三宅美夏、阿部宏之、星宏良、鈴木千恵、吉岡耕治 (2011) ブタ体内発育胚の呼吸量とその後の発育能、第52回日本哺乳動物卵子学会 (栃木県大田原市、国際医療福祉大学本校、2011年5月21-22日)
- (52) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2011) 凍結施行前と融解後における胚盤胞の呼吸量変化の比較検討、第52回日本哺乳動物卵子学会 (栃木県大田原市、国際医療福祉大学本校、2011年5月21-22日)
- (53) 海藤康平、高倉啓、阿部靖之、阿部宏之 (2011) 個別培養システムを用いたウシ胚呼吸能解析、第52回日本哺乳動物卵子学会 (栃木県大田原市、国際医療福祉大学本校、2011年5月21-22日)
- (54) 近澤奈々、浜谷敏生、山田満稔、阿久津英憲、奥村典子、小川誠司、菅原かな、井上治、福永朝子、久慈直昭、吉村泰典 (2011) 着床前期および未分化維持に関わる新規 C2H2-zinc finger 遺伝子の解析、第52回日本哺乳動物卵子学会 (栃木県大田原市、国際医療福祉大学本校、2011年5月21-22日)
- (55) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2011) 凍結施行前と融解後における胚盤胞の呼吸量変化の比較検討、第68回日本生殖医学会九州支部会 (福岡市、エルガーラホール、2011年4月24日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 (出願)

なし

Ⅱ 分担研究報告

超高感度マイクロ電極の開発に関する研究

研究分担者 末永 智一 東北大学大学院環境科学研究科

研究要旨

本研究では、超微細加工技術を応用し、単一細胞呼吸計測可能な超高感度マイクロ電極を開発する。昨年度までに電極固定型デバイスを開発した。これにより、単一マウス受精卵呼吸計測の効率化に成功した。今年度は、一昨年度に明らかとした電極走査方式探針のサイズ許容範囲を踏まえ、探針の高機能化を検討した。昨年度にひきつづき、電極固定型デバイスの開発と細胞塊呼吸活性測定の見直しも行った。

A. 研究目的

哺乳動物の体外受精・体外培養技術は、バイオテクノロジーのなかでも大きな柱となる領域であり、ヒト不妊治療や家畜の生産、クローン動物やトランスジェニック動物の作出など波及効果も大きい。我々は、哺乳動物（ウシ、マウスなど）初期胚の酸素消費（呼吸）を、マイクロ電極を用いて計測する手法を開発してきた。

本研究では、参照極一体型電極における探針サイズの最適化および探針の多チャンネル化を研究した。

B. 研究方法

参照極一体型リング-ディスク電極探針の作製：

Pt線を電解エッチングにより細線化後低融点ガラスに封入しPtディスク電極を作製した。さらにガラス表面にPtスパッタリングによりPtリング電極を積層した。ガラスシール部の厚さを調製して様々な[リング電極半径]/[ディスク電極半径]比 ($=b/a$) で探針を作製した(図1)。

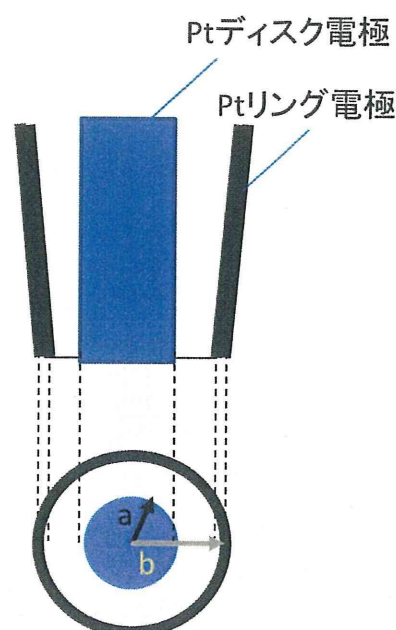


図1 参照極一体型リング-ディスク電極探針。

carbon nano-probe (DBCNP)を作製した(図2)。炭素を析出しないチャンネルには電解液を充填し、Ag/AgClを挿入してイオン電流を観測した。

電極固定型デバイスによる細胞塊の呼吸測定：：

昨年度作製した電極固定型デバイスは石英ガラス状にPt微小で電極を集積化し、SiO₂絶縁膜を積層した作製した(Y. Date et al. *Biosens. Bioelectron.* 2011) (図3)。これに対し今年度は高分子樹脂内

2チャンネル炭素ナノプローブ(DBCNP)の作製：

シート(θ)型ガラスキャピラリーに熱を加え引き伸ばし、2チャンネルのピペット探針を作製した。探針後方から任意の流路にブタンガスを導入し加熱するとガラス内壁に炭素が析出する。内側からリードをとり半径10 nm~5μmのdouble barrel

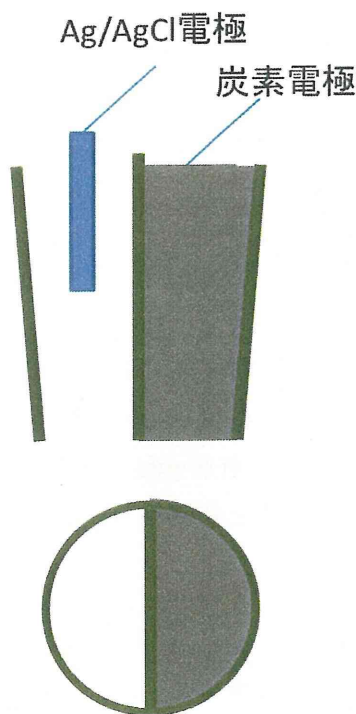


図2 Double barrel carbon nano-probe (DBCNP).

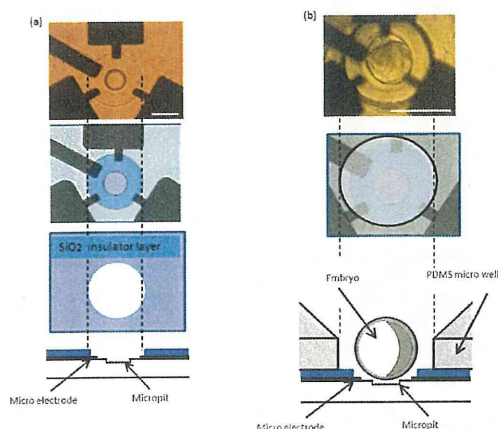


図3 電極固定型デバイス (Y. Date et al. *Biosens. Bioelectron.* 2011)。石英基板上に作製したタイプ。

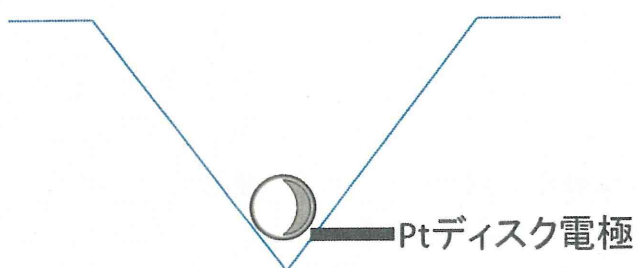


図4 電極固定型デバイス。高分子樹脂に切削した逆円錐ウェル中に Pt 線が埋め込まれたタイプ。

部に逆円錐ウェルを掘削し、Pt 線を埋め込んだタイプの電極固定型デバイスを使用した (図4)。このデバイスにヒト乳癌スフェロイドを落とし込み、電流値の変化から呼吸量を見積もった。さらに同じスフェロイドサンプルを受精卵呼吸測定装置 HV405 に移して再度呼吸計測を行い、2つの測定法間の相関を調査した。

