

200923020A

厚生労働科学研究費補助金

子ども家庭総合研究事業

ライフスタイルの変化に伴う妊娠希望時の妊孕性減弱に対する
病態解明、新規診断法と治療法開発のための研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22年 (2010)年 3月

研究代表者 齊藤英和

目 次

I. 総括研究報告

- ライフスタイルの変化に伴う妊娠希望の妊孕性減弱に対する病態解明、
新規診断法と治療法開発のための研究 1
齊藤英和

II. 分担研究報告

1. 生殖医学における加齢の現状と診断法 11
齊藤英和
2. ライフスタイルの変化に伴うPCOS婦人に対する生殖医療対策 17
苛原 稔
3. 子宮内膜症に関する研究 31
小林 浩
4. ミトコンドリアとストレスに関する研究 35
末岡 浩
5. 子宮内膜症における apoptosis 関連遺伝子発現異常の網羅的解析 41
檜原 久司
6. 子宮内膜症：発症・進展における新規免疫細胞 Th17 細胞についての検討 43
大須賀 穰

7. 加齢・多嚢胞性卵巣症候群に関する研究	49
藤井 順逸	
8. 加齢と ES 細胞	61
阿久津 英憲	
9. 加齢と受精現象に関する研究	65
宮戸 健二	
10. 高血圧症と妊孕性 ～受精機構における ACE2 の機能解析～	71
岡村 匡史	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
総括研究報告書

ライフスタイルの変化に伴う妊娠希望時の妊孕性減弱に対する病態解明、
新規診断法と治療法開発のための研究

研究代表者 齊藤 英和 国立成育医療センター不妊診療科医長

研究要旨

近年、ライフスタイルの変化により、挙児を希望する年齢が高齢化している。これに伴い、生理的な加齢により妊孕性減弱が起こるとともに、加齢により全身疾患や生殖臓器の疾患が増加し、さらに妊孕性が減弱する。本研究では、妊孕性減弱に対し科学的裏付けのある確かなエビデンスを獲得するとともに、新しい診断法・治療法を開発し生殖医療の質を上げることを目的としている。

挙児を希望する年齢が高齢化することで不妊を引き起こす病態・因子は多種存在するため、病態を解明し治療法を開発するには多面的に研究する必要性があり、班員は各分担項目より研究を進めている。

生殖細胞が酸化ストレスの影響をどのように受けているか詳細に明らかにするため、生殖補助医療を受けた不妊患者のヒト顆粒膜細胞ならびにヒト顆粒膜細胞腫様細胞株 KGN を用い、ストレスキナーゼの一つである p38MAPK の活性化および動態について免疫染色法ならびにウエスタンブロットによる解析を行った。顆粒膜細胞は老化により酸化ストレスを主因としたストレスを受け、p38MAPK シグナルの伝達経路を変化させており、p38MAPK の局在変化を指標とした生殖細胞の老化検査への応用が考えられた。

PCOS の正確な診断はリスクを回避し、PCOS 特異的な治療を選択するために重要であるので、PCOS の診断基準に関して詳細な検討を行った。本研究で用いる PCOS の診断基準は以下の通りである。1, 月経異常（希発月経、第1度無月経、無排卵周期症）であること。2, 卵巣所見：小卵胞（2～9mm）10 個以上であること。3, 内分泌所見：

LH 値または男性ホルモンが高値であることが基準となった。

子宮内膜症に hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) が過剰発現している転写因子として同定された。この下流遺伝子を同定する事により子宮内膜症の本体に迫った。その結果子宮内膜症は HNF-1beta を過剰発現することにより、①グリコーゲン蓄積、②抗アポトーシス作用、③酸化ストレスによる活性酸素により解毒酵素など酸化ストレス関連遺伝子発現が過剰発現する、事が判明した。

妊孕性の中で受精・胚発生に関わる卵子、および卵子に強い関わりを有する顆粒膜細胞についてミトコンドリア(mt)DNA の量的・質的分析を介して、加齢との関係を解明し、妊孕性改善等に有用な基礎データの集積を目標とした。その結果、卵子、顆粒膜細胞において加齢とともに mtDNA copy 数は減少し、卵子、顆粒膜細胞における mtDNA copy 数は妊孕性に大きく影響を与えていることが示唆された。

子宮内膜症における apoptosis の異常と病態の関連性の詳細を明らかにすることを目的として、cDNA microarray により網羅的解析を行う。この解析により、子宮

内膜症における apoptosis の異常と病態の関連性の詳細が明らかになると期待される。さらにその異常をターゲットとした子宮内膜症の治療法や予防法の開発に結びつくと考えられ、その検体の準備が整った。

Th17 細胞が子宮内膜症の進展に関与しており、病巣局所に集積している。しかしながら、Th17 細胞の子宮内膜症病巣への集積機序は不明であった。そこで、Th17 細胞が発現するケモカイン受容体 CCR6 がそのリガンドである CCL20 の影響を受けて集積すると考えて実験を行った。子宮内膜症の局所環境として知られている炎症が各種サイトカインを介して子宮内膜症間質細胞からの CCL20 産生を増やして Th17 を局所に集積させることが示唆され、さらに、これには IL-17A を介するフィードバック作用も関与していると考えられた。

SOD1-KO 胚は野生型胚に比べて酸化ストレスに対する感受性が高く、通常ならば問題にならない程度の微量の活性酸素種に対しても鋭敏に応答する事から、胚の酸化障害の機構を解析するためのモデル系となる。本研究の目的は、活性酸素障害に関わる分子機構を解明することで、老化や妊孕性の低下に繋がる酸化ストレスの軽減に役立てることにある。細胞周期の調節には Cdk インヒビターが重要なため、RT-PCR によりその発現を解析したところ、20%酸素で培養した SOD1 欠損胚では p16 の発現が特に亢進していた。一方、1-2 細胞胚とは異なり、4 細胞期の SOD1 欠損胚を通常酸素に曝すとアポトーシスが起るが、この時期にはミトコンドリア機能が亢進していることから、この場合のアポトーシスにはミトコンドリアが関わる可能性が高いと推測された。

