

K1-9 ヒト卵巣における bone morphogenetic proteins 2 (BMP2) の役割に関する検討帝京大溝口病院¹, 東京大²吉野 修¹, 大須賀穰², 矢野 哲², 西井 修¹, 武谷雄二²

【目的】卵胞発育, 排卵, 黄体形成という一連の過程にゴナドトロピンレセプター (FSHR, LHR) が関与しており, 顆粒膜細胞 (GC) において卵胞期に FSHR が, 黄体期に LHR が主に発現している。しかし, これらレセプターの発現制御は完全に解明されていない。近年, BMP サイトカインが卵巣生理に関与していることが知られている。ヒト卵巣における BMP2 の発現および役割について, FSHR, LHR 発現の観点から検討を行った。【方法】患者の同意の下, 検体を採取した。子宮疾患手術時に得られた正常卵巣を用い, BMP2 の発現を in situ hybridization にて検討した。次に IVF 患者より分離培養した GC に BMP2 (100ng/ml) を添加し, FSHR および LHR mRNA の発現を定量的 PCR にて検討した。また, 同培養系に hCG (10IU/ml) を添加し BMP2 の発現量および BMP2 の阻害作用を有する BMP and activin bound protein (BAMBI) の発現を mRNA level で検討した。【成績】ヒト卵巣において, BMP2 は胞状卵胞の GC に発現していたが, 黄体での発現は見られなかった。in vitro の系において, BMP2 添加により, GC における FSHR 発現はコントロールの約 10 倍に上昇したのに対し, LHR 発現は 1/5 に低下した。また, hCG 刺激により BMP2 の発現は 1/10 に減少し, 一方で BAMBI の発現は 3 倍上昇した。【結論】卵胞期: GC に発現する BMP2 は FSHR を誘導し, 一方で LHR 発現を抑制することで, 卵胞発育を促進させつつ早期の黄体化を抑制する。黄体期: hCG 刺激により BMP2 の発現は減少し, また BAMBI の上昇により BMP2 の作用は更に減少する。BMP2 作用の減弱は LHR を誘導し, 黄体化を促進すると考えられる。ヒト卵巣において BMP2 とゴナドトロピンシステムは互いを制御していることが示唆された。

K1-10 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とその応用慶應大¹, 国立成育医療センター研究所生殖・細胞医療研究部²持丸佳之¹, 久慈直昭¹, 山田満稔¹, 奥村典子¹, 高野光子¹, 浜谷敏生¹, 阿久津英憲², 浅田弘法¹, 末岡 浩¹, 青木大輔¹, 吉村泰典¹

【目的】遺伝子発現解析を体外受精卵子の妊孕性評価に応用しようという試みが始まっている。この際, 単一卵子から抽出される mRNA はごく微量であるため必須となる遺伝子増幅が, 増幅前の mRNA 組成を正確に反映しているかどうか検証する必要がある。本研究では単一卵子から抽出した mRNA を Ribo-SPIA 法により増幅して得た遺伝子発現解析結果の信頼性を検討し, 併せて加齢に伴う卵子の遺伝子発現変化についても検討した。【方法】1) 8 週齢マウス卵子 500 個から抽出した mRNA を 2 群に分け, 1 群のみ遺伝子増幅した上で卵子に高発現する 4 遺伝子 (H1foo, UCHL1, GAPDH, Eef1α) を定量的 RT-PCR により定量, 増幅効率を比較した。また卵子 500 個と 1 個から抽出した mRNA をそれぞれ遺伝子増幅後にマイクロアレイ解析し, 解析結果の相関を検討した。2) 8 週齢および 44 週齢マウスから得た単一卵子を遺伝子増幅し遺伝子発現解析した。【成績】1) 4 遺伝子の増幅効率は定量的 PCR 上ほぼ一定であった。また 500 個と 1 個に由来する発現遺伝子はマイクロアレイ解析上相関係数 0.77 の相関があり, さらに各卵子間で安定して発現する 6450 遺伝子に限定して解析するとその相関係数は 0.85 と上昇した。2) マイクロアレイ解析の結果, 加齢マウスでは紡錘体形成や染色体分離に関係する遺伝子発現量が有意に変化していることが示唆された。【結論】Ribo-SPIA 法による遺伝子増幅により単一卵子の遺伝子発現の差異が解析可能であり, この方法により加齢による遺伝子発現変化を検出可能であった。また対象とする遺伝子を限定していくことが, 微小サンプルからの遺伝子発現解析の信頼性を高める方法として有用であると考えられた。

K1-11 ヒト卵巣組織のガラス化凍結保存とマウスへの異種移植—臨床応用に向けて埼玉医大総合医療センター¹, ミューズレディスクリニック², 赤心堂病院³, 順天堂大⁴, 加藤レディスクリニック⁵, 埼玉医大⁶高井 泰¹, 林 直樹², 関 博之¹, 大久保貴司³, 竹田 省⁴, 竹原祐志⁵, 加藤 修⁵, 石原 理⁶

【目的】ヒト卵巣組織の凍結保存と再移植は, 近年の妊娠出産例の報告以来, 悪性腫瘍の治療により生殖機能の傷害が懸念される女性にとって, 切実かつ喫緊の課題である。ガラス化凍結保存法は従来の緩慢凍結法に比べて簡便だが, 未知の点が多い。我々は, DAP 法により凍結保存した組織片を融解後に免疫不全マウス (NOD-SCID マウス) に移植したところ, 卵胞発育を認めたことを報告した。更に最近, 香川らは, Cryotissue 法によりウシおよびヒト卵巣組織のガラス化凍結保存に成功したと報告した。【方法】本研究は学内倫理委員会による承認を得て行われた。ヒト卵巣組織を 64 人の性同一性障害患者 (30.7±5.6 歳; mean±SD) から書面による同意を得て採取した。ヒトでの再移植手術を想定して卵巣組織片を大きくし, 10mm 四方・厚さ 1mm とした。この組織片を DAP 法および Cryotissue 法で凍結して数週間後に融解し, SCID マウスの卵巣嚢内あるいは背部皮下に移植し, 2 週間後に摘出して残存卵胞密度を計算した。【成績】40 歳未満 (n=6) の凍結前の卵巣では 84±20 個/mm³ (mean±SE) の初期卵胞 (原始卵胞, 1 次卵胞, 前胞状卵胞の合計) を認めた。Cryotissue 法で凍結後に融解した組織片では 67±7 個/mm³ の初期卵胞を認めた。これを SCID マウスの卵巣嚢内および皮下に移植したところ, それぞれ 10±5 個/mm³ および 4±2 個/mm³ の初期卵胞を認めた。一方, DAP 法で凍結後融解し, 移植した組織片では卵胞を認めなかった。【結論】Cryotissue 法で凍結したヒト卵巣を移植した場合, 組織片あたり 1000 個前後もの初期卵胞が生着するが, 卵胞残存率を高めるために移植法などの更なる改良を加える必要があると考えられる。