C. 研究結果

参照極一体型リング-ディスク電極探針の評価:

4.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の定常酸化電流値からディスク電極のサイズを評価した。探針作製工程のリング電極積層前後で酸化電流値を比較し、リング-ディスク電極間でレドックスサイクルが誘起されるかどうか確認した。b/a 比が 3.5~6.6 の範囲でレドックスサイクルは観測されなかった。即ち両電極はガラスシール部により充分隔離されていることが分かった。b/a 比が 2.96 以下の場合にレドックスサイクルが観測され、両電極間での干渉が示唆された。以下では、b/a 比 3.5 以上の探針を用いて実験を行った。

まず、Pt リング電極を参照極として Pt ディスク電極の酸素還元電流のボルタモグラムを観測した。pH 7.5 の緩衝溶液および受精卵培地に準ずる測定溶液 (ERAM2, 機能性ペプチド研究所) 中では、Pt リング電極のレストポテンシャルは +0.2V vs Ag/AgCl であった。即ち電位 -0.7 V vs. Pt リング電極にて酸素還元電流が観測可能であることがわかった。

マウス胚様体の呼吸測定:

実際にマウス ES 細胞から作成した胚様体 (Embryoid body) の呼吸測定を実施した。逆円錐型ウェルにさまざまな大きさ、様々な培養日数のマウス胚様体を静置し、サンプル近傍の酸素濃度勾配を参照極一体型 Pt リング-Pt ディスク電極探針で測定した。一方同じサンプルに対し、Ag/AgCl 電極を逆円錐型ウェルに挿入し従来型の探針である Pt ディスク電極で電位 -0.5 V vs. Ag/AgCl で酸素還元電流を観測して同様に呼吸測

定を行った。2つの測定結果を各胚様体サンプルについてプロットしたところ決定係数 R^2 は 0.93 であった。したがって、参照極一体型 Pt リング - ディスク電極探針により、マウス胚様体の呼吸を正確に測定できることが示された。

マウス胚様体のアルカリホスファターゼ測定:

つぎに、マウス胚様体のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を評価した。酵素基質である p-アミノフェニルリン酸を 1.0 mM 含む測定溶液中 (pH 9.5) にマウス胚様体を静置すると、サンプルの ALP 活性に応じて p-アミノフェノールが生成する。参照極一体型 Pt リング - ディスク電極探針を用い、電位 +0.3 V vs. Pt リング電極にて p-アミノフェノールの酸化電流を観測した。(測定溶液中 (pH 9.5) にて Pt リング電極のレストポテンシャルは 0 V vs Ag/AgCl であった)。同じサンプルに対し、Ag/AgCl 電極を逆円錐型ウェルに挿入し従来型の探針である Pt ディスク電極で電位 +0.3 V vs. Ag/AgCl で p-アミノフェノールの酸化電流を観測して同様に ALP 活性測定を行った。2つの測定結果を各胚様体サンプルについてプロットしたところ決定係数 R^2 は 0.58 であった。したがって、呼吸活性と比べればやや精度が低下するものの、参照極一体型 Pt リング - ディスク電極探針により、マウス胚様体の ALP 活性を測定できることが示された。

2チャンネル炭素ナノプローブ (DBCNP) の評価:

Double barrel carbon nano-probe (DBCNP) の 2 チャンネルのうち、炭素を析出しないチャンネルには電解液を充填し、Ag/AgCl を挿入してイオン電流を観測した。イオン電流をフィードバック信号として探針 - 基板間距離を制御することにより、ヒト扁平上皮細胞 (A431)、ラット副腎髄質クロム親和性細胞種 (PC12) の生細胞イメージングに成功した (Y. Takahashi et al. *Angew Chem Int Ed* 2011)。炭素電極側のチャンネルでは神経伝達物質の電気化学的検出に成功した。上記、生細胞形状イメー

ジングおよび電気化学検出に用いられる探針は先端径 100 nm 以下のものを使用する。先端径 $\sim 5\mu\text{m}$ の探針を用いて細胞を電場破碎し、細胞質を回収し、さらに細胞質中に含まれる mRNA を 1 細胞レベルで定量解析することにも成功した。

電極固定型デバイスによる細胞塊の呼吸測定::

電極固定型デバイスにより、ヒト乳癌細胞スフェロイドの呼吸を測定し、同じスフェロイドサンプルを受精卵呼吸測定装置 HV405 に移して再度呼吸計測を行った。2つの測定法間の相関を調査したところ、決定係数 R^2 は 0.79 であった。

D. 考察

今年度は、探針の高機能化と電極固定型デバイスの開発および細胞塊呼吸活性測定への応用を検討した。参照極一体型リング - リング電極探針により、比較的スペースの限られた測定系に探針 1 本を測定溶液に挿入するだけで受精卵や細胞塊の呼吸測定が可能となった。銀塩化銀電極を挿入するスペースの確保が不要になったのみならず、銀や塩化物イオンの溶出による細胞サンプルへの悪影響のリスクを排除することに成功した。pH など測定条件に注意しながら測定電位を適切に設定することが出来れば、酸素濃度以外にも幅広く電気化学測定を展開できる。可能性がある。具体的に、アルカリ溶液中での酵素活性評価を実施した。

DBCNPにより、生細胞イメージング、局所電気化学測定、mRNAの定量解析が可能となった。ブタンガスの導入路を変えることにより炭素 2 電極型と炭素 1 電極 - ガラスキャピラリー型の 2 種類の探針を作製することができる。細胞の電場破碎、mRNAの定量解析は炭素 2 電極型DBCNP探針を使用した。

探針固定型デバイスにより、探針電極の走査工程や煩雑な電極位置 - サンプル位置の微調整が不要となりかつ測定精度もHV405と同程度になる可能性が示唆された。しかしながら、マウス受精卵では乳癌細胞スフェロイドと比べて実際に計測している酸素濃度差は 10 分の 1 以下であり、さ

らなる測定系の高精度化が必要であると考えられる。

昨年度開発した石英基板上のデバイス(図3)は酸素濃度計測用のPt作用電極3チャンネルに加え、対極のPt電極が集積化されている。今年度の成果を総合的に判断して、この対極を疑似参照電極として選択、銀および塩化物イオンフリーのマウス受精卵呼吸計測が実施できる可能性は極めて高い。