実験モデルマウスの加齢胚性幹 (ES) 細胞を用いて、加齢とゲノムの不安定性を解析し、基礎研究を展開する加齢モデルの確立に向け詳細な解析を行う。加齢 ES 細胞は対象 ES 細胞に比べてトリソミー型の染色体異常率が有意に高かった。加齢 ES 細胞はゲノム不安定性を内在することが示唆され、ES 細胞を用いることで加齢と多能性性質の細胞に及ぼす影響を分子レベルで解明することができる基盤を構築できた。

膜 4 回貫通型タンパク質 CD9 の卵子における機能に着目し、生きた卵子での CD9 の局在解析を通じて、受精を制御する分子メカニズムの解析を行った。受精の分子機構を解明するための手がかりとして、CD9 を含む膜構造体 (エキソソーム) が膜融合に関与していること、エキソソームには CD9 欠損卵子の融合異常を回復させる活性があることを明らかにした。

ACE2 は妊孕性に重要な機能があると考え、体外受精や精子-卵透明帯結合能、卵細胞質融合能を検討し、受精過程における ACE2 の機能解析を行った。ACE2 は受精機構、特に精子-卵透明帯結合に重要な役割を果たしており、ACE2 が高発現すると精子-卵透明帯結合が抑制され、ACE2 の機能が阻害されると精子-卵透明帯結合が促進することから、ACE2 は精子-卵透明帯結合において、負の制御を行う重要な分子である事が示された。

以上、妊孕性減弱に対する各方面からの研究アプローチを順調に進めている。

分担研究者

苛原 稔	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部発生発達医学 教授
小林 浩	奈良県立医科大学 婦人科腫瘍学 教授
末岡 浩	慶應義塾大学医学部産婦人科学 准教授
檜原久司	大分大学医学部 産科婦人科 教授
大須賀 穰	東京大学医学部産科婦人科学 講師
藤井 順逸	山形大学大学院医学系研究科 教授
阿久津 英憲	国立成育医療センター研究所 室長
宮戸 健二	国立成育医療センター研究所 室長
岡村 匡史	国立国際医療センター研究所 室長

1. 生殖医学における加齢の診断法

加齢に伴う生殖能力の低下は古くから知られてきた。特に、卵子の老化は30代後半から急速に進行すると考えられており、女性の晩婚化は生殖機能にとって大きなリスクとなる。排卵過程において卵巣で活性酸素を産生することが報告されており、加齢にしたがい排卵回数を重ね、貯蔵された卵子がストレスを受け、卵子の機能が低下すると推測される。そこで、本研究では、生殖細胞が酸化ストレスの影響をどのように受けているか詳細に明らかにするため、生殖補助医療を受けた不妊患者のヒト顆粒膜細胞ならびにヒト顆粒膜細胞腫様細胞株 KGN を用い、ストレスキナーゼの一つである p38MAPK の活性化および動態について免疫染色法ならびにウェスタンブロットによる解析を行った。

p38MAPK は、他臓器で老化によりリン酸化の亢進が報告されているが、顆粒膜細胞においてもより高齢の患者ほど強く活性していることが明らかとなった。また、顆粒膜細胞株においても過酸化水素水刺激により同様の変化が確認された。老化の大きな原因が酸化ストレスであることはコンセンサスとなっており、生殖細胞においてもこの仮説を裏付ける結果が得られたと思われる。次に、

p38MAPK は細胞質内と核内を行き来することが知られていることから、老化顆粒膜細胞におけるリン酸化 p38 の局在を詳細に検討した。リン酸化 p38 は若い顆粒膜細胞では比較的多くの細胞で核局在が観察されるのに対して、老化顆粒膜細胞では核局在している細胞の比率が低下し、主に細胞質でリン酸化していることが明らかとなった。若い個体の顆粒膜細胞では、p38MAPK は卵成熟や排卵過程に必要な情報伝達物質として核内で様々な遺伝子の転写を促進しているが、老化個体では細胞外に存在する酸化ストレス発生源が核内で働く p38MAPK を細胞質に移動させて、ストレスシグナル伝達分子へと変化させている可能性が考えられる。さらに、顆粒膜細胞腫を用いて酸化ストレス、FSH、TNF- α の刺激後 p38MAPK の局在変化を確認したところ、それぞれ異なる局在変化を示し、老化による顆粒膜細胞における p38MAPK のリン酸化亢進および局在変化は酸化ストレスによるものであることが強く示唆された。

以上の研究から、顆粒膜細胞は老化により酸化ストレスを主因としたストレスを受け、p38MAPK シグナルの伝達経路を変化させていることが示された。本研究の成果は、生物学的に非常に重要な意味を持つとともに、p38MAPK の局在変化を

指標とした生殖細胞の老化検査への応用も想定される。

2. PCOS 婦人に対する生殖医療対策

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は排卵誘発治療で 80%以上が妊娠するが、OHSS や多胎妊娠の高リスク群であり、治療の成否だけでなく生活の質を考えた低侵襲性治療が必要とされる。また、女性の晩婚化に伴い卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する必要性が高まる一方、価値観が多様化している。従って PCOS の正確な診断はリスクを回避し、PCOS 特異的な治療を選択するために重要であるので、本年度は PCOS の診断基準に関して詳細な検討を行った。

方法：診断として多くの施設で取り入れられている症状、超音波検査による卵巣形態、さらに内分泌検査としてはゴナドトロピン測定に関して最近多様化している測定方法の個々に関して検討するとともに、診断に困難を伴うアンドロゲンに関する診断の根拠と基準を詳細に検討した。

画像では少なくとも一側の卵巣に 2-9mm の小卵胞が 10 個以上存在することが必須と考えられた。男性ホルモンはテストステロン、遊離テストステロンまたはアンドロステンジオンのいずれかが有用であり、LH はスパック-S による測定の場合は $LH \geq 7$ mIU/ml かつ $LH \geq FSH$ が有用である。また内分泌検査は大きな卵胞が存在しない時期に行わないと再現性が低いことがあきらかとなった。

