

の事実は一連の寄与に mtDNA が関わる可能性を示唆したといえる。我々の研究においては 4,977bp deletion、T8993G 点変異は検出されなかったことからこれ以外の多様な変異の存在も考えられる。今後の網羅的な検討が期待される。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

佐藤 卓, 末岡 浩, 中林 章, 青木大輔, 吉村泰典: 迅速・簡便に網羅的コピー数解析を可能とする全ゲノム増幅を用いた着床前診断法(シンポジウム). “第 19 回日本サイトメトリー学会”. 松江テルサ(松江市)(2009.6.20-21)

**Kou Sueoka:** Embryo freezing followed by preimplantation genetic diagnosis is efficient for pregnancy outcome (シンポジウム). “第 36 回日本低温医学会総会”. 山上会館(東京都)(2009.11.27-29)

佐藤 卓, 末岡 浩, 高橋香織, 櫻井友義, 村越行高, 渡邊広是, 田島博人, 中林 章, 大澤淑子, 橋場剛士, 青木大輔, 吉村泰典  
全ゲノム増幅による, 新たな着床前遺伝子診断法の開発. “第 61 回日本産科婦人科学会総会”. (2009.4.3-5)

村越行高, 末岡 浩, 佐藤 卓, 櫻井友義, 渡邊広是, 田島博人, 中林 章, 橋場剛士, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典

卵子, 顆粒膜細胞のミトコンドリア DNA copy 数・変異が受精能・胚発生能へ及ぼす影響. “第 50 回日本哺乳動物卵子学

会”. (2009.5.8-9)

村越行高, 末岡 浩, 高橋香織, 佐藤 卓, 櫻井友義, 渡邊広是, 田島博人, 佐藤健二, 中林 章, 橋場剛士, 久慈直昭, 吉村泰典  
卵子, 顆粒膜細胞におけるミトコンドリア DNA が受精能・胚発生能へ及ぼす影響. “第 27 回日本受精着床学会学術講演会”. (2009.8.6-7)

佐藤 卓, 末岡 浩, 櫻井友義, 中林 章, 高橋香織, 村越行高, 渡邊広是, 田島博人, 佐藤健二, 大澤淑子, 橋場剛士, 吉村泰典

Whole genome amplification と MLPA 法を組み合わせた, 着床前期胚におけるゲノムワイドな新しいコピー数解析法の開発. “第 27 回日本受精着床学会学術講演会”. (2009.8.6-7)

末岡 浩, 佐藤 卓, 中林 章, 櫻井友義, 村越行高, 渡邊広是, 大澤淑子, 田島博人, 橋場剛士, 加藤真吾, 吉村泰典

副腎白質ジストロフィーの着床前遺伝子診断の実施報告. “第 27 回日本受精着床学会学術講演会”. (2009.8.6-7)

末岡 浩, 佐藤 卓, 中林 章, 高橋香織, 櫻井友義, 渡邊広是, 橋場剛士, 吉村泰典

着床前診断における適応基準の問題点—phenotype が変動的である疾患の取り扱い. “日本人類遺伝学会 第 54 回大会”. (2009.9.23-26)

中林 章, 末岡 浩, 高橋香織, 佐藤 卓, 櫻井友義, 村越行高, 渡邊広是, 田島博人, 佐藤健二, 吉村泰典

着床前診断における割球生検後の凍結胚の viability と有用性. “日本人類遺伝学会 第 54 回大会”. (2009.9.23-26)

佐藤 卓, 末岡 浩, 中林 章,  
櫻井友義, 渡邊広是, 佐藤健二,  
大澤淑子, 村越行高, 高橋香織,  
田島博人, 橋場剛士, 吉村泰典

Whole genome amplification 法と  
MLPA 法を組み合わせた, dystrophine  
遺伝子の全 exon 網羅的欠失・重複診断  
を主眼とする着床前診断法の開発. “第  
54 回日本生殖医学会”. (2009. 11.22  
-23)

村越行高, 末岡 浩, 高橋香織,  
佐藤 卓, 櫻井友義, 渡邊広是,  
田島博人, 佐藤健二, 中林 章,  
大澤淑子, 橋場剛士, 久慈直昭,  
吉村泰典

卵子ミトコンドリア DNA copy 数が受精  
能・胚発生能へ与える影響. “第 54 回日  
本生殖医学会”. (2009. 11.22-23)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

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

研究分担者 檜原 久司 大分大学医学部 産科婦人科 教授

研究要旨

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 を抽出した（組織採取続行中）。現在、得られた mRNA を用いて cDNA microarray により apoptosis 関連遺伝子発現異常の網羅的解析を行っている。

A. 研究目的

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)。

子宮内膜症の病態における apoptosis の関与の詳細を明らかにするため、子宮内膜症の組織または培養間質細胞において cDNA microarray により網羅的解析を行う。

B. 研究方法

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・培養した。

（倫理面への配慮）

本事業の内容を含む一連の研究は、平成 16 年 6 月に大分大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会の審査に基づく許可を受けている。また、患者より文書による同意を得ている。

C. 研究結果

現在、組織採取および抽出を継続中であるが、採取した組織から上記の genomic DNA、messenger RNA (mRNA) および蛋白を抽出した。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。分離・培養した正常子宮内膜と子宮内膜症の細胞が間質細胞であることを immunocytochemical staining により確認した。

D. 考察

現在は、特に考察できるほどの研究結果が得られていないが、組織の採取および培養の過程は順調であり、解析に至るための十分なサンプルが得られつつある

と考えられる。

**E. 結論**

上記の研究目的、研究方法に沿って、特に問題なく研究計画を進めている。

**F. 研究発表**

- 1. 論文発表 該当なし

- 2. 学会発表 該当なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)**

- 1. 特許取得 該当なし
- 2. 実用新案登録 該当なし
- 3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者 大須賀 穰 東京大学医学部 産科婦人科学 講師