E. 結論

探針の高機能化と電極固定型デバイスの開発の両面から、簡便で安全性の高い受精卵呼吸測定システムが開発できたと結論できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- K. Nagamine, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue*. Influence of tip size on single yeast cell imaging with scanning electrochemical microscopy. *Electroanalysis*, 23, 1168-1174 (2011).
 - Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Zhang, E. Neil, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, A. Pollard, D. Roy, C. A. Clifford, H. Shiku, T. Matsue, D. Klenerman, and Y. E. Korchev, Fabrication of the Double-Barrel Carbon SECM-SICM Nanoprobe for Simultaneous Nanoscale Electrochemical and Topographical Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 9638-9642 (2011).
 - K. Ino, W. Saito, M. Koide, T. Umemura, H. Shiku, T. Matsue, Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection. *Lab Chip*, 11, 385-388 (2011).
 - Y. Date, S. Takano, H. Shiku, K. Ino, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, T. Matsue, Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice. *Biosens. Bioelectron.* 30, 100-106 (2011).
 - M. Takeda, H. Shiku, K. Ino, T. Matsue, Electrochemical chip integrating scalable ring-ring electrode array to detect secreted alkaline phosphatase. *Analyst*, 136 (23), 4991 - 4996 (2011).
 - Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku,* K. Ino, T. Yasukawa, R. Asano, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical Detection of Receptor-Mediated Endocytosis by Scanning Electrochemical Microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 16569-16573 (2011).
 - X. Zhu, K. Ino, Z. Lin, H. Shiku, G. Chen, T. Matsue, Amperometric detection of DNA Hybridization using a multi-point, addressable electrochemical device. *Sens. Actuators B*, 160 (1), 923-928 (2011).
2. 学会発表
- H. Shiku, J. Suzuki, K. Ino, T. Matsue, Electrochemical Gene Expression Analysis on Single-Cell Array Devices, *ISE Conference Management of the 62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Niigata, Toki-Messe*, September 15, 2011.
 - H. Shiku, K. Ino, T. Matsue, Electrical cell lysis technique to collect mRNA from single-cells, *the 220th ECS Meeting & Electrochemical Energy Summit in Boston, Massachusetts*, October 9-14, 2011.
 - H. Shiku, G. Saito, Y. Zhou, Y. Horiguchi, R. Takano, K. Ino, T. Matsue. mRNA analysis of multicellular spheroid with a scanning probe microscopy system, *Proceeding of The 7th International Forum On Post-Genome Technologies and China-Japan-Korea Joint Symposium on Natural Products" (7IFPT-CJK)*, pp. 343-344. Chongqing, China, October 28-29, 2011.
 - 珠玖 仁, マウス胚様体の遺伝子発現と代謝活性の階層的評価. 第21回日本MRS学術シンポジウム, Yokohama, Dec. 19, 2011.
 - 珠玖 仁、新井 俊陽、周 縁殊、西條 拓、堀口 佳子、伊野 浩介、末永 智一. マウスES細胞分化過程における呼吸活性と網羅的遺伝子解析の照合. 電気化学会第79回大会.アクトシティ浜松.2012年3月29日

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

ヒト胚・卵子の評価

分担研究者 吉野 修 東京大学産科婦人科教室 助教

研究要旨

卵胞発育のメカニズムを解明することが、正確な卵巣機能評価法の開発に有用である。

卵巣から分泌される因子を測定することが卵巣の機能評価に繋がることから、卵巣に存在するサイトカインのうち、特に anti mullerian hormone (AMH)の血中濃度がよい指標になることが示唆された。

A. 研究目的

女性の社会進出が進んでいる現代では女性の晩婚化が進んでおり、それに伴い卵巣機能低下に起因した不妊症患者が増えている。不妊治療を進める上で、正確な卵巣機能評価はその後の治療方針の決定に大切である。なかでも卵胞発育は、卵の数と質を決める主要な因子である。このため、ヒトにおける卵胞発育のメカニズムを解明することが、より高度かつ有効な生殖医療に求められ、また不妊症のスクリーニングへの応用が可能になると思われる。

卵胞発育は脳下垂体より分泌される卵胞刺激ホルモン FSH により調節を受けていることから、卵巣顆粒膜細胞における FSH 受容体の発現誘導のメカニズムを知ることは大変意義がある。近年、TGF- β スーパーファミリーメンバーに属するサイトカイン Bone Morphogenetic Protein (BMP) ファミリーが卵胞発育に重要な役割を担っていることが知られており、BMP-15 や類似蛋白である Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9)の遺伝子異常はヒトを含めた種々の動物において早発卵巣不全 (POF) の原因となることが報告されている (Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Elickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 2004; 25 (1):72-101)。BMP リガンドの卵巣での発現は、前述の BMP-15

や GDF-9 以外に BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 が現在までに報告されているが、主にラットおよびヒツジを用いた検討が多く、ヒト検体を用いたものは殆どない。本研究を通して、我々はヒト卵巣における BMP-2, 6, 7 の発現が良好な卵胞発育に重要であることを示してきた。今回、これら BMP を含めた卵巣に存在するサイトカインの不妊症患者血清の発現について検討を行った。

B. 研究方法

患者の同意のもと、検体を採取し以下の実験を行った。

実験 1) ヒト培養顆粒膜細胞同培養系における FSH 受容体の発現調節因子に関する検討
BMP-2, 6, 7 15 および AMH は卵巣に存在する TGF- β スーパーファミリーサイトカインである。体外受精時に得られるヒト卵巣顆粒膜細胞を培養し、同培養系に BMP-2, 6, 7 15, アクチビン-A, GDF-9 を 24 時間添加し、FSH 受容体 mRNA 発現を定量的 PCR にて検討を行った

実験 2) ヒト培養顆粒膜細胞同培養系における AMH mRNA の発現調節因子に関する検討
体外受精時に得られるヒト卵巣顆粒膜細胞を培養し、同培養系に BMP-2, 6, 7 15, アクチビン-A, GDF-9 を 24 時間添加し、AMH mRNA 発現を定

量的 PCR にて検討を行った。また、刺激した顆粒膜細胞の培養上清中の AMH 濃度を EIA にて測定した。

実験 3) 不妊症患者血清中の BMP-2, 6, 7, 15 および anti mullerian hormone (AMH) 濃度に関する検討

不妊症患者血清中 (25 名) におけるこれらサイトカイン濃度に関して ELISA (BMP-2, 6, 7), EIA (AMH) およびウェスタンブロット法 (BMP-15) を用いて検討を行った。

C. 研究結果

実験 1. ヒト培養顆粒膜細胞同培養系における FSH 受容体の発現調節因子に関する検討

ヒト顆粒膜細胞における FSH 受容体 mRNA を誘導する因子を検討したところ、BMP-2, -6, -7, -15, アクチビン-A および GDF-9 刺激により、FSH 受容体 mRNA 誘導作用をしめした。(図 1)

実験 2. ヒト培養顆粒膜細胞同培養系における AMH mRNA の発現調節因子に関する検討

ヒト顆粒膜細胞における AMH mRNA を誘導する因子を検討したところ、BMP-2, -6, -7, -15 の順で AMH mRNA 発現を誘導した。アクチビン-A および GDF-9 は AMH mRNA 誘導作用を有していなかった。また、上清中の AMH 濃度においても BMP サイトカインにより誘導された。(図 2 a,b)