これらの診断基準を用いるとにより PCOS を正確に診断し、適切な治療法を選択することが容易となると考えられた。

本研究で用いる PCOS の診断基準は以下の通りである。

1, 月経異常：PCOS の月経異常は、希発月経、第 1 度無月経、無排卵周期症であること。

2, 卵巣所見：小卵胞 (2-9mm) のカウントを明記することとし、2-9mm の卵胞 10 個以上では感度 86%、特異度 90%に該当した。

3, 内分泌所見：

1) LH 値：特に採血時期を明確にした。つまり、卵胞発育がない時期に採血すること、女性ホルモン剤の服薬中を避ける。特に消退出血を起こしたり、排卵誘発で月経を起こした場合には、10日間程度は LH 値が抑制されることにも留意が必要である。

2) 男性ホルモン：測定する男性ホルモンの種類として、テストステロン、遊離テストステロン、アンドロステンジオンを例示し、これらの卵巣由来のホルモンの測定を推奨した。

3. 子宮内膜症に関する研究

卵巣チョコレート嚢胞の 0.5~1.0%が卵巣癌に移行する可能性が示唆されている。子宮内膜症全体のがん化に関しては、高いものではその頻度は 2.5%以上との報告もあり、子宮内膜症と悪性化がクローズアップされている。さらに日本では明細胞腺癌が高頻度であることも両者の因果関係を理解する上で興味深い。我々は子宮内膜症と卵巣明細胞腺癌の病態を分子生物学的手法を駆使して解明しているが、過剰発現している遺伝子として転写因子である hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) が最重要遺伝子として同定された。この下流遺伝子を同定する事により子宮内膜症の本体に迫る。

チョコレート嚢胞と発癌に関して、HNF-1beta の下流には、解毒酵素として

UGT1A1 やアネキシン A4 が過剰発現する。前者は CPT-11 の解毒酵素であり、後者はパクリタキセルの解毒酵素である。これらの解毒酵素が過剰発現している限り、明細胞腺癌の抗癌剤耐性は克服できない。将来の明細胞腺癌の治療は HNF-1beta の発現を制御する分子標的治療が最も有力であろう。さらに、明細胞腺癌にはフェリチンが過剰発現している。これも HNF-1beta の下流遺伝子産物である。なぜ、フェリチンが過剰発現しているかという点、チョコレート嚢胞内に出血すると、凝固→線溶→溶血→ヘモグロビン→ヘムとグロビン→鉄の放出となり、過剰な鉄を除去する必要があると考えられる。過剰鉄による酸化ストレスにより細胞や遺伝子 DNA が障害され、癌化へ向けて進んでいくことが報告されている。

子宮内膜症は HNF-1beta を過剰発現することにより、①グリコーゲン蓄積、②抗アポトーシス作用、③酸化ストレスによる活性酸素により解毒酵素が過剰発現する、事が判明した。さらに、子宮内膜症に特異的に発現している遺伝子群をマイクロアレイ解析で検討した結果、酸化ストレス、糖代謝関連酵素、解毒機構関連タンパク、抗アポトーシス、細胞周期調節因子がパスウェイ解析で抽出された。転写因子である HNF-1beta が最重要遺伝子として同定された。代表的 44 遺伝子のうち酸化ストレスは 4/5 を占め、病態との関連につき検討している。以上より、子宮内膜症の特異的発現遺伝子解析による酸化ストレス関連遺伝子発現が過剰発現する事を証明した。

4. ミトコンドリアとストレスに関する研究

酸化リン酸化代謝機能に不可欠で

あるミトコンドリアに着目し、妊孕性の中で受精・胚発生に関わる卵子、および卵子に強い関わりを有する顆粒膜細胞についてミトコンドリア(mt)DNA の量的・質的分析を介して、加齢との関係を解明し、妊孕性改善等に有用な基礎データを集積することを目的とした。

IVF で廃棄される未受精卵、分割異常胚、顆粒膜細胞について量的評価は、mtDNA を 1 細胞中に 9100copy 含むヒトリンパ球由来の細胞株を用いて TaqMan® real time PCR による検量系を作成し、その検量線もとに mtDNA copy 数を定量した。定性分析については T8993G 変異および ATPase6 遺伝子上の 4977bp deletion についてヘテロプラスミーの存在を分析した。

未受精卵、未分割胚では mtDNA copy 数は、40 歳未満群と比較したところ、40 歳以上群において有意に減少を認めた。分割胚は有意差は認めないものの、40 歳未満群と比較し、40 歳以上群において mtDNA copy 数は減少傾向を示した。顆粒膜細胞の mtDNA copy 数について有意差は認めないものの 40 歳以上の群で減少傾向を認めた。変性卵の mtDNA copy 数は著しい mtDNA copy 数の減少を確認した。T8993G 変異および 4,977bp deletion は検出されなかった。

未受精卵、未分割胚において、mtDNA copy 数は、40 歳未満群と比較して、40 歳以上で有意に減少を認めた。加齢とともに mtDNA の量が減少することで ATP の産生が低下し、結果として妊孕性が低下する原因の 1 つになりうる事が示唆された。また、卵の質の低下は mtDNA copy 数減少と関連があることが示唆された。4,977bp deletion、T8993G 変異は検出されなかったことから多様な変異の存在も考えられた。

卵子、顆粒膜細胞において加齢とともに mtDNA copy 数は減少し、卵子、顆粒

膜細胞における mtDNA copy 数は妊孕性に大きく影響を与えていることが示唆された。

5. 子宮内膜症における apoptosis 関連遺伝子発現異常の網羅的解析

子宮内膜症の発生機序として月経血逆流による腹腔内への子宮内膜移植説が広く支持されている。しかし月経血逆流現象は多くの女性に認められるのに、子宮内膜症は一部の女性にしか発症しない。

