

P2-310 Argonaute2 (Ago2) -免疫沈降法によるヒト卵巣顆粒膜細胞株 (KGN) に発現する microRNA のプロファイリング

日本医大¹, 日本医大解剖学第一²

間瀬有里¹, 石川 源¹, 竹下俊行¹, 瀧澤俊広²

【目的】microRNA (miRNA) は、約 22 塩基の non-coding RNA であり、標的とする遺伝子の発現を主に転写後の翻訳レベルで抑制することが知られている。産婦人科領域の種々の病態の治療・診断に関しても miRNA の臨床応用が期待されるが、そのような観点からの研究は少ない。卵巣顆粒膜細胞は、卵胞の成熟や閉鎖に際して鍵となる細胞で、その機能調節にも miRNA が重要な役割を担っている可能性がある。そこで、ヒト顆粒膜細胞腫由来細胞株 (KGN) に発現している miRNA のプロファイリングを行った。【方法】Ago2-免疫沈降法 (microRNA Isolation Kit, Human Ago2, 和光純薬) を用いて、KGN 細胞から miRNA を特異的に精製した後、cDNA を作製しクローニングを行った。得られた miRNA の塩基配列について、miRNA データベースである miRBase を用いて解析した。さらに、プロファイル解析より明らかとなった一部の miRNA に関して、real-time PCR にて定量的解析を行った。【成績】合計 1065 個の miRNA が得られ、うち 1016 個 (95.3%) が既知の miRNA であった。高頻度に出現した miRNA は、順に、*hsa-miR-21* (41.8%), *hsa-let-7b* (19.5%), *hsa-miR-221* (15.3%), *hsa-miR-125b* (4.6%) であった。また、新規 miRNA と考えられるクローンも 13 種類含まれていた。【結論】miRNA-Ago2 複合体を回収し、miRNA を特異的に精製した本法は、従来法に比べ、高率に miRNA の精製が可能であった点で優れていると考えられた。また、高頻度に出現した miRNA のコンピュータ解析から予測される標的 messenger RNA (mRNA) 中には、卵巣顆粒膜細胞の機能に関わるような mRNA が多く含まれていることが明らかとなった。現在、それら miRNA の詳細な機能解析をすすめている。

P2-311 マウス単一卵子の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の試み

慶應大¹, 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部²

高野光子¹, 山田満穂¹, 久慈直昭¹, 浜谷敏生¹, 阿久津英憲², 持丸佳之¹, 浅田弘法¹, 末岡 浩¹, 青木大輔¹, 吉村泰典¹

【目的】単一卵子の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析は、体外受精卵子の妊孕性評価の手法として期待されるが、抽出される mRNA が微量であるため解析には遺伝子増幅が必須となる。本研究ではマウス単一卵子から抽出した mRNA を増幅した場合の、遺伝子発現解析結果の信頼性を検討した。【方法】1) 卵子 500 個から抽出した RNA を 2 分し、一方を遺伝子増幅 (Ovation system), 一方を対照として定量的 RT-PCR 法により卵子に高発現する 5 遺伝子 (*H1foo*, *GAPDH*, *Uchl1*, *βactin*, *Eef1a*) について卵子一個あたりの遺伝子発現量を算出した。2) 卵子 500 個, 100 個, 10 個, および 1 個から抽出した RNA をそれぞれ遺伝子増幅し、増幅産物を Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent 社) にて解析、推定遺伝子発現量の相関を検討した。【成績】1) 増幅群で *βactin* の推定発現量が有意に高値となったが、他の 4 遺伝子の推定発現量は増幅群・非増幅群間でよく相関した。2) 卵子 500 個群-100 個群間, 500 個群-1 個群間, 10 個-1 個群間の全遺伝子の相関係数はそれぞれ 0.94, 0.83, 0.77 であり、とくに実験 1 で用いた 5 遺伝子の推定発現量はどの群間でも極めてよく相関した。【結論】遺伝子増幅により単一卵子の遺伝子発現解析が可能と考えられた。ただし、各遺伝子により増幅効率が異なり、また試料に含まれる遺伝子量が少ないほど増幅効率が不安定となって信頼性が低下する。今後遺伝子抽出法・増幅法の改良に加えて、target とする遺伝子を限定する必要性が示唆された。

4 一般演題
(土)

P2-312 マウス胚盤胞の *in vivo* と *in vitro* におけるインプリント遺伝子発現の比較検討

東邦大医療センター大森病院

福田雄介, 片桐由起子, 北村 衛, 渡辺慎一郎, 松江陽一, 宗 晶子, 森田峰人

【目的】近年、エピジェネティクスは胎仔の発育異常以外にメタボリック症候群や悪性疾患の一部など生命予後に影響する疾患への関与が明らかとなってきた。また、エピジェネティクスの変化が ART により生じることが報告され、ART における種々の要素が原因となりうるものが懸念されている。そこで、今回我々は体外培養のエピジェネティクスへの影響を検討することを目的とし、マウス胚盤胞におけるインプリント遺伝子発現を *in vivo* と *in vitro* で比較、さらに 2 種類の培養液間で比較した。【方法】ICR 系雌マウスを過排卵刺激し採卵、ICR 系雄マウス精子にて媒精した。受精卵を KSOM/AA または M16 で 72 時間培養し胚盤胞を得た (KSOM 胚, M16 胚)。一方過排卵刺激した雌マウスと雄マウスを交配させ、72 時間後に雌マウスの子宮より胚盤胞を採取した (*vivo* 胚)。個々の胚盤胞より RNA を抽出し real-time PCR を施行した。Study gene は胎仔発育への関与が報告されている imprinted gene (*Igf2*, *Peg3*, *Kcnq1ot1*, *Snrpn*) とし、Control gene として *Gapdh* を使用した。【成績】*Vivo* 胚と *vitro* 胚の比較では、*vivo* 胚と KSOM 胚ではいずれの遺伝子発現にも有意差を認めなかったが、M16 胚では *Igf2* の発現が有意に増強した ($p < 0.05$)。 *Vivo* 胚間の培養液の違いによる比較では、KSOM 胚と M16 胚の比較では M16 胚において、*Igf2* および *Kcnq1ot1* の発現に優位な増強を認めた ($p < 0.05$)。【結論】*In vitro* の胚発育において必ずしもインプリント遺伝子の発現に変化が生じるのではないことが確認された。しかしながら、培養液の違いにより遺伝子発現が変化を受けることから、培養液の組成がインプリント遺伝子発現変化の要因になることが示唆された。