実験 3. 不妊症患者血清中の BMP-2, 6, 7, 15 および AMH 濃度に関する検討

表 1 に結果を示す。BMP-2, -6, -7 の ELISA キットの感度はそれぞれ 10 pg/ml, 80 pg/ml, 10 pg/ml であるが血清 25 検体中、陽性症例数はそれぞれ 8, 3, 12 例であった。一方で AMH の感度は 2 pmol/l であるが、陽性症例は 24 例であった。(表 1) BMP-15 はウェスタンブロット法にて検討を行ったが、血清中 BMP-15 は感度以下であった。

D. 考察

これまで、我々は卵巣に存在する TGF- β スーパーファミリーサイトカインに属する BMP-2, 6, 7 がヒト卵巣機能に重要な作用を示すことを示してきた。(J. Shi, O.Yoshino et al. Fertil & Steril 2009, 2010, Am J Reprod Immunol 2011) また、BMP-6 が TGF- β スーパーファミリーサイトカインに属する AMH を誘導することも示してきた (J. Shi, O.Yoshino et al. Fertil & Steril 2010)。今回、BMP サイトカインおよび GDF-9, アクチビンは卵巣発育に重要な FSH 受容体の顆粒膜細胞での発現を誘導することを認めた。また、このうち、BMP サイトカインが AMH の mRNA および蛋白レベルでの発現を誘導した。これまで実地臨床で多く用いられている卵巣機能評価法として、脳下垂体から分泌される FSH の血中濃度を測定しているが、同物質は卵巣から直接分泌される因子でないため、正確に卵巣機能を評価できないことが知られている。今回、BMP サイトカインおよび AMH の血清中濃度について不妊症患者を対象に測定した。BMP-2, 6, 7, 15 は血清中での陽性率は症例の半分以下であった。一方で AMH は不妊症症例の殆どで測定が可能であった。

AMH は女性において顆粒膜細胞にのみ発現することから、卵巣機能の正確な評価法に成り得ると考えられる。また、今回の検討で、AMH は BMP サイトカイン下流に存在することが明らかとなった。これまで我々は卵巣に存在する複数の BMP サイトカインそれぞれが卵巣機能に重要な作用を示すことを発表してきたが、BMP サイトカインは局所因子であり、血清中での評価には適さないことが判明した。しかし、BMP サイトカインの下流に AMH が存在することから、血中 AMH を測定することで、複数の BMP サイトカインの総合的な影響を評価することができると判明した。今後は、卵巣機能評価には主に AMH を測定することが重要であると思われる。

結論

BMP サイトカインファミリーが、卵胞発育に重要な役割を担っていることが知られてきているが、実地臨床において卵巣機能評価法としては、BMP サイトカインの下流に位置する AMH の血中濃度を測定することが妥当だと思われる。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

<論文>

- 1: Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Akiyama I, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T, Taketani Y. Growth differentiation factor 3 is induced by bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) and BMP-7 and increases luteinizing hormone receptor messenger RNA expression in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2012 in press.
- 2: Osuga Y, Hirota Y, Yoshino O, Hirata T, Koga K, Taketani Y. Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4:755-67.
- 3: Yoshino O, Nishii O, Osuga Y, Asada H, Okuda S, Orisaka M, Hori M, Fujiwara T, Hayashi T. Myomectomy decreases abnormal uterine peristalsis and increases pregnancy rate. *J Minim Invasive Gynecol*. 2012 Jan-Feb;19(1):63-7.
- 4: Wang B, Koga K, Osuga Y, Cardenas I, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Mor G, Taketani Y. Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts. *Endocrinology*. 2011 Dec;152(12):4984-92.
- 5: Yoshino O, Izumi G, Shi J, Osuga Y, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Nishii O, Koga K, Taketani Y. Activin-A is induced by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma. *Fertil Steril*. 2011 Jul;96(1):118-21.
- 6: Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Saito A, Hasegawa A, Koga K, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Taketani Y. Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis. *Fertil Steril*. 2011 Jul;96(1):113-7.
- 7: Saito A, Osuga Y, Yoshino O, Takamura M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Harada M, Takamura Y, Yano T, Taketani Y. TGF- β 1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. *Hum Reprod*. 2011 Jul;26(7):1892-8.
- 8: Yoshino O, Hori M, Osuga Y, Hayashi T, Sadoshima Y, Tsuchiya H, Nishii O, Taketani Y. Myomectomy reduces endometrial T2 relaxation times. *Fertil Steril*. 2011 Jun 30;95(8):2781-3.
- 9: Wang B, Koga K, Osuga Y, Hirata T, Saito A, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takamura Y, Fujii T, Taketani Y. High mobility group box 1 (HMGB1) levels in the placenta and in serum in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Aug;66(2):143-8.

10: Harada M, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Takemura Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y. Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study. *Gynecol Endocrinol.* 2011 Sep;27(9):717-20.

子宮筋腫により誘導される子宮内膜の異常蠕動様運動は妊娠率を低下させる

吉野修、西井修、折坂誠、浅田弘法、藤原敏博、小辻文和、吉村泰典、大須賀穰、武谷雄二
産婦人科の実際(0558-4728)60 巻 10 号

<学会発表>

子宮筋腫核出術は子宮内膜の T2 値を低下させる
吉野修、大須賀穰、佐渡島陽子、土屋裕子、西井修、武谷雄二 第 56 回日本生殖医学会総会

子宮内膜症の成因に関する基礎的研究 子宮内膜症におけるアクチビン A の発現調節と機能に関する検討
吉野修(東京大学 医学部産科婦人科学教室)、泉玄太郎、施佳、大須賀穰、浦田陽子、高村将司、甲賀かをり、西井修、武谷雄二
日本エンドメトリーオーシス学会

吉野 修、浅田弘法、折坂 誠、大須賀穰、土屋裕子、佐渡島陽子、古谷正敬、小辻文和、吉村泰典、西井 修、武谷雄二
筋層内子宮筋腫 (intramural myoma:IM) により誘導される子宮内膜の異常蠕動は妊娠率を低下させる。第 63 回 日本産婦人科学会総会

原田美由紀、大須賀穰、泉玄太郎、高村将司、竹村由里、平田哲也、吉野 修、甲賀かをり、矢野 哲、武谷雄二

直腸・膀胱子宮内膜症治療におけるジエノゲストの有用性の検討 第 63 回 日本産婦人科学会総会

・泉玄太郎、甲賀かをり、大須賀穰、永井美和子、浦田陽子、高村将司、齋藤亜子、竹村由里、原田美由紀、吉野 修、矢野 哲、武谷雄二
周期的伸展刺激が子宮内膜間質細胞に与える影響 第 63 回 日本産婦人科学会総会

・高村将司、大須賀穰、泉玄太郎、齋藤亜子、長谷川亜希子、竹村由里、原田美由紀、平田哲也、広田 泰、吉野 修、甲賀かをり、武谷雄二
子宮内膜症進展における IL-17, GRO (Growth Related Oncogene) α を介した vicious cycle の形成 第 63 回 日本産婦人科学会総会