子宮内膜症のない正常女性では、月経時に腹腔内に逆流した子宮内膜細胞は apoptosis に陥り、子宮外では生存しない。しかし子宮内膜症では apoptosis に陥る細胞の減少により子宮内膜細胞が異所性に生存・生着し、子宮内膜症が発生すると考えられる (Dmowski et al., 1998; Gebel et al., 1998; Meresman et al., 2000)。子宮内膜症を有する女性の正所性子宮内膜では、正常女性の子宮内膜に比べて apoptosis が減少している。子宮内膜小病変ではさらに apoptosis が減少している (Dmowski et al., 1998; Gebel et al., 1998)。また子宮内膜症を有する女性の子宮内膜細胞は増殖能が亢進し、子宮外で生存・生着する可能性が増している。子宮内膜症細胞における death signal の伝達障害と apoptosis を回避する能力はいずれも、apoptosis 抑制因子 (Bcl-2 など) の発現亢進と apoptosis 促進因子 (Bax など) の発現減少と関連している (Watanabe et al., 1997; Meresman et al., 2000)。このような背景から、子宮内膜症における apoptosis の異常と病態の関連性の詳細を明らかにすることを目的として、cDNA microarray により網羅的解析を行う。

卵巣子宮内膜症性嚢胞に対する手術時に、患者より文書による同意を得て子宮内膜症組織を採取した。また対照として使用するため、子宮筋腫に対する子宮全摘術の際に、患者より文書による同意を得て正常子宮内膜組織を採取した。採取した組織より、genomic DNA、messenger RNA (mRNA) および蛋白を抽出した (組織採取および抽出を継続中)。組織の一部を免疫組織染色のための組織切片作製用に保存した。また、採取した正常子宮内膜と子宮内膜症の組織から間質細胞を分離・培養し、それらが間質細胞であることを immunocytochemical staining により確認した。

採取した正常子宮内膜と子宮内膜症の組織から間質細胞を分離・培養し、それぞれの培養細胞から mRNA を抽出する。得られた mRNA を用いて cDNA microarray により網羅的解析を行うこととする。この解析により、子宮内膜症における apoptosis の異常と病態の関連性の詳細が明らかになると期待される。さらにその異常をターゲットとした子宮内膜症の治療法や予防法の開発に結びつくと考えられる。

6. 子宮内膜症：発症・進展における新規免疫細胞 Th17 細胞についての検討

ライフスタイルの変化にともない、子宮内膜症が生殖年齢女性の妊孕性を減弱させる大きな原因の一つとなっている。しかしながら、本疾患は発症・進展機序が不明で予防・治療に苦慮している。今回の研究では、本疾患の発症・進展メカニズムとして重要である免疫学的側面について検討した。近年、新たな T 細胞である Th17 細胞が発見され、本細胞が子宮内膜症の進展に関与しており、

病巣局所に集積していることを示してきた。しかしながら、Th17 細胞の子宮内膜症病巣への集積機序は不明であった。そこで、我々は Th17 細胞が発現するケモカイン受容体 CCR6 がそのリガンドである CCL20 の影響を受けて集積すると考えて実験を行った。材料は倫理委員会の承認と書面による同意のもと、子宮内膜症の手術で得られた検体を使用した。本研究では、まず、免疫組織染色法により子宮内膜症病巣で Th17 細胞が CCR6 を発現しており、CCL20 が周囲の間質細胞に発現していることを示した。ついで、CCL20 が末梢血より Th17 細胞を遊走させることを細胞遊走実験で示した。また、子宮内膜症間質細胞を単離した培養系を使用して、炎症性サイトカインである IL-1 \cdot 、TNF \cdot 、IL-17A が子宮内膜症間質細胞からの CCL20 産生を促進し、特に、TNF \cdot と IL-17A が相乗作用を持つことを示した。また、これらの作用が ERK、p38MAPK、JNK の各 MAP キナーゼ阻害剤で抑制されることも示した。以上の所見より、子宮内膜症の局所環境として知られている炎症が各種サイトカインを介して子宮内膜症間質細胞からの CCL20 産生を増やして Th17 を局所に集積させることが示唆され、さらに、これには IL-17A を介するフィードフォワード作用も関与していると考えられた。子宮内膜症における Th17 細胞の役割を考えると、本研究の成果は子宮内膜症治療に多くの示唆を与えるものと考えられる。すなわち、従来炎症抑制、MAP キナーゼ阻害といった治療概念が子宮内膜症における Th17 細胞の作用の抑制にも適応されうることを確認された上に、CCL20/CCR6 をターゲットとする新たな子宮内膜症の治療戦略の可能性が提示された。今後は他の免疫担当細胞との相互作用にも注目しつつ、子宮内膜症患者の妊孕性向上に向けたさらなる検討が

必要である。

7. 加齢・多嚢胞性卵巣症候群に関する研究

酸化ストレスは、加齢・子宮内膜症・多嚢胞性卵巣症候群における妊孕性低下の原因の一つとみなされている。こうした酸化ストレスが原因となる疾患の予防もしくは改善のためには、酸化的障害の生じる機構について知る必要がある。これまでに、Superoxide dismutase-1 欠損 (SOD1-KO) マウスを用いた解析から、SOD1-KO 胚では空気中の酸素濃度 (20%) でも酸化ストレスとなり、2 細胞での発生停止と 4 細胞以降は細胞死を起こすことを明らかにしている。このように、SOD1-KO 胚は野生型胚に比べて酸化ストレスに対する感受性が高く、通常ならば問題にならない程度の微量の活性酸素種に対しても鋭敏に応答する事から、胚の酸化障害の機構を解析するためのモデル系となる。本研究の最終的な目的は、活性酸素障害に関わる分子機構を解明することで、老化や妊孕性の低下に繋がる酸化ストレスの軽減に役立てることにある。

SOD1 欠損胚を通常酸素濃度 (20%) で培養すると 2 細胞ですべて分裂停止し、1%酸素で培養する事で解除された。胚のスーパーオキシド生成については、20%酸素培養では SOD1 欠損胚の方が多く、分裂停止の原因と考えられた。しかし活性酸素の主な産生源であるミトコンドリアの機能について調べたところ、酸素消費・ATP 含量・膜電位は個々の発生停止胚でもほぼ正常に維持されており、発生停止の直接的な原因とは考えにくかった。細胞周期の調節には Cdk インヒビターが重要なため、RT-PCR によりその発現を解析したところ、20%酸素で培養し