研究要旨

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、我々は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た。本研究では、まず、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示した。また、培養系にて炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , 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 $\alpha$ とIL-17Aが相乗作用を持つことを示した。また、これらの作用が各種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、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。従来の炎症抑制、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適応される他に、CCL20/CCR6をターゲットとする治療戦略の可能性が提示された。

A. 研究目的

ライフスタイルの変化に伴い結婚年齢、出産年齢が高齢化している。このため、妊娠希望時には生殖年齢に好発する各種疾患を罹患している女性が少なくない。特に、子宮内膜症は子宮筋腫と同様に生殖年齢の女性に高頻度に発症し、全国で10万人以上の患者が通院しているとされている。子宮内膜症は解剖学的ならびに生化学的な機序により妊孕性を減弱させることが知られており、不妊症の代表的な原因でもある。よって、子宮内膜症を予防・治療することが、本邦における挙児希望年齢の女性の妊孕性を向上することに寄与すると考えられる。しかしながら、子宮内膜症は謎の疾患とも言われ

ており、その発症・進展機序については不明な部分が多く、免疫・遺伝・環境など種々の要因が関与していると言われている。子宮内膜症の発症としていわゆる逆流月経血移植説が広く信じられているが、ほとんどの女性に認められる逆流血中の子宮内膜組織が何故一部の女性にのみ生着・増殖するのかが大きな問題となっている。このことより子宮内膜症では局所において子宮内膜の移植を受け入れやすくする免疫学的寛容が機能していると推測されている。同時に、子宮内膜症は慢性炎症性疾患としての性格も備えており、局所での免疫学的反応は炎症を介して子宮内膜症の進展を促進すると考えられている。我々はこれまで子宮内膜症

組織において Th 細胞系の反応が子宮内膜症の進展に関係していると考え、なかでも Th2 細胞、Th17 細胞の重要性を示してきた。Th17 細胞については同細胞より特異的に産生される IL-17A が子宮内膜症間質細胞の増殖、cyclooxygenase-2 発現、ならびに IL-8 産生を刺激することを報告している。この際に、子宮内膜症病巣に Th17 細胞が豊富に存在することを認めていたが、その集積機序については不明であった。本研究では、Th17 細胞が子宮内膜症細胞に集積する機序を子宮内膜症の病態と関連させて解析することを目的とした。

## B. 研究方法

(1) 試料として子宮内膜症治療のための腹腔鏡手術を施行した患者より子宮内膜症組織ならびに末梢血を採取して実験に用いた。

(2) 末梢血と子宮内膜症組織より単核球を、子宮内膜症組織より子宮内膜症間質細胞を分離・培養した。

(3) 子宮内膜症組織の一部はパラフィン固定の後、免疫染色実験に供した。ケモカインリガンドである CCR6 とこれに対応するケモカインの CCL20 を染色した。

(4) CCL20 の Th17 細胞に対する遊走刺激活性を見るために、分離した末梢血単球を Transwell の上層に添加した。下層に遊走した細胞を PMA と ionomycin で刺激後に CD3、CD4、IL-17A に対する抗体で染色し、FACS で解析した。

(5) 子宮内膜症間質培養系に IL-1 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、IL-17A を添加して、24 時間培養し、上清の CCL20 濃度を ELISA キットにより測定した。

(6) 上記の実験に際し、SB202190 (p42/44MAPK 阻害剤)、PD98059 (p38MAPK 阻害剤)、SP600125 (SAPK/JNK 阻害剤) を添加して、同様に CCL20 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

研究は本施設の倫理委員会の承認をうけ、患者検体を使う場合は本人より書面によ

るインフォームドコンセントを得て行った。

## C. 研究結果

(1) 子宮内膜症組織から分離された Th17 細胞のうち 97.6 $\pm$ 3.1% に CCR6 の発現が認められた。また、CCR6 陽性 Th 細胞のうち 14.7 $\pm$ 5.1% が Th17 細胞であった。

(2) CCL20 免疫陽性細胞は病巣の上皮細胞と上皮直下の間質細胞に認められた。一部の CCL20 陽性細胞は上皮から離れた線維性間質に存在した。一方、CCR6 陽性細胞は上皮直下の間質に局在していた。これらの細胞は円形で骨髄由来と考えられた。

(3) CCL20 の末梢血 T 細胞に対する遊走促進活性は Transwell system を用いて測定された。CCL20 は CD4 陽性細胞の遊走インデックスを約 4 倍にしたが、有意差には至らなかった。CCL20 は Th17 細胞については遊走インデックスを 18.2 倍と有意に増加させた。このことから、CCL20 は特異的に Th17 細胞の遊走を刺激していることが確認された。

(4) 子宮内膜症間質細胞の培養系において、IL-1 $\alpha$  は 1ng/ml 以上、TNF $\alpha$  は 0.1ng/ml 以上、IL-17A

は 1ng/ml 以上で CCL20 の分泌を増加させた。これらの CCL20 増加作用は p42/44MAPK、p38MAPK、SAPK/JNK の阻害剤の添加により抑制された。

(5) TNF $\alpha$  と IL-17A の同時添加は各々の単独投与に比べて相乗的に CCL20 の分泌を促進した。

## D. 考察

本研究により、Th17 細胞が子宮内膜症組織で CCR6 を発現していることが明らかとなり、CCR6 とそのリガンドである CCL20 が子宮内膜症組織の同様な部位に局在していることが明らかにされた。CCL20 は子宮内膜症患者の末梢血中 Th17 の遊走を特異的に促進した。また、子宮内膜症間質細胞からの CCL20 分泌

が IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-17A という炎症性サイトカインにより促進されることが示され、これらの作用は各種 MAP キナーゼ阻害薬により抑制された。上記の所見より Th17 細胞が子宮内膜症組織に局在していることが説明しえる。すなわち、子宮内膜症組織、特に、間質細胞で産生される CCL20 が作用して、CCR6 を発現している Th17 細胞を病巣局所へと移動を誘導すると考えられる。子宮内膜症は、慢性炎症性疾患であり、局所において上記の炎症性サイトカインの産生が亢進していることが知られている。よって、免疫染色でも認められた病巣局所での CCL20 発現にはこれらの炎症性サイトカインによる刺激が関与していると考えられ、培養実験でみられた結果とよく一致する。なかでも興味深いのは、IL-17A によっても CCL20 産生が促進されることであり、このことから、子宮内膜症への Th17 細胞遊走にはいわゆるポジティブフィードバック機構も存在していると考えられる。一方、TNF $\alpha$  と IL-17A が相乗作用を示したことは、子宮内膜症の治療を考えると、いずれか一方を阻害することにより病気の進行を著しく阻止できる可能性を示唆している。また、各種 MAP キナーゼ阻害剤が炎症性サイトカインによる CCL20 産生を阻害したことも治療の観点から興味深い所見であり、我々が以前に報告した子宮内膜症モデルマウスにおける p38MAP キナーゼ阻害剤による病巣抑制効果との関連が推測される。

#### E. 結論

子宮内膜症病巣への Th17 細胞の集積は子宮内膜症間質細胞が炎症性刺激により CCL20 を産生することにより Th17 細胞の発現する CCR6 に作用して促進されると考えられた。炎症抑制とともに、CCL20/CCR6 をターゲットとした治療は今後の子宮内膜症治療の一つとなり得る可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Wada-Hiraike O, Yamamoto N, Osuga Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y: Aberrant implantation and growth of uterine leiomyoma in the abdominal wall after laparoscopically assisted myomectomy, *Fertil Steril* 2009, 92:1747
- 2) Takamura M, Koga K, Osuga Y, Takemura Y, Hamasaki K, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y: Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision, *Hum Reprod* 2009, 24:3042-3048
- 3) Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y: Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells, *Fertil Steril* 2009, 92:1794-1798
- 4) Fu L, Osuga Y, Yano T, Takemura Y, Morimoto C, Hirota Y, Schally AV, Taketani Y: Expression and possible implication of growth hormone-releasing hormone receptor splice variant 1 in endometriosis, *Fertil Steril* 2009, 92:47-53
- 5) Kodama A, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, Takamura M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Takemura Y, Yano T, Taketani Y: Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells, *Hum Reprod* (in press)
- 6) Koga K, Hiroi H, Osuga Y, Nagai M, Yano T, Taketani Y: Autoamputated adnexa presents as a peritoneal loose body, *Fertil Steril* (in press)
- 7) Ouyang Z, Osuga Y, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani

Y: Interleukin-4 induces expression of eotaxin in endometriotic stromal cells, Fertil Steril (in press)

8) Koga K, Osuga Y, Tajima T, Hirota Y, Igarashi T, Fujii T, Yano T, Taketani Y: Elevated serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole, Fertil Steril (in press)

9) Koizumi M, Momoeda M, Hiroi H, Hosokawa Y, Tsutsumi R, Osuga Y, Yano T, Taketani Y: Expression and regulation of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human endometrium, Fertil Steril (in press)

10) Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y: Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells, Fertil Steril (in press)

## 2. 学会発表

小泉美奈子, 廣井久彦, 藤本晃久, 清木孝之, 大井なぎさ, 大須賀穰, 百枝幹雄, 矢野哲, 武谷雄二; 体外受精後にPIDを発症した2症例; 第54回日本生殖医学会

堤亮, 藤本晃久, 竹村由里, 小泉美奈子, 渡辺裕子, 大井なぎさ, 田中慧, 張士青, 廣井久彦, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二; ART妊娠と一般不妊妊娠の周産期予後の検討; 第54回日本生殖医学会

竹村由里, 藤本晃久, 堤亮, 大井なぎさ, 小泉美奈子, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二; ART妊娠における前置胎盤のリスクについての検討; 第54回日本生殖医学会  
高村将司, 甲賀かをり, 児玉亜子, 濱崎かほり, 田島敏樹, 長谷川亜希子, 竹村由里, 原田美由紀, 森本千恵子, 平田哲也, 廣田泰, 吉野修, 大須賀穰, 武谷雄二; 低用量ピルは腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術の術後再発を低下させる; 第54回日本生殖医学会

大須賀穰; 婦人科がんの妊孕性温存治療

子宮内膜症の妊孕性温存治療; 第54回日本生殖医学会

児玉亜子, 大須賀穰, 吉野修, 泉玄太郎, 高村将司, 長谷川亜希子, 竹村由里, 原田美由紀, 平田哲也, 廣田泰, 甲賀かをり, 矢野哲, 武谷雄二; TGF $\beta$ は子宮内膜症細胞においてPAR2の発現・機能を促進する; 第14回生殖内分泌学会

鶴賀哲史, 有本貴英, 富尾賢介, 川名敬, 中川俊介, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二; Planned treatment delayにより生児を得た子宮頸部浸潤癌合併妊娠の一例; 第118回日本産科婦人科学会関東連合地方部会

山本直子, 甲賀かをり, 藤本晃久, 丸山正統, 稲生信一, 赤羽正章, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二; 子宮動脈バルーン留置併用子宮全摘術にて治療し得た子宮動脈奇形の一例; 第118回日本産科婦人科学会関東連合地方部会

鶴賀哲史, 川名敬, 織田克利, 有本貴英, 土谷聡, 清木孝之, 中川俊介, 八杉利治, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二; 卵巣癌明細胞腺癌I・II期の予後因子の検討 子宮内膜症との関連から; 第47回日本癌治療学会

永井美和子, 甲賀かをり, 平田哲也, 平池修, 藤本晃久, 廣井久彦, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二, 福嶋敬宜; 診断的腹腔鏡検査で左付属器欠損と腹腔内遊離体を発見した一例; 第117回日本産科婦人科学会関東連合地方部会