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

图 1

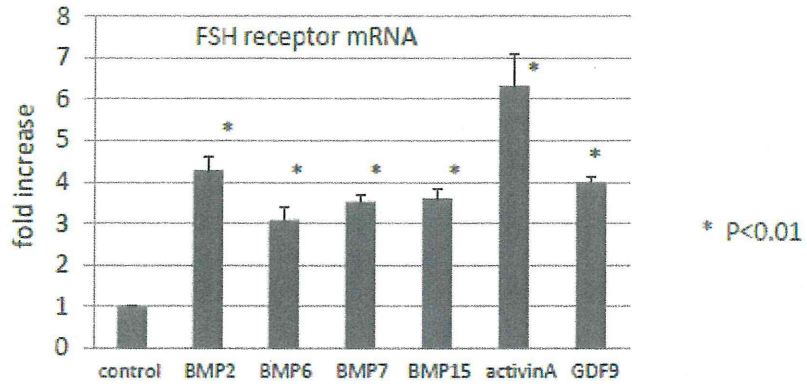


图 2 a

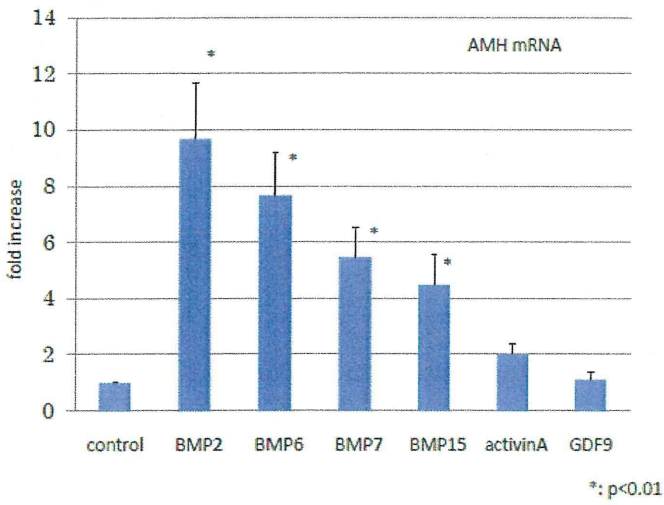


图 2 b

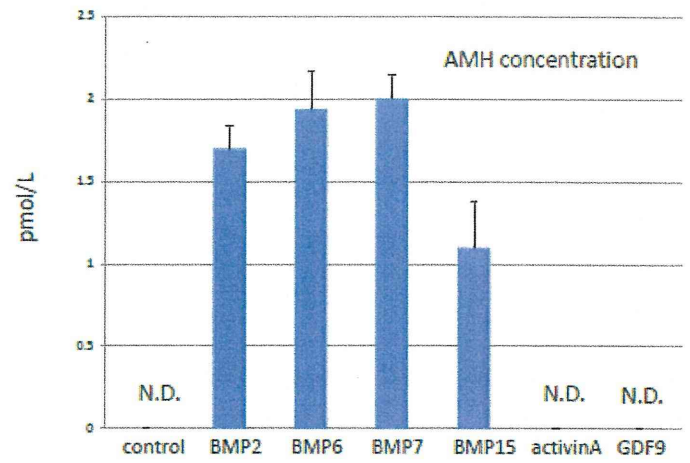


表 1

	cut off	total	negative	positive
BMP-2	10 pg/ml	25	17	8
BMP-6	80 pg/ml	25	22	3
BMP-7	10 pg/ml	25	13	12
AMH	17 pg/ml	25	1	24

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

体外受精胚の培養

分担研究者： 藤本 晃久（東京大学産科婦人科教室 助教）

研究要旨

卵胞発育のメカニズムを解明することが、正確な卵巣機能評価法の開発に有用である。今年度は、卵巣に発現する BMP (bone morphogenetic protein) サイトカインに着目し、その発現および卵胞発育における作用についての検討を行った。BMP サイトカインにより誘導される GDF-3 は BMP の作用を抑制することがわかり、BMP サイトカインのネガティブフィードバックシステムの存在が明らかになった。

A. 研究目的

BMP(bone morphogenetic protein)システムの卵巣における発現、機能が報告されて以来、同システムが卵巣における卵胞発育から排卵までの種々の現象に寄与していることが明らかとなってきた。特に BMP ファミリーのうち卵子に特異的に発現する Growth differentiation factor-9(GDF-9)およびその類似蛋白である BMP-15(GDF-9B)が種々の動物種において初期卵胞発育不全に起因する卵巣機能不全を引き起こすことが知られてきており、ヒトにおいても GDF-9 および BMP-15 遺伝子異常が早発閉経症例 (premature ovarian failure, POF)に認められたとの報告が相次いでいる。GDF-9 および BMP-15 以外として、BMP リガンドの卵巣での発現は現在までに BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 の発現が報告されている。BMP がどのようにその機能調整を行っているかについて殆ど分かっていない。今回、BMP family サイトカインメンバーであり、BMP の阻害作用を有する GDF-3 に注目して検討を行った。

B. 研究方法

患者の同意のもと、検体を採取し以下の実験を行った。

実験 1) GDF-3 の卵巣における局在
子宮頸癌手術患者の卵巣切片を用いて、BMP-6, -7 の発現を免疫染色法にて検討した。

実験 2) 体外受精の採卵時に得られたヒト顆粒膜細胞培養系にリコンビナント BMP-6, -7 を添加培養し、6 h 後の GDF-3 mRNA の発現を定量的 PCR 法にて検討した。

実験 3)
同培養系に GDF-3 や BMP-7 を添加し 24 時間後の LH 受容体 mRNA level を定量的 PCR 法にて検討した。

C. 研究結果

実験 1. GDF-3 の発現に関する検討
ヒト正常卵巣を用い、GDF-3 発現の検討を行った。GDF-3 は卵巣を構成する成分のうち、主に顆粒膜細胞に発現を認めた。GDF-3 は初期卵胞には発現が殆ど見られなかったが、三次卵胞の顆粒膜細胞にて発現を認めた。

実験 2. ヒト顆粒膜細胞において BMP-6 や

BMP-7 刺激により、GDF-3 mRNA の発現が亢進することを認めた (図 2)

実験 3. GDF-3 の機能に関する検討

これまで BMP が顆粒膜細胞における LH 受容体の発現を抑制することが知られている。GDF-3 は顆粒膜細胞における LH 受容体 mRNA を誘導すること、また BMP-7 による LH 受容体抑制作用をブロックすることを認めた (図 3)。

D. 考察

卵胞の発育のために、卵胞はある程度その黄体化が抑制されている。もし黄体化が抑制されなければ、卵胞は早期に過熟・排卵してしまう。我々は BMP-6,-7 のヒト卵巣での機能解析から (J. Shi, O. Yoshino et al. Fertil & Steril 2009, 2010) BMP サイトカインが LH 受容体の発現を抑制する黄体化抑制因子としての作用を有することを明らかにしてきた。すなわち、BMP サイトカインは LH 受容体の発現を抑制することで、卵胞発育に寄与している。しかし、卵胞は排卵前には LH 受容体を誘導し、排卵刺激 (LH サージ) に対応しなくてはならない。

今回の検討で、ヒト卵巣生理において BMP-6 や BMP-7 は BMP の阻害物質として作用することが知られている GDF-3 を誘導すること、また GDF-3 は LH 受容体を誘導する点で、BMP サイトカインに拮抗することが明らかとなった。

BMP サイトカインファミリーが、卵胞発育に重要な役割を担っていることが知られてきているが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。今年度の検討により、BMP サイトカイン