た SOD1 欠損胚では p16 の発現が特に亢進していた。一方、1-2 細胞胚とは異なり、4 細胞期の SOD1 欠損胚を通常酸素に曝すとアポトーシスが起るが、この時期にはミトコンドリア機能が亢進していることから、この場合のアポトーシスにはミトコンドリアが関わる可能性が高いと推測された。

今回の検討から、SOD1 欠損胚を用いることによって、内因性の酸化ストレスが胚発生に与える影響について明確にすることができた。SOD1 欠損胚は、酸化ストレスによる初期胚の発生停止と細胞死の機構を解明する上で有用なモデルとなると考えられる。

8. 加齢と ES 細胞

女性の生殖適齢期間は、より高齢へとシフトするわけではなく、出生数割合の年齢分布が 30 歳代半ばへとシフトし晩婚化により妊娠が可能である期間はより限られた短い期間となっている。出産年齢が上昇していることより加齢と卵細胞の質への影響は早急に解明しなければならない問題である。実験モデルマウスの加齢胚性幹 (ES) 細胞を用いて、加齢とゲノムの不安定性を解析し、基礎研究を展開する加齢モデルの確立に向け詳細な解析を行う。

実験動物マウスを用いて行う。加齢モデルを構築し、初期胚の胚盤胞期胚から樹立される ES 細胞を加齢化モデルの胚より樹立した (加齢 ES 細胞)。体外培養系における時間軸からゲノムに与える影響を染色体核型解析を行いゲノム不安定性について検討した。今回は G バンド詳細分析を行った。本研究は国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施した。

対象 ES 細胞では染色体核型異常の認

められたものはなかったが、加齢 ES 細胞においては培養を続け 20 継代過ぎたところで解析した結果、染色体核型異常が検出されてきた。特定の染色体にトリソミー型の異常がおこる傾向性は見いだすことができなかった。今回の染色体核型異常はストキャスティックにおこることが示唆された。対象 ES 細胞の結果と比べ、加齢 ES 細胞は継代を重ねると高率に染色体異常が起ることが示唆された。

加齢モデルを構築し、卵細胞への影響を観察する実験システムは個体あるいはそれより得られるサンプルの希少性よりこれまで世界的にも十分な解析システムが構築されず、知見が得られてもバリデートするシステムを構築することは極めて重要である。加齢 ES 細胞はゲノム不安定性を内在することが示唆され、ES 細胞を用いることで加齢と多能性性質の細胞に及ぼす影響を分子レベルで解明することで、加齢卵子の卵細胞本来の性質、全能性獲得へ及ぼすメカニズムを明らかにしていく。

加齢モデルマウス由来の卵子をもとに樹立した ES 細胞について特に染色体核型解析を行った。加齢 ES 細胞は対象 ES 細胞に比べてトリソミー型の染色体異常率が有意に高かった。加齢 ES 細胞はゲノム不安定性を内在することが示唆され、ES 細胞を用いることで加齢と多能性性質の細胞に及ぼす影響を分子レベルで解明することができる基盤を構築できた。

9. 加齢と受精現象に関する研究

加齢によってヒト卵子の生殖能力が低下することが知られているが、対処方法が存在しないのが現状である。我々は、対処方法を探る目的で、膜 4 回貫通

型タンパク質 CD9 の卵子における機能に着目し、生きた卵子での CD9 の局在解析を通じて、受精を制御する分子メカニズムの解析を行った。

方法としては、(1) 生きた状態での受精の観察：受精前後での細胞膜の動態を経時的に観察した。

(2) トランスジェニックマウスの作製

CD9 の細胞内領域に EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) を融合させたタンパク質を発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製した。結果：(1) マウス卵子での CD9 の局在解析：EGFP との融合によって CD9 の局在を生きたままの卵子での局在を解析した。CD9 は細胞膜に限局せず、細胞外マトリックスである透明帯と細胞膜の間 (卵胞腔) にも存在することを見出し、ウエスタンブロット解析によってもタンパク質の蓄積量として約半分の量の CD9 が細胞外に存在することを示す結果を得た。

(2) CD9 を含む膜構造体の発見

透過型電子顕微鏡によって CD9 の局在を調べたところ、CD9 を含む構造体 (直径 50~250nm) によって卵胞腔が満たされていることがわかった。

(3) CD9 を含む膜構造体の成分分析と膜融合促進活性の検出

CD9 を含む膜構造体は HSP90、CD64、GM3 と何れもエキソソームと同様の成分を含んでことがわかった。さらに、この膜構造体が CD9 欠損卵子の融合異常を回復する活性をもつことを明らかにした。

(4) CD9 結合タンパク質の同定

CD9 変異体の解析から CD9 の C 末端 7 アミノ酸に機能領域があることを明らかにし、酵母 two-hybrid 系から CD9 結合タンパク質として tubulin β 2A を同定した。今後は、加齢による生殖能の低下について受精効率の観点から解析を行う。特に CD9 および tubulin β 2A の機能に注

目して研究を行う。本研究では、微小管の重合促進・重合阻害によって受精能力を制御する方法を開発することをめざす。

この研究では、受精の分子機構を解明するための手がかりとして、CD9 を含む膜構造体 (エキソソーム) が膜融合に関与していること、エキソソームには CD9 欠損卵子の融合異常を回復させる活性があることを明らかにした。卵子培養法を開発するための指標として、凍結融解後の CD9 の局在およびエキソソームの機能を解析することにより、卵子の受精能の損傷の程度、および回復の程度を定量化することが可能となった。