森住佑子, 齋藤真由子, 松本陽子, 有本貴英, 砂川空広, 川名敬, 織田克利, 中川俊介, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二; Pseudo-Meigs症候群を合併した骨盤内腫瘍の2例; 第117回日本産科婦人科学会関東連合地方部会

平田哲也, 大須賀穰, 高村将司, 児玉亜子, 甲賀かをり, 吉野修, 原田美由紀, 竹村由里, 長谷川亜希子, 田島敏樹, 矢野哲, 武谷雄二; 子宮内膜症間質細胞(ESC)におけるIL-17Fの作用について; 第61回日本産科婦人科学会



長谷川亜希子, 大須賀穰, 広田泰, 濱崎かほり, 児玉亜子, 原田美由紀, 竹村由里, 平田哲也, 森本千恵子, 吉野修, 矢野哲, 武谷雄二; Tunicamycin(TM)は子宮内膜症間質細胞における TRAIL 誘導性アポトーシスを特異的に増強する; 第 61 回日本産科婦人科学会

児玉亜子, 大須賀穰, 吉野修, 長谷川亜希子, 高村将司, 原田美由紀, 平田哲也, 濱崎かほり, 矢野哲, 武谷雄二; ヒト子宮内膜における BMP-7 の発現および機能に関する検討; 第 61 回日本産科婦人科学会

15) 吉野修, 長谷川亜希子, 大須賀穰, 武谷雄二, 西井修; ヒアルロン酸の子宮内膜症への治療効果に関する基礎的検討; 第 61 回日本産科婦人科学会

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

加齢・多嚢胞性卵巣症候群に関する研究

研究分担者 藤井順逸 山形大学大学院医系研究科 教授

研究要旨

SOD1 を欠損することで活性酸素感受性が増した灰は、空気中の酸素濃度で培養すると参加障害を受け発生異常を起こす。2細胞までは発生停止し、4細胞以降は細胞死に至る違いの原因は、この時期の胚細胞に起る代謝の変化に関係している

A. 研究目的

酸化ストレスは、加齢・子宮内膜症・多嚢胞性卵巣症候群でも妊孕性低下の原因の一つと指摘されている。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、原因となる活性酸素の生成を抑える、生じた活性酸素を除去する、酸化によって生じた有害物質を無毒化する、といった酸化的傷害の各段階での対策が必要である。活性酸素の除去や、有害な物質を無毒化するための薬剤やサプリメントの開発が盛んに行われており、実用化されている化合物もある。しかし酸化が起ってからその対処を行うのでは根本的な解決とはならない。また従来有害な側面ばかりが強調されて来た活性酸素であるが、近年はその有用な側面、とりわけ細胞内情報伝達系における役割が明らかにされつつある。過剰な抗酸化剤の投与はこうした活性酸素の生理機能にも影響を与えることで、副作用をもたらす危険性が指摘されている。従って、

これまでのように活性酸素はただ減らせば済むものではなく、有用な機能は温存しつつ、有害な作用のみを抑える事が重要であると認識されるようになった。そのためには、活性酸素が作用し傷害する分子ならびに生理作用を正確に理解する事が求められる。我々はこれまでに、superoxide dismutase-1欠損 (SOD1-KO) マウスを用いた解析から、SOD1-KO胚は2細胞までに空気中の酸素濃度(20%)でも酸化ストレスとなることを見いだした。その結果、2細胞での発生停止と4細胞以降は細胞死を起こす事を明らかにした。このように、SOD1-KO胚は健康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弱な量の活性酸素種に対しても鋭敏な応答を示す事から、活性酸素による胚の発生障害の機構を解析するためのよいモデル系と考えられる。

本研究では、この発生時期に依存した活性酸素による傷害に関わる

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各種疾患の発症との関連を解明する。一方NADPHは、抗酸化・酸化還元（レドックス）系に必要な還元当量を与える事で活性酸素ならびに酸化産物の還元解毒化に働く。そこでNADPHの供給を担うペントースリン酸経路の妊孕性における重要性を知るために、ペントースリン酸経路を律速する酵素であるグルコース6-リン酸脱水素酵素(G6PD)を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製する。その卵巣機能や胚の発生過程について解析する事で、NADPHが担うレドックス系の果たす役割を明らかにする。

## B. 研究方法

### 1. SOD1欠損胚を用いた酸化ストレスによる傷害機構の解析

1) SOD1欠損胚が2細胞停止する理由として、ミトコンドリアの機能が低下し、エネルギー供給の不足が生じた可能性が考えられる。そこで、ミトコンドリア機能を評価するために、個々の胚による酸素呼吸量をScanning Electrochemical Microscope(SECM)で、ATP含量をルシフェラーゼ法で、膜電位を蛍光プローブのJC-1を用いて測定した。

2) 細胞分裂が停止した原因を明らかに、するために、RT-PCRによりCdkインヒビター遺伝子(p16, p19, p21, p27)の発現を解析した。

3) SOD1欠損4細胞胚を通常酸素に曝し、細胞死を起こした胚がアポ

トーシス・ネクロシス・その他の細胞死のいずれによって死ぬのか、DNA結合色素(Propidium Iodide, Hoechst33342)とFITC標識Annexin Vを用いて検討した。

### 2. ペントースリン酸経路の、卵巣機能と胚発生における役割の解明

ペントースリン酸経路に由来するNADPHが担う役割を明らかにするために、NADPH産生を行い反応を律速するG6PDを発現するhG6PDトランスジェニックマウス(図1)の作製を行った。今回はCre-loxP系を用いることで誘導性にG6PDを発現するマウスを作製する。