の卵胞における機能に関する一端を示すことができた。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表
〈学会発表〉

腹腔鏡下子宮全摘術後に腔断端離開を起した一例 板岡奈央、原田美由紀、平池修、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 第 122 回関東連合産科婦人科学会 2011.6.12 東京

Endometrial thickness is associated with outcome of ART after hormonal therapy for atypical endometrial hyperplasia or endometrial carcinoma Fujimoto, A., Osuga, Y., Ichinose, M., Oishi, H., Harada, M., Koizumi, M., Takemura, Y., Yano, T., Taketani, Y. 27th ESHRE Annual Meeting 2011.7.1-4 Stockholm, Sweden

SILS ポートを用いた単孔式腹腔鏡下手術は術後疼痛を軽減できる 中江華子、藤本晃久、長坂貴顕、原田美由紀、甲賀かをり、平池修、矢野哲、武谷雄二 第 51 回日本産科婦人科内視鏡学会 2011.8.4-6 大阪

腹腔鏡下子宮摘出をした非産褥期子宮内反の一例 平池修、藤本晃久、斎藤泉、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 第 51 回日本産科婦人科内視鏡学会 2011.8.4-6 大阪

当院における筋腫分娩症例の臨床検討 中江華子、廣井久彦、藤本晃久、大須賀穰、百

枝幹雄、藤井知行、矢野哲、上妻志郎、武谷雄二 第 63 回日本産科婦人科学会
2011.8.29-31 大阪

卵巣成熟嚢胞性奇形腫の再発に関する検討
藤本麻葉、原田美由紀、平池修、藤本晃久、
大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 第 122 回関東
連合産科婦人科学会 2011.10.30 横浜

当科における過去 10 年間の子宮筋腫核出後
の妊娠・再発についての検討 鮫島大輝、中
江華子、平池修、藤本晃久、大須賀穰、矢野
哲、武谷雄二 第 122 回関東連合産科婦人
科学会 2011.10.30 横浜

子宮動脈近傍の広間膜後葉に着床していた
と考えられた腹膜妊娠の一例 斎藤泉、平池
修、保谷菜里、甲賀かをり、藤本晃久、大須
賀穰、久具宏司、矢野哲、武谷雄二 第 122
回関東連合産科婦人科学会 2011.10.30
横浜

早期発症型卵巣過剰刺激症候群に対する
cabergoline(カバサル)の使用経験 原田美
由紀、櫻橋彩子、藤本晃久、大須賀穰、矢野
哲、武谷雄二 第 56 回日本生殖医学会
2011.12. 8-9 横浜

藤本晃久 第 2 回日本婦人科ロボット手術研
究会 シンポジウム「ロボット支援下手術—
導入と展望—」当科におけるロボット支援下
子宮全摘術の導入経験 2012.3.24 東京医
科大学

<論文発表>

Isono W, Wada-Hiraike O, Shirane A,
Fujimoto A, Osuga Y, Yano T, Taketani Y

Alternative strategies to in vitro
fertilization/intracytoplasmic sperm
injection treatment for aged infertile
women Reproductive Medicine and
Biology, 11(1):69-72,
2012

Tsutsumi R, Fujimoto A, Osuga Y,
Harada M, Takemura Y, Koizumi M,
Yano T, Taketani Y. Successful
pregnancy following low-dose hCG
administration in addition to hMG in a
patient with hypothalamic amenorrhea
due to weight loss Gynecol Endocrinol
2011 Nov 21 (Epub ahead of print)

子宮筋腫合併不妊を妊娠に導くには 藤本
晃久 産科と婦人科 vol.79 no.3
295-299, 2012

原因不明ならびに卵管因子不妊症例に対す
る腹腔鏡検査・治療の意義 小泉美奈子、廣
井久彦、大須賀穰、藤本晃久、甲賀かをり、
平池修、百枝幹雄、矢野哲、武谷雄二 日本
産科婦人科内視鏡学会雑誌 27 巻 1
号 Page296-299, 2011

高度肥満を合併した汎発性腹膜炎の 1 例 松
本玲於奈、嘉本寛江、市川麻佑子、樋口紗恵
子、後藤美希、平池修、藤本晃久、大須賀穰、
矢野哲、武谷雄二 日本産科婦人科学会東
京地方部会会誌 60 巻 1 号 Page106-110,
2011

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

图 1

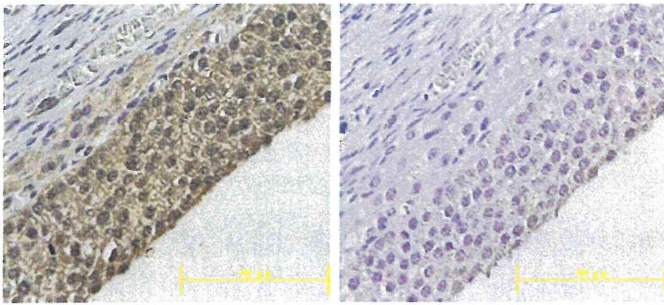


图 2

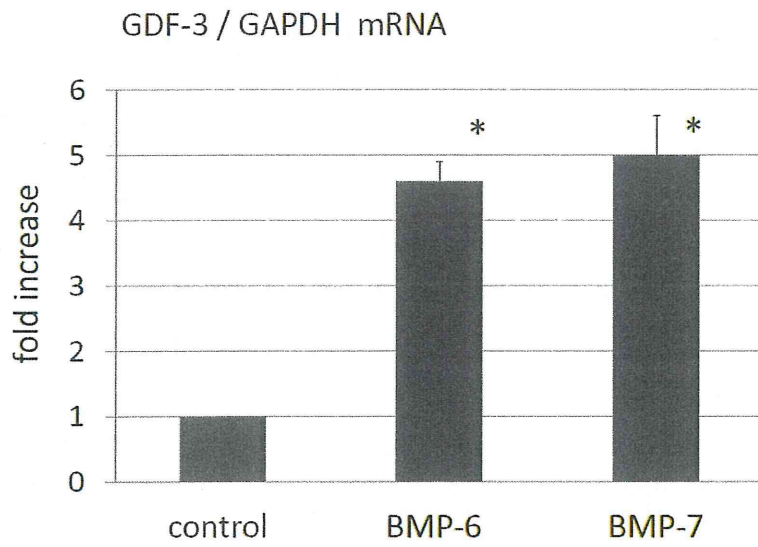
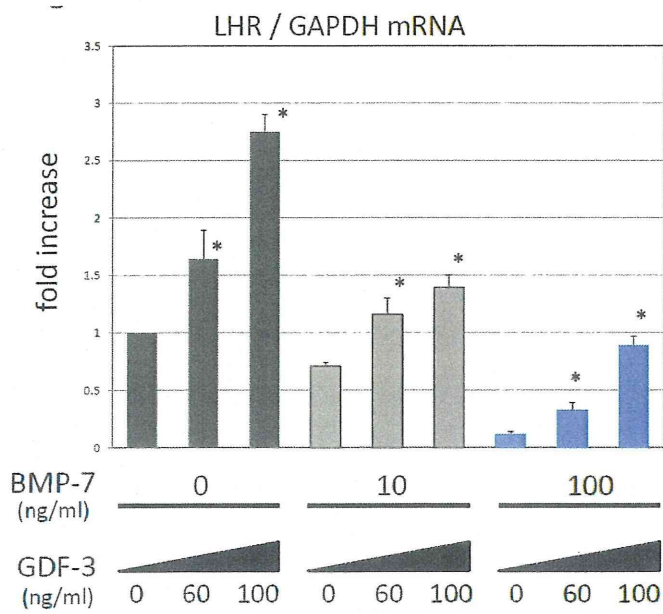