10. 高血圧症と妊孕性

—受精機構における ACE2 の機能解析—

近年、妊娠希望時の年齢の上昇により、降圧剤の服用と妊孕性減弱の関連が指摘されている。レニン-アンジオテンシン (RAS) 系では、ACE と ACE2 が拮抗的に働き、血圧調整に関与することが広く知られている。一方、ACE は、精巣および精子で発現し、ACE ノックアウト (KO) マウスは、精子-卵透明帯結合能不全と精子の輸卵管への到達障害による雄性不妊になることから、受精機構においても重要な働きがあることが示されている。2000 年に ACE のホモログとして同定された ACE2 は、ACE とアミノ酸レベルで 40% 一致し、61% は類似した構造を有している。RAS 系において、ACE2 は ACE と拮抗的に働いていることから、ACE と同様に妊孕性に重要な機能があると考え、体外受精や精子-卵透明帯結合能、卵細胞質融合能を検討し、受精過程における ACE2 の機能解析を行った。

ラット CC10 プロモーター制御下にヒト ACE2 を発現するトランスジェニック

マウス (hACE2 Tg マウス) を樹立したところ、#16 系統の産仔数は正常の半分以下である 3 匹前後であった。さらに、体外受精率、精子-卵透明帯結合能も有意に低下していた。しかし、精子-卵細胞質融合能に、差はみられなかった。精子-卵細胞質融合能に差が見られなかったことから、hACE2 Tg マウスの体外受精率低下は、精子-卵透明帯結合の低下が原因であると考えられた。hACE2 Tg マウスの体外受精率および精子-卵透明帯結合能の低下が、ACE2 特異的である事を確認するために、ACE2 の特異的阻害剤である DX600 と ACE2 KO マウスを用い解析を行った。DX600 処理により、hACE2 Tg マウス精子の精子-透明帯結合能は、正常マウスとほぼ同等に回復した。さらに、ACE2 KO マウス精子では、精子-卵透明帯結合能が著しく上昇していた。ACE2 はマウス精巢上体で、頭部から尾部へ成熟が進むにつれ発現が増加しており、特

に成熟精子先体膜上に強く発現していた。以上の結果から、ACE2 は受精機構、特に精子-卵透明帯結合に重要な役割を果たしており、ACE2 が高発現すると精子-卵透明帯結合が抑制され、ACE2 の機能が阻害されると精子-卵透明帯結合が促進することから、ACE2 は精子-卵透明帯結合において、負の制御を行う重要な分子である事が示された。

今後は、ヒト精子における ACE2 の発現解析および精子-透明帯結合能を検証するとともに、ACE2 遺伝子改変マウスおよび ACE2 阻害剤を用いて、精子における ACE2 の標的分子の同定し、新たな受精機構メカニズムを解明する予定である

1 1 . 健康危機情報

特記すべき事項なし

Ⅱ . 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

生殖医学における加齢の現状と診断法

研究代表者 齊藤 英和 国立成育医療センター不妊診療科医長
研究協力者 高橋 祐司 国立成育医療センター不妊診療科研究員

研究要旨

本研究では、生殖細胞が酸化ストレスの影響をどのように受けているか詳細に明らかにするため、ヒト顆粒膜細胞を中心にストレスキナーゼの一つである p38MAPK の活性化および動態の検討を行った。p38MAPK は、より高齢の患者ほど強く活性化していることが明らかとなり、顆粒膜細胞株においても過酸化水素水刺激により同様の変化が確認された。また、細胞内における p38MAPK の局在は若いほど核に局在している比率が多く、老化にしたがい細胞質での発現が確認された。さらに顆粒膜細胞腫を用いて酸化ストレス、FSH、TNF- α の刺激後 p38MAPK の局在変化を確認したところ、それぞれ異なる局在変化を示し、老化による顆粒膜細胞における p38MAPK のリン酸化亢進および局在変化は酸化ストレスによるものであることが強く示唆された。

A. 研究目的

加齢に伴う生殖能力の低下は古くから知られてきた。特に、卵子の老化は30代後半から急速に進行すると考えられており、女性の晩婚化は生殖機能にとって大きなリスクとなる。

卵子は胎児卵巣で増殖した後、思春期まで活動を停止し、その後非増殖的かつ定期的に排卵を繰り返すため、卵巣内における貯蔵卵子数は年齢とともに減少する (de Bruin et al., 2004)。また、排卵過程において卵巣で酸化ストレスの源である活性酸素を産生することが報告されており (Agarwal et al., 2005)、排卵回数を重ねるに従い貯蔵された卵子もストレスを受け、卵子の機能が低下する可能性が考えられる。実際、我々はストレス遺伝子の一つである GSTT1 が老化顆粒膜細胞において発現亢進していることをすでに報告している (Ito et al., 2008)。

本研究では、卵子が酸化ストレスの影響をどのように受けているか詳細に明らかにするため、顆粒膜細胞を中心にストレスキナーゼの一つである p38MAPK

の活性化および動態を明らかにした。

B. 研究方法

(1) 試料の作製

生殖補助医療を受けた不妊患者の医療副産物である顆粒膜細胞を、phosphatase inhibitor cocktail および protease inhibitor cocktail を添加した TBS で3回洗浄し、一部は遠心により上清を除去して-80°Cに保存した。また、一部はTBSによる洗浄後、4%ホルムアルデヒドで固定した。

(2) 細胞培養

ヒト顆粒膜細胞腫様細胞株 KGN を DMEM/F12 + 10% FBS で培養し、老化モデルとして 200 μ M H₂O₂ による酸化ストレス負荷を24時間行った。また、その他のストレス負荷モデルとして、1 IU/ml FSH または 10 ng/ml TNF- α を添加し、同様に24時間培養を行った。これらの細胞の一部は遠心により上清を除去して-80°Cに保存した。また、一部はTBSによる洗浄後、4%ホルムアルデヒドで固定した。

(3) 免疫染色

ホルムアルデヒド固定標本を 100%ブロックエースでブロッキングした後、1次抗体で染色し、洗浄後 Alexa488 または Cy3 結合 2次抗体で検出した。また同時に、細胞の核を Hoechst33342 で染色した。CCD カメラ装備の倒立蛍光顕微鏡 (Olympus) または共焦点蛍光顕微鏡 (Leica) を用いて、撮影を行った。撮影した写真は MetaMorph 画像解析プログラムを用いて解析を行い、各細胞における蛍光強度および蛍光ヒストグラムの作成による細胞内局在を明らかにした。