## C. 研究結果

### 1. SOD1欠損胚を用いた酸化ストレスによる傷害機構の解析

1) 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た。この発生停止は、各種還元剤や抗酸化剤を培地に加えても解除されなかったが、1%酸素で培養すると解除され、ほぼ正常に発生した(表I)。そこで、20%と1%酸素下に培養する事で、SOD1欠損と野生型マウスの胚でスーパーオキシドの生成に違いがあるか調べた。その結果、スーパーオキシド生成量は1%酸素培養では違いが認められなかったが、20%酸素培養ではSOD1欠損胚の方が多かった(図2)。したがって、SOD1を欠損するために、呼吸により過剰に生じた活性酸素

が酸化ストレスとなって傷害したと考えられた。これまでの報告によると、こうした酸化ストレスによる発生障害の多くに、ミトコンドリア傷害が関係すると説明されていたため、ミトコンドリアの機能として酸素消費・ATP含量・膜電位を測定した。その結果、発生停止胚でもこうしたミトコンドリアの機能はほぼ正常に維持されていることが明らかになった(図3)。

2) 細胞分裂が停止した原因としては、Cdk/サイクリンの機能傷害と Cdk インヒ

ビターの異常発現が考えられる。今回はRT-PCRによりCdkインヒビター遺伝子(p16, p19, p21, p27)の発現を解析する事で、その関与について検討した。その結果、SOD1欠損胚を20%酸素で培養した場合に、p16の発現が特に亢進していた。

3) 発生障害によって細胞死に至る場合に、どのような細胞死の過程を経るかについて知る事は、活性酸素によって傷害される分子機構について知る手がかりとなる。そこで、SOD1欠損4細胞胚を通常酸素に曝し細胞死を起こした胚が、アポトーシス・ネクローシス・その他の細胞死のいずれによって死ぬのか検討したところ、少なくともその初期の段階ではアポトーシスが起ることが分った(図4)。

2. ペントースリン酸経路の卵巣機能と胚発生への役割の解明

胚発生におけるペントースリン酸経路活性の役割を調べるために、

律速酵素であるG6PDを誘導性に発現するトランスジェニックマウスを作製した。恒常的にペントースリン酸経路が活性化した場合はむしろ有害に働く事が知られているため、本マウスの作製に当たっては誘導型プラスミドベクターを用いる事で、Creマウスとの交配によりコンディショナルに誘導する系を用いた。現在は未だCreマウスと交配を行う前に、C57BL/6マウスと戻し交配を行っている。

#### D. 考察

今回のSOD1欠損胚を用いた検討結果は、2細胞までの発生段階と、4細胞以降の発生段階で、酸化ストレスの与える影響が大きく異なる事を示している。したがって、酸化ストレスの影響に関して二つの時期を分けて考える必要がある。

2細胞で発生停止するSOD1欠損胚を、通常(20%)酸素から低(1%)酸素培養に移す事で正常に発生することから、20%酸素に曝される事で生じた活性酸素により胚が酸化傷害を受けたと推定された。これまでの通常胚を用いた検討では、胚外から過酸化水素の投与などにより酸化ストレスを与えて発生過程への影響を解析する事が多かった。その結果ではミトコンドリアが傷害されることから、エネルギー供給不足が起り、それが発生停止をもたらすと結論されていた。しかし、今回のSOD1欠損胚

を用いた検討では、胚外から酸化剤を投与しておらず、呼吸の結果胚細胞内に内因性に生じた活性酸素が発生停止をもたらしたことを示している。ミトコンドリア機能解析の結果、呼吸量や膜電位が正常なことから、エネルギーの不足が直接の原因ではないと考えられる。また分裂停止した胚は2〜3日は呼吸などの生理機能を維持しており、細胞死をもたらす傷害とは異なる機構が働いたことを示唆している。

発生停止した胚は長時間に渡って生存が確認されたので、酸化ストレスにより細胞周期の進行が特異的に阻害された可能性がある。そこで体細胞で解明されている結果も踏まえ、図5に示す細胞周期の調節機構に焦点を置いた、新たな仮説を提唱したい。細胞分裂の進行にはCdkによる細胞分裂機構が活性化されている必要がある。Cdkへのサイクリンの結合に加えて、リン酸化によるCdkの抑制が脱リン酸化されることにより解除される必要がある。Cdc25はその脱リン酸化を担うタンパク質脱リン酸化酵素であり、活性中心のシステインは特に酸化に対して感受性が高く、酸化刺激により容易に活性を失うことが知られている。すなわち、SOD1欠損胚に見られる2細胞停止において、Cdc25の活性中心が活性酸素の標的候補として考えられる。一方、活性型となったサイクリン/CdkにCdkインヒビターが結合すると不活性化し、

細胞分裂の停止をもたらす。今回、Cdkインヒビターの一つで、細胞周期を抑制することで細胞老化に関わる事が知られているp16の発現亢進が認められた。このように、通常体細胞で明らかにされた酸化ストレスによる細胞分裂停止と同じ機構で、胚発生が制御されている可能性がある。今後は、この仮説の妥当性について検証する必要がある。

1%酸素下に4細胞まで発生させたSOD1欠損胚では、20%酸素培養に移す事で、細胞分裂停止ではなく細胞死が誘導された。このように、酸化ストレスによる影響が2細胞までの時期と大きく異なる原因については、胚の発生段階における代謝の違いが関係すると考えられる。マウス胚では4細胞期以降呼吸活性が増し、ミトコンドリアによるATP合成が高まる。それまでは小さく、クリステの発達しない未分化な状態であったミトコンドリアが、この時期から肥大し活発に働くことが知られている。エネルギー代謝に加えて、ミトコンドリアにはアポトーシス誘導ならびに促進に働く分子が集結し、放出されたシトクロムcがアポトーシスの実行に関わるカスパーゼ経路を活性化する。胚に見られるアポトーシス様の細胞死が起る時期とミトコンドリアの発達の時期が重なる事に加えて、こうしたアポトーシスにおけるミトコンドリアの役割を考慮すると、酸化ストレスを受けた4細胞胚に見られる細胞死にミトコンドリアが関