图 3



厚生労働省科学研究費補助金(医療機器開発推進研究事業)

分担研究報告書

卵子の分子生物学的解析

分担研究者 浜谷 敏生 慶應義塾大学医学部 産婦人科 専任講師

研究要旨

母体加齢および排卵後加齢はともに卵の質的(胚発生率・妊娠率の低下)に影響を与える。加齢卵における卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察したところ、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、テロメラーゼや DNA 修復機能の低下など体細胞の加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNA メチル化、クロマチン二次構造の変化などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。本研究では、遺伝子発現プロファイル変化の分析で明らかとなったミトコンドリア機能の低下が実際に加齢卵の細胞呼吸能に影響を与えているか否かを、超高感度マイクロ電極を用いた電気化学的手法により検討した。その結果、排卵後加齢卵では細胞呼吸能が低下していたため、細胞呼吸能の電気化学的測定法が「卵の質」の診断に有用である可能性が示唆された。また、母体加齢の場合、卵におけるテロメラーゼの発現低下が観察されたことから、加齢卵におけるテロメラーゼ活性やテロメア長を解析したところ、いずれも低下あるいは短縮していた。しかし、排卵後加齢の場合は、卵におけるテロメラーゼの発現・活性の低下およびテロメアの短縮は認められなかった。今後は、テロメア短縮のメカニズムについても、さらに検討を加える予定である。

A. 研究目的

卵細胞は、受精能を持ち、雄性前核のリプログラミングを行い、胚性ゲノムの活性化と着床前期胚の分化全能性の賦与に関与する。クローン胚においては体細胞核をもリプログラミングする。このように、卵細胞は非常に特異な細胞である。そこで、卵・着床前期胚の遺伝子プロファイリング・データにおける発現強度および cDNA ライブラリー・データベースにおける Expression sequence tag (EST) 発現頻度を *in silico* 解析することにより、卵でのみ特異的に発現する遺伝子を抽出する。このような卵特異的遺伝子は、上述した卵の特性に大きく寄与すると考えられる。さらに、母体加齢あるいは排卵後加齢による卵の質的低下をモデルとして、遺伝子発現プロファイリング・デ

ータの変化を多元的に解析し、卵の受精後発生能に重要と考えられる卵細胞特異的遺伝子を抽出し、これらの遺伝子の機能を解析する。本研究では、卵の遺伝子発現制御機構の解明と「卵の質」に寄与する遺伝子 (quality marker) の発見を目指した。

B. 研究方法

- (1) 母体の加齢による卵の質的低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した、卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子 (quality marker) の発見を目指した。

加齢マウスと若齢マウスから得られた未受精卵を4セット(1セット500個)集め、それぞれからmRNAを抽出、*in vitro* transcription 反応によりcRNA増幅およびCy3標識し、Cy5標識されたuniversal referenceとともに、NIA 22K 60-mer oligo microarrayにおいてhybridizationに供し、着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングを行った。

- (2) 排卵後の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察し、卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子(quality marker)の発見を目指した。

以下の各々のグループについて、過排卵処理F1マウス(12週齢)にhCGを注射し、3セットの未受精卵(1セット100個)を集めた。各セットからmRNAを抽出し、*in vitro* transcription 反応により2-round RNA増幅した後、OpArray(独オペロン社製70mer-oligo DNA microarray)においてhybridizationに供し、着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングを行った。

- (i) hCG注射後14時間で採取した新鮮卵(fresh)
(ii) hCG注射後23時間で採取した加齢卵(*in vivo* aged)
(iii) hCG注射後14時間で採取し、卵丘細胞と共に*in vitro*で9時間培養した加齢卵(*in vitro* aged with cumulus cells)
(iv) hCG注射後14時間で採取し、卵丘細胞を除いて後*in vitro*で9時間培養した加齢卵(*in vitro* aged without cumulus cells)

- (3) マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング・データの*in silico*解析により、着床前期胚に特異的に発現する新規遺伝子

*Hmgpi*が発見された。この遺伝子の詳細な発現解析と機能解析を行った。

- (i) 定量的リアルタイム逆転写PCR(qPCR)、ウェスタンブロット、免疫染色
(ii) 受精卵へのsiRNA注入による*Hmgpi*発現抑制が着床前期および着床周辺期の胚発生に与える影響を検討した。

C. 研究結果・考察

- (1) 母体の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。

卵性RNAは2細胞期までにそのほとんどが分解されると考えられていたが、2細胞期以降も残存する卵性RNAが多く存在することが明らかとなった。また、Gene Ontology Organizationが遺伝子機能に関するキーワード(GO term)をそれぞれの遺伝子に割り付けているので、卵で発現する遺伝子に頻度の高いGO termを抽出した。その結果、細胞分裂に関わるGO termが多く認められ、サーカディアンリズムや接着分子といったGO termも特徴的であった。

卵の質的低下(胚発生率・妊娠率の低下)の背景を探究するため、卵の加齢変化を例に、母体加齢がマウス成熟卵の遺伝子発現プロファイリングに与える影響について検討した。卵の加齢には、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、テロメラーゼの発現・活性の低下、DNA修復機能の低下など体細胞の加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNAメチル化、クロマチン二次構造の変化、RNA修飾などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。また、それらの遺伝子の中には生殖細胞特異的に発現すると考えられる遺伝子が多く認められたため、生殖細胞に特異的な加齢機構の存在が示唆された。

卵の加齢におけるテロメア・バイオロジー

まず、高齢マウス卵におけるテロメラーゼ (*Tert*) のRNA発現の低下を、qPCRにより確認した。高齢マウスと若齢マウス卵、それぞれのマウスから別の日に集めた3つのlotよりmRNAを抽出、cDNAを合成し、qPCRを行った。qPCRの結果、高齢マウス卵における*Tert*のRNA発現は 6.0 ± 1.4 (対GAPDH)で、若齢マウス卵におけるRNA発現 11.5 ± 1.6 (対*Gapdh*)に比し、0.53倍と有意に減少していた。これは、マイクロアレイの結果(0.63倍)とほぼ同様であった。

次に、*Tert*蛋白に対するポリクローナル抗体を用いて、若齢マウス卵と高齢マウス卵におけるタンパク発現を検討した。*Tert*蛋白は、若齢・高齢いずれの卵でも細胞質全般に認められたが、特に若齢マウス卵では中心部に比べて細胞膜近傍にやや強い局在を認めた。一方、高齢マウス卵では、発現自体が著明に低下しており、また斑状に欠損するなどの不規則な発現パターンも認められた。