(4) ウェスタンブロット解析

phosphatase inhibitor cocktail および protease inhibitor cocktail を添加した TBS + 1% TX100 で -80°C に保存したサンプルを溶解した。また、NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent kit (Thermo Scientific Co) を用いて、細胞質および核タンパク質の分画を行った。Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific Co) を用いて得られた可溶画分の総タンパク質量の測定を行った。

(5) 統計処理

ヒト顆粒膜細胞における p38MAPK リン酸化の年齢による比較を行うため、34歳未満を Younger、36歳以上を Older と分類し、蛍光顕微鏡下で測定した細胞あたりの蛍光強度を t 検定にて解析した ($N = 51$)。また、リン酸化 p38MAPK の核局在は、視野内の存在する細胞のうち、核内でクラスターを形成している細胞数を測定してその割合を数値化し、Younger と Older 群の比較を t 検定で解析した。また、KGN 細胞においても同様の測定を行い、同じく t 検定により比較解析を行った。さらに、様々な処理を行った KGN の群間比較には ANOVA 解析を行った。

(6) 倫理面への配慮

本研究の遂行にあたり、患者のプラ

イバシーには十分に配慮し、個人情報の保護を遵守した。

C. 研究結果

(1) 顆粒膜細胞における p38MAPK のリン酸化

本研究では、ヒト顆粒膜細胞における p38MAPK の活性について解析を行った。予想通り、p38MAPK は Younger 群と比較して Older 群でリン酸化が強く亢進していることが明らかとなった (Fig 1A: 免疫染色; Fig 1B: ウェスタンブロット解析)。同じ患者の顆粒膜細胞で、老化マーカーである GSTT1 の発現は同様に亢進しており、p38MAPK のリン酸化亢進は老化による変化であると推察された (Fig 1C)。

次に、顆粒膜細胞株 KGN に老化の原因とされる酸化ストレス (過酸化水素水 $200\ \mu\text{M}$ 、24h) を負荷して p38MAPK のリン酸化を検証した。ヒト顆粒膜細胞で確認されたことと同様に KGN 細胞においても酸化ストレスの負荷により p38MAPK のリン酸化の著しい亢進が確認された (Fig 2A: 過酸化水素水刺激をした KGN 細胞におけるリン酸化 p38MAPK の免疫染色; Fig 2B: 過酸化水素水刺激をした KGN 細胞における GSTT1 の免疫染色)。したがって、顆粒膜細胞においても他の細胞種と同様に老化による p38MAPK の亢進が認められることが明らかとなった。

(2) p38MAPK の細胞内局在

p38MAPK はシグナル伝達分子であり、細胞質内と核内を行き来することが知られている。しかしながら、老化によるリン酸化 p38 の局在を明らかにした報告はない。そこで、老化顆粒膜細胞におけるリン酸化 p38 の局在を詳細に検討した。リン酸化 p38 は若い顆粒膜細胞では比較的多くの細胞で核局在が観察されるのに対して、老化顆粒膜細胞では核局在している細胞の比率が低下し、主に細胞質でリン酸化していることが明らか

となった (Fig 3A: リン酸化 p38MAPK の細胞内局在の免疫染色 ; Fig 3B: p38MAPK の核局在の拡大画像 ; Fig 3C: 視野における全細胞に対する p38 核局在細胞の比率)。

(3) p38MAPK 局在変化を誘導する外的要因

p38MAPK は炎症や細胞増殖、アポトーシスなど様々な現象に関与している。顆粒膜細胞においても FSH シグナルに p38MAPK が関与していることがすでに報告されており、p38MAPK の局在変化が酸化ストレス以外の刺激に対する反応である可能性も否定できない。そこで、生殖細胞に作用することが知られている FSH および TNF- α による p38MAPK の活性化と局在の変化について KGN 細胞を用いて検討を行った。予想されるように、p38MAPK は過酸化水素水、FSH、TNF- α のすべての刺激に対して活性化していることが明らかとなった。また、これらの活性化は活性酸素の捕拉剤である N-acetylcysteine や p38MAPK 阻害剤である SB203580 によって抑制されるが、それぞれの刺激に対して抑制効果は異なることが明らかとなった (Fig 4A: 示された刺激を添加した KGN 細胞における p38MAPK リン酸化の蛍光強度)。

これらの細胞におけるリン酸化 p38MAPK の局在変化について比較したところ、過酸化水素水および TNF- α では細胞質でのリン酸化が強く亢進しているのに対して、FSH では細胞質と核の両方でリン酸化が亢進していることが明らかとなった。過酸化水素水刺激では N-acetylcysteine や SB203580 により p38MAPK の局在変化が抑制されるのに対して、FSH では N-acetylcysteine による抑制効果が見られず、また TNF- α では SB203580 による抑制効果が部分的になるなど、過酸化水素水刺激によるものとは異なる変化が誘導された (Fig 4B: KGN 細胞におけるリン酸化 p38MAPK

の核局在比率)。

D. 考察

p38MAPK は炎症やアポトーシス、老化、細胞増殖など、非常に多くの生命活動と関わっていることが知られてきた。本研究では生殖細胞の老化度を見きわめる上で、ストレスシグナルは有効な検査項目となることが推測された。実際、本研究で得られた結果から、p38MAPK のリン酸化は老化により著しく亢進しており、他の臓器や細胞での報告と一致している。老化の大きな原因が酸化ストレスであることはコンセンサスとなっており、生殖細胞においてもこの仮説を裏付ける結果が得られたと思われる。

これまで、加齢により p38MAPK のリン酸化が亢進することは報告されてきたが、加齢による p38MAPK の局在変化を観察した事例はなく、非常に興味深いデータであった。本研究では、p38MAPK の加齢変化がどのようなメカニズムで生じているか明らかにすることは出来なかったが、若い個体の顆粒膜細胞では、p38MAPK は卵成熟や排卵過程に必要な情報伝達物質として核内で様々な遺伝子の転写を促進しているが、老化個体では細胞外に存在する酸化ストレス発生源が核内で働く p38MAPK を細胞質に移動させて、ストレスシグナル伝達分子へと変化させている可能性が考えられる。実際に、KGN 細胞に対する過酸化水素水刺激では核局在率が著しく低下し、N-acetylcysteine や SB203580 でその変化が抑制されることも、この考えを支持していると考えられる。一方、FSH では核と細胞質の両方でリン酸化が亢進していたことから、酸化ストレスとは異なり、ホルモン産生シグナルの下流分子として機能するための細胞内動態であると思われる。また、TNF- α 刺激による核局在率低下が SB203580 によって部分的にしか抑制されないことは、TNF- α 刺激に関わる p38MAPK の isoform が老

化とは異なる可能性が考えられる。

E. 結論

本研究から、顆粒膜細胞は老化により酸化ストレスを主因としたストレスを受け、p38MAPK シグナルの伝達経路を変化させていることが示された。これは、生物学的に非常に重要な意味を持つものと考えられる。臨床的には、p38MAPK の局在変化を指標とした生殖細胞の老化検査に応用することが想定される。

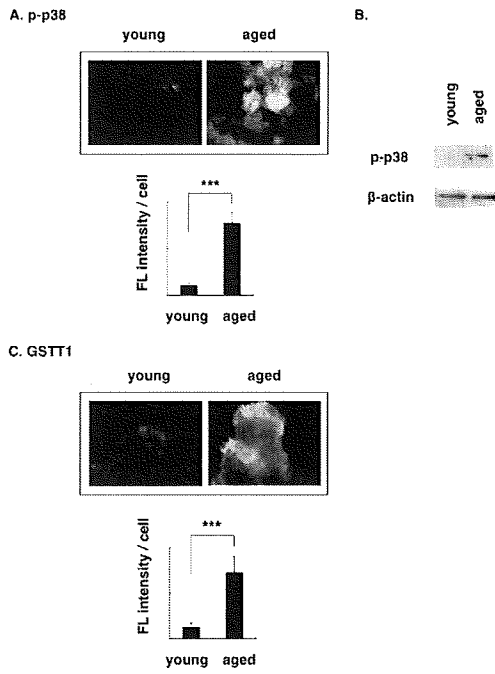
F. 研究発表

投稿中

G. 知的財産権

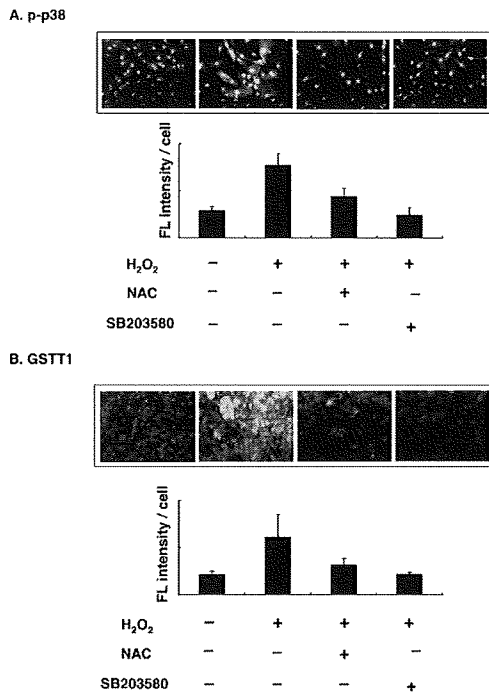
特になし

Fig. 1



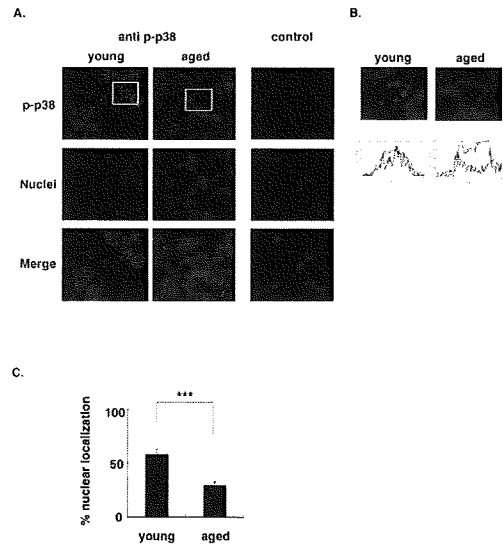
Green: リン酸化 p38MAPK
Blue: 核
Western blot には細胞質画分を使用

Fig. 2



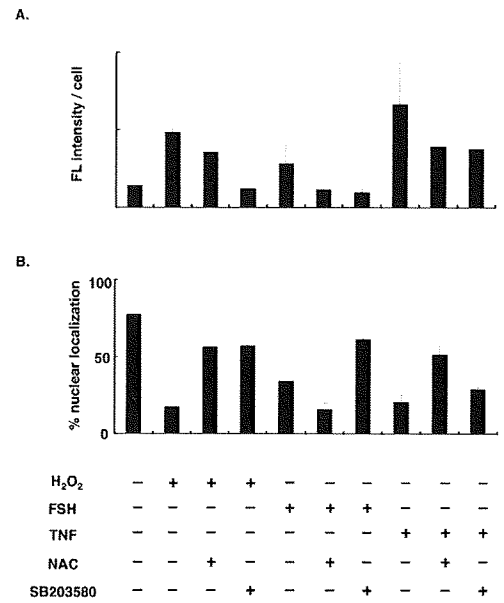
Green: リン酸化 p38MAPK
Blue: 核

Fig. 3



Red: リン酸化 p38MAPK
Blue: 核
核内に蛍光のピークが存在するものを核局在と判定した

Fig. 4



KGN 細胞を蛍光染色し、蛍光強度および核局在率を解析した