わる可能性が高いと推測される。4細胞でみられた細胞死に、ミトコンドリアがどのように関わるかについて、今後の検討が必要である。

#### E. 結論

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であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kimura N, Tsunoda S, Iuchi Y, Abe H, Totsukawa K, and Fujii J. Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryos from SOD1-deficient mice. *Mol Hum Reprod*, in press, 2010.
- 2) Iuchi Y, Kibe N, Tsunoda S, Suzuki S, Mikami T, Okada F, Uchida K, Fujii J. Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia in the NZB mice. *Free Radic Biol Med*, in press, 2010.
- 3) Ikeda Y, Ito R, Ihara H, Okada T, and Fujii J. Expression of N-terminally truncated forms of rat peroxiredoxin-4 in insect cells. in press, 2010.

- 4) Shibasaki T, Iuchi Y, Okada F, Kuwata K, Yamanobe T, Bannai S, Tomita Y, Sato H, Fujii J. Aggravation of ischemia-reperfusion-triggered acute renal failure in xCT-deficient mice. *Arch Biochem Biophys* 490(1);63-69:2009
- 5) Onuma K, Sato Y, Ogawara S, Shirasawa N, Kobayashi M, Yoshitake J, Yoshimura T, Iigo M, Fujii J, Okada F. Nano-scaled Particles of Titanium Dioxide Convert Benign Mouse Fibrosarcoma Cells into Aggressive Tumor Cells. *Int J Cancer* 175(5);2171- 2183:2009
- 6) Iuchi Y, Okada F, Takamiya R, Kibe N, Tsunoda S, Nakajima O, Toyoda K, Nagae R, Suematsu M, Soga T, Uchida K, Fujii J. Rescue of Anemia and Autoimmune Responses in SOD1-Deficient Mice by Transgenic Expression of Human SOD1 in Erythrocytes. *Biochem J*, 422(2); 313- 320:2009.
- 7) Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, Okabe M, Ikeda Y, Fujii J. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J*, 419(1);149-158:2009.
- 8) Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated

glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 46(4);443-4532:009.

2. 学会発表

1) Fujii J, Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, Okabe M, Ikeda Y. Peroxiredoxin 4 Deficiency Causes Oxidative Stress-Induced Spermatogenic Cell Death. 4th Biennial Meeting of the Society of Free Radical Research, Asia. July 9-12, 2009, Langkawi, Malaysia.

2) Fujii J. Are mitochondria-derived ROS indeed foe to embryogenesis? SFRR International Free Radical School in Japan, Sep.2-6, 2009, Echigo Yuzawa, Japan.

3) 角田智志、木村直子、阿部宏之、戸津川清、藤井順逸:通常培養下のSOD1欠損胚では内因性酸化ストレスがミトコンドリア機能障害を伴わない2細胞期発生停止を引き起こす. 第50回日本哺乳動物卵子学会大会、2009年5月8-9日、東京.

4) 角田智志、木村直子、阿部宏之、井内良仁、戸津川清、藤井順逸: SOD1欠損胚の発生異常における酸化ストレスの関与. 第62回日本酸化ストレス学会、2009年6月11-12日、福岡.

5) 木村直子、佐藤康子、井内良仁、佐藤英世、戸津川清、藤井順逸:体外成熟させたCu,Zn-superoxide dismutase欠損マウス卵でみられる受精障害. 第102回日本繁殖生物学会. 2009年9月9-12日,奈良.

6) 木村直子、猪野友香里、戸津川清、藤井順逸. SOD1欠損老化マウスでみられる排卵数および発育卵胞数の減少. 第112回日本畜産学会. 2010年3月28-30日,東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表I SOD1KOとWTの発生過程への酸素濃度の影響

Oocyte genotype and treatments	No. of oocytes cultured	No. of embryos (%)		
		Two-cell ≤ at Day 1	Four-cell ≤ at Day 2	Blastocyst at Day 4
<b>20% O<sub>2</sub></b>				
WT	89	85 (95.5) <sup>a</sup>	83 (93.3) <sup>a</sup>	75 (84.3) <sup>a</sup>
KO	76	72 (94.7) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>c</sup>
KO + 100 μM β-mercapotoethanol	95	61 (64.2) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>c</sup>
KO + 500 μg/ml hSOD1	91	73 (80.2) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>c</sup>
<b>1% O<sub>2</sub></b>				
WT	79	77 (97.5) <sup>a</sup>	68 (86.1) <sup>a</sup>	53 (67.1) <sup>b</sup>
KO	96	93 (96.9) <sup>a</sup>	81 (84.4) <sup>a</sup>	59 (61.5) <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup> 有意差検定の結果 ( $P < 0.05$ ).

表II 1% 酸素で4細胞まで発生させたSODKOとWT胚の、20% 酸素培養での発生

Oocyte genotype	No. of oocytes cultured	No. of embryos (%)			
		Two-cell ≤ at Day 1	Four-cell ≤ at Day 2	Morula ≤ at Day 3	Blastocyst at Day 4
WT	54	50 (92.6)	48 (88.9)	44 (81.5)	39 (72.2)
KO	59	56 (94.9)	55 (93.2)	39 (66.1)	0 (0) <sup>**</sup>

有意差検定の結果 \*\*  $P < 0.01$ .



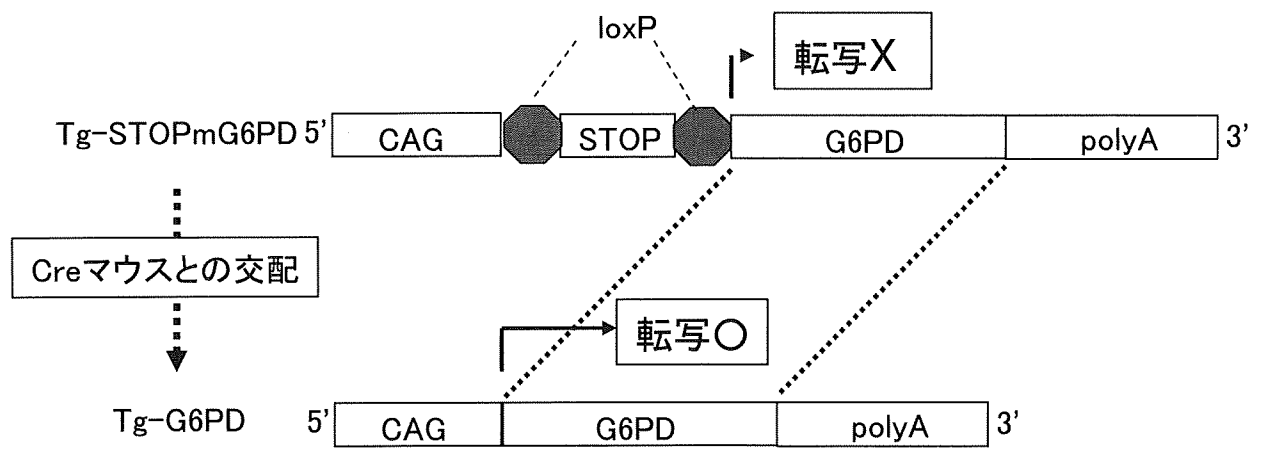


図1 コンディショナルG6PDトランスジェニックマウスを作製する際に用いたベクターと最終的な発現ベクターの構造

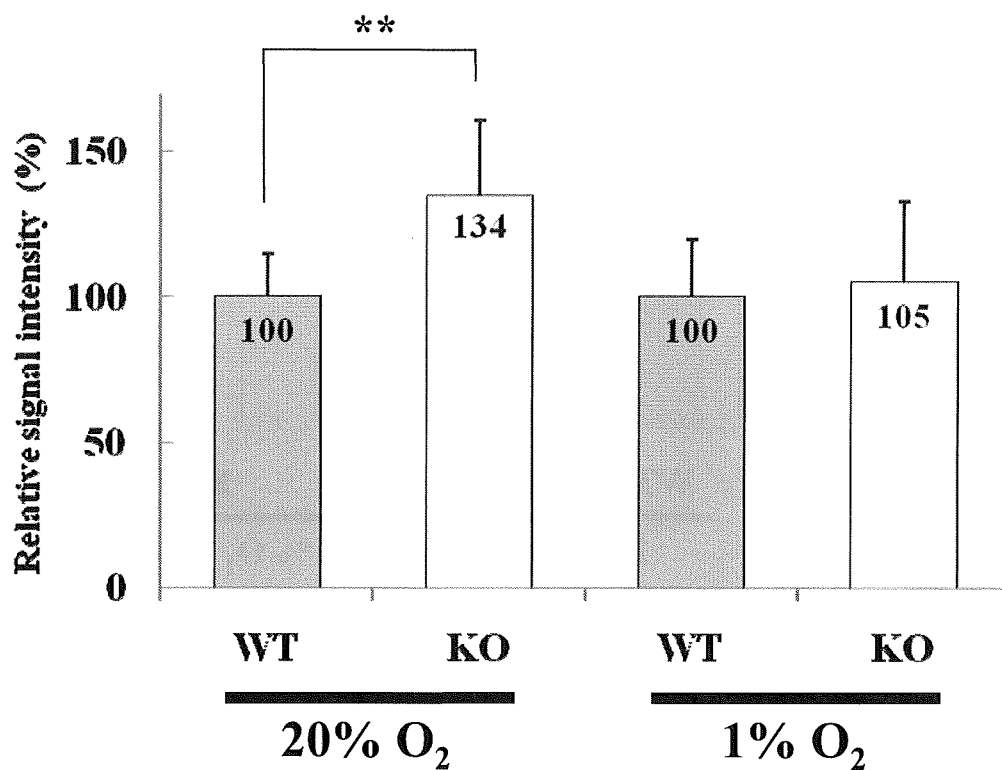


図2 20%と1%酸素培養におけるWTとKO胚中のスーパーオキシド含量の比較  
 胚を20%と1%酸素濃度で36時間培養後に、Dihydroetidiumを用いてその  
 蛍光強度を測定し、スーパーオキシド含量を求めた(n = 14-17).

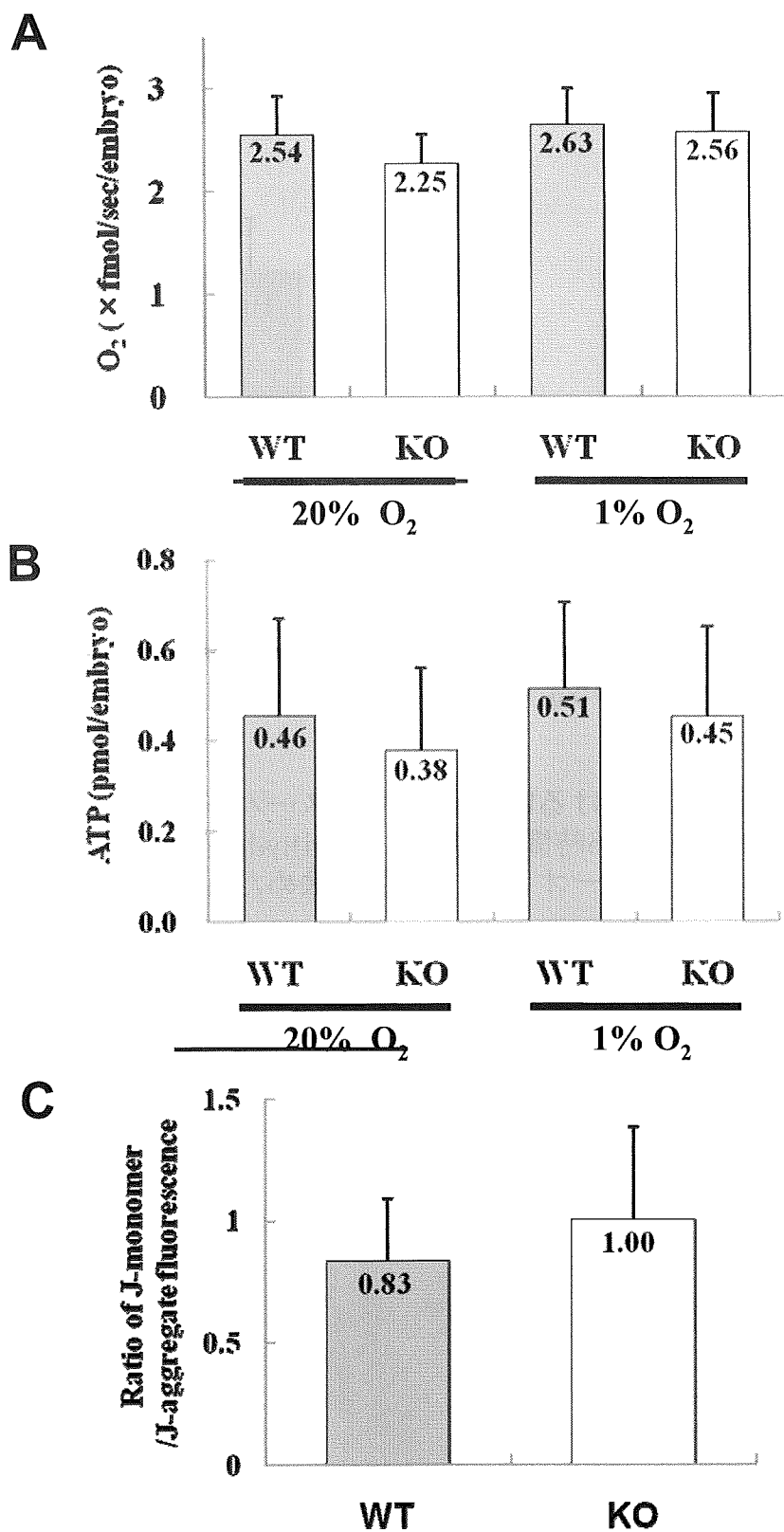


図3 2-細胞のKOとWT胚の、呼吸活性・ATP含量・ミトコンドリア膜電位の比較

A: 呼吸活性 (n = 10-13). B: ATP 含量 (n = 22-25). C: 膜電位 (n = 15-20).

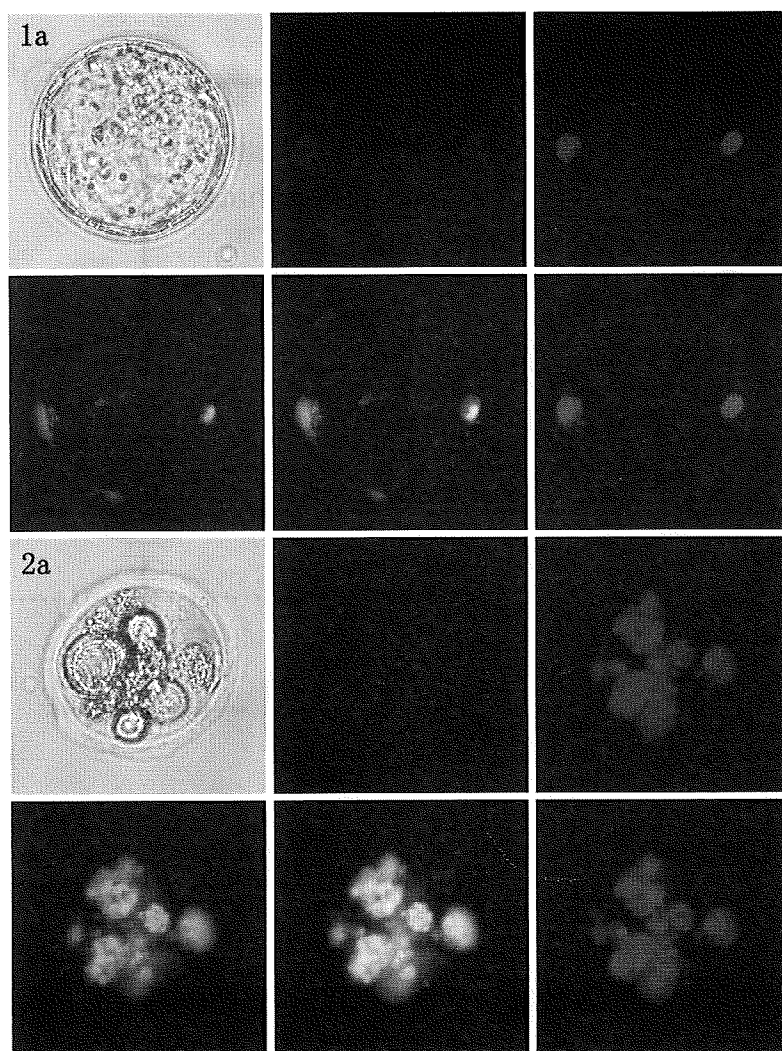


図4 4細胞の段階で1%酸素培養から20%酸素培養に移した胚の解析

WT (1a - 1f) とKO (2a - 2f) 胚を1% 酸素で4細胞まで発生させた後に20%酸素培養に移した。Hoechst33342 (1b, 2b), PI (1c, 2c), FITC-annexin V (1d, 2d), PI + FITC-annexin V (1e, 2e) とHoechst33342 + PI (1f, 2f) 重ね合わせ。