さらに、Telomerase PCR ELISA kit (ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いて、*in vitro*でテロメア伸長反応を行わせることにより、テロメラーゼ酵素活性を測定した。その結果、*Tert*の発現のみならず、テロメラーゼ逆転写酵素活性も加齢とともに43%にまで有意に低下していることが明らかとなった(高齢マウス卵/若齢マウス卵: $0.30 \pm 0.11/0.70 \pm 0.01$)。

テロメア長についてはqPCRおよびqFISHを用いて検討した。テロメアqPCRでは、高齢マウス卵のテロメア長(0.84 ± 0.10)は、若齢マウス卵のテロメア長(1.74 ± 0.20)に比べて0.48倍と有意に減少していた。また、quantitative telomere Fluorescent in situ hybridization (qFISH)でも高齢マウス卵でテロメアの短縮傾向が認められた。

以上の結果から、卵形成過程では卵母細胞はほとんど分裂をしないにもかかわらず、実際、加齢によりテロメア長が短くなることが明らかとなった。

テロメラーゼ欠損マウスから排卵された卵細胞の

テロメア長も、wild typeのそれよりも短いことが報告されているため(Liu et al., Nat Cell Biol. 2007)、加齢によるテロメラーゼの発現および活性の低下がテロメア長の短縮に寄与していると考えられる。高齢マウスでは、排卵に至るまでのintervalが長くなり、加齢によって卵におけるテロメラーゼ活性が落ち、酸化ストレスの蓄積も加わり、テロメア長が維持できずに短縮してしまうと考えられた。さらに最近では、着床前期胚発生におけるテロメア長の短縮がフラグメンテーションの増加と相関すると報告されており(Keefe et al., Am J Obstet Gynecol. 2005)、加齢によるテロメラーゼの発現および活性の低下が着床前期胚発生を障害する可能性が考えられた。

一方、排卵後加齢卵についても、同様の実験を行った。排卵後加齢卵は、新鮮卵に比較してテロメラーゼの発現・活性およびテロメア長に有意な変化は認められなかった。

(2) 排卵後の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。

(イ)と(ロ)との対比較

排卵後の卵細胞の*in vitro* agingでは、*Dnmt1*, *Dnmt3l*などのDNAメチル転移酵素やクロマチン・リモデリング関連遺伝子などの発現変化が特徴的であり、卵の加齢によるクロマチン高次構造の変化が示唆された。また、ミトコリア機能や細胞微小骨格に関する遺伝子の発現も変化していた。

電気化学的手法による加齢卵の酸素消費量測定

さらに、ここで認められたミトコリア機能の低下が、実際に加齢卵の細胞呼吸能に影響を与えているか否かを、超高感度マイクロ電極を用いた電気化学的手法により検討したところ、有意な呼吸能低下が観察された。排卵直後の新鮮卵(post-hCG14 h)の酸素消費量は 0.31 ± 0.01 [means \pm SE] $\times 10^{14}$

/mol s⁻¹であったが、排卵後加齢卵では、post-hCG 23 h で 0.19 ±0.01 ×10¹⁴ /mol s⁻¹、さらに post-hCG 46 h では 0.092 ±0.01 ×10¹⁴ /mol s⁻¹と有意に低下した。

一方、高齢マウスおよび若齢マウス卵から得られた卵について、細胞呼吸能を比較したが、変化は認められなかった。

(ハ)と(ニ)との対比較

排卵後の卵細胞の *in vitro* aging における卵丘細胞の影響を検討した。卵丘細胞を保持させた卵細胞の方が卵丘細胞を除去した卵細胞よりもアポトーシス関連遺伝子の発現が大きく、より加齢が進んでいることが示唆された。

D. 結論

加齢卵における卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察したところ、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、DNA 修復機能の低下など体細胞の加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNA メチル化、クロマチン二次構造の変化などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。さらに、ここで認められたミトコンドリア機能の低下が実際に加齢卵の細胞呼吸能に影響を与えているか否かを、超高度感度マイクロ電極を用いた電気化学的手法により検討したところ、加齢卵では細胞呼吸能が低下していた。細胞呼吸能の電気化学的測定法が「卵の質」の診断に有用である可能性が示唆された。さらに遺伝子発現プロファイルの変化から「卵の質」に寄与する quality marker の候補となる遺伝子が抽出された。また、加齢卵では、テロメラーゼの発現・活性の低下とテロメア長の短縮が認められたため、今後はテロメア短縮の分子メカニズムとその生物学的意義について検討する。

一方、着床前期胚特異的遺伝子 *Hmgpi* は正常な初期胚発生に必須であり、その HMGPI タンパクの培養液中への分泌を観察することが胚の質的診

断に有用である可能性が示唆された

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

論文発表

菅原かな、浜谷敏生. 生殖卵巣学—基礎知識と臨床の進展(編集:石塚文平、鈴木秋悦). 第2章(9) 卵巣の老化. 医歯薬出版, 東京. 2011.

久慈直昭, 井上治, 福永朝子, 菅原かな, 小川誠司, 奥村典子, 山田満稔, 浜谷敏生, 吉村泰典. 【不妊診療のすべて】ART(生殖補助医療)精子・卵子・卵巣の凍結保存とその安全性. 産婦人科治療 102 巻増刊: 495-500(2011.04)

清水聖子, 浜谷敏生, 後藤智子, 田代有喜子, 太田博明, 松井英雄. カップルのセクシャリティを評価する質問票 Golombok-Rust Inventory of Sexual Satisfaction(GRISS)日本語版の作成とその言語的妥当性の検討 日本受精着床学会雑誌 28(2):453-456(2011.08)

久慈直昭, 井上治, 福永朝子, 菅原かな, 小川誠司, 奥村典子, 内田明花, 山田満稔, 佐藤卓, 浜谷敏生, 吉村泰典. 【社会医学的ハイリスク妊娠とその対策】不妊治療後の妊娠とその予後. 産婦人科治療 103(4): 375-382(2011.10)

Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. Fertil Steril 97(2):275-81, 2012.

学会発表

近澤奈々, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 奥村典子, 小川誠司, 菅原かな, 井上治, 福永朝子, 久慈直昭, 吉村泰典. 着床前期および未分化維持に関わる新規 C2H2-zinc finger 遺伝子の解析 第 52 回日本哺乳動物卵子学会, 大田原, 2011 年 5 月 21 日

福永朝子, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿部宏之, 阿久津英憲, 井上治, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. マウス卵子の排卵後加齢における遺伝子発現と酸素消費量との関連. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2011 年 8 月.

Inoue O, Kuji N, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Yamada M, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S. Processing of semen from an HIV-1-positive male and its use in the IVF-ICSI procedure clinical efficacy. The 27th Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Stockholm, Sweden, 2011, 7.

Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Kuji N, Aoki D, Yoshimura Y. Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. The 67th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), Orland, USA, 2011, 10.

Hamatani T. Metabolomic analysis of culture media by CE-TOF/MS suggests a medium-chain fatty acid as an alternative energy source of mouse preimplantation embryos. The 2nd international symposium of

CHA fertility Center on reproductive science, Seoul, Korea, 2011, 10.

浜谷敏生: シンポジウム: 卵巣機能異常に起因する不妊治療の最前線: マウス卵の加齢メカニズム 第 56 回日本生殖医学会学術講演会, 横浜, 2011 年 12 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし