

図5 胚発生停止に関わる活性酸素シグナルの役割と標的分子に関する仮説

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

加齢とES細胞

研究分担者 阿久津英憲 国立成育医療センター研究所  
生殖・細胞医療研究部生殖技術研究室長

研究要旨

少子化、高齢出産の時代に即した社会にやさしい生殖医療のために、妊孕性を減弱させる要因に対して臨床的及び基礎的アプローチをとることは社会に対する責務である。その中で女性の年齢と出生率低下は大きな課題であり、特に卵の質の低下に関しては社会の中で理解の混乱がある。加齢と卵巣ひいては卵細胞の質への影響に関して科学的裏付けのある確かなエビデンスを獲得する必要がある。本研究では実験動物マウスを用いて、加齢と卵細胞の質における基礎研究を行う。加齢モデル由来の胚より樹立した胚性幹（ES）細胞を用い、幹細胞機能維持機能及び分化機能への影響を解析したところ加齢卵子が分化動態へ影響を及ぼすことを突き止めてきた。特に、染色体レベルでゲノム不安定性が加齢ES細胞で認められ、卵細胞質の加齢化を評価するあらたな体外培養評価系であり、新知見を得るシステムを構築してきた。本年度は特に加齢と染色体核型異常成立メカニズムの解明へ向け、染色体核型解析から加齢性質をもつES細胞で染色体トリソミー型核型異常が高率に認められた。加齢が及ぼすゲノム不安定性を解析する基盤が構築できた。

A. 研究目的

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。実験モデルマウスを用いて、加齢モデル由来の胚より胚性幹（ES）細胞を樹立することに初めて成功し、幹細胞機能維持機能及び分化機能への影響を解析したところ加齢卵子が分化動態へ影響を及ぼすことを突き止めた。この加齢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。

B. 研究方法

1. 加齢モデル由来ES細胞とゲノム安定性研究実験動物マウスを用いて行う。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、極限られた知見が得られるのみであった。本研究では、胚盤胞期胚の将来胎児となる内部細胞塊から樹立される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安定性について検討した。対象ES細胞7株、加齢ES細胞6株を初期継代と継代数20を超えた時点で解析を行なった。染色はGバンド染色法を用いて行った。今回はGバンド詳細分析を20細胞行い、モード分析（染色体数のカウント）を30細胞、合計50細胞ずつを分析した。

（倫理面への配慮）

1. 臨床研究に対する倫理面への配慮  
本研究は、ヒト組織及び細胞を取り扱う研究は行っていない。

## 2. 実験動物に対する倫理

実験動物を用いる研究については、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（承認番号2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなった。

## C. 研究結果

### 1. 加齢モデル由来 ES 細胞とゲノム安定性

#### 研究

加齢 ES 細胞は通常の生殖適齢期雌マウスから得られた ES 細胞（対象 ES 細胞）と未分化能性と多分化能性の基本的性質は何ら異なるところがない。継代初期の段階では対象 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 2 株（0-#2, 0-#7）で染色体異常が認められた。さらに培養を続け 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。対象 ES 細胞では 1 株（ICSI-#2）、加齢 ES 細胞では 5 株で染色体の異常が発見された。染色体の異常は異数性の異常が多く 86%、次いで性染色体の脱落が 29% だった。さらに何番染色体にどのような異常が認められたか解析した。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こることが示唆された。

## D. 考察

個体加齢と卵細胞質との関連性について卵細胞機能に関する新たな分子メカニズムの解明を行う。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。本研究では、胚盤胞期胚の将来胎児となる内部細胞塊から樹立される ES 細胞を加齢化モデルの胚より樹立しその特性解析から加齢化卵の多分化能性へ寄与する性質を体外培養系で探る実験系を構築する。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。

わが国において、出生率は人口置換水準を大きく下回る超少子化社会と認識されている。その中生殖補助医療（ART）を享受し、妊娠・出産に至る数は 1 万を超え、全体の 1.5% を以上に達する。しかし、ART は万能ではなく、数々の問題点が指摘されてきた。ヨーロッパ生殖医学会では、加齢に対する対応が今後の大きな課題であるとされている。少子化・晩婚化の中、わが国でも何らかの形で産婦人科医などの医療関係者、生命学者、あるいは国がこの問題に対応していることを示すことは社会に対してきわめて重要である。米国 NIH では、卵子の質に関する研究を大規模な国際プロジェクトとして遂行させている。先を見据えた基礎研究も重要である。超少子化時代となり社会の様々な方面に切実な問題を投げかけているが、その中でも生殖医療が関連する事象は重要であるが解明されていなかったり、国民への適切な啓蒙が不足している現状がある。例えば、卵子の質の低下に関しても、広く認識されていないが故に国民の一部に大きな誤

解を招いている。基盤的、科学的データの裏付けのある誠実な情報を提示することは我々研究者が社会に対して行うべき責務である。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Chen A, Egli D, Niakan K, Deng J, **Akutsu H**, Yamaki M, Chad C, Fitz-Gerald F, Zhang K, Melton D, Eggen K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell*. 2009; 4:103-106.
- 2) **Akutsu H**, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differ*. 2009; 78:137-142.
- 3) Yamada M, Hamatani T, **Akutsu H**, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet*. 2009;19:480-493.
- 4) Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, **Akutsu H**, Umezawa A, Tada

T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells.

*Genes Cells*. 2009; 14:1395-1404.

- 5) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, **Akutsu H**, Liu DR, Rubin LL, Eggen K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 491-503.

##### 2. 学会発表

- 1) 阿久津英憲:「ヒト iPS 細胞遺伝子発現動態の多様性」第 8 回日本再生医療学会総会シンポジウム, 3 月 5 日~6 日, 2009.
- 2) 阿久津英憲:「難治性疾患克服に向けたヒト iPS 細胞の可能性」日本人類遺伝学会第 54 回大会 ワークショップ 4, 9 月 23~26 日, 2009.
- 3) 阿久津英憲:「Human Embryonic stem cells and iPS Cells: Potential tool for Low temperature medical experiments」第 36 回日本低温医学会総会・学術集会シンポジウム 2, 11 月 27~29 日, 2009.

#### 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

加齢と受精現象に関する研究

研究分担者 宮戸健二 国立成育医療センター研究所  
生殖・細胞医療研究部室長

研究要旨

加齢による卵巣機能の低下は、生理的な環境変化によって卵子の有する受精能力が障害を受けた結果として生じる可能性がある。そこで、損傷を受けた卵子の機能を回復させるための培養法の開発が必要である。しかし、卵子の受精能力に関する科学的な知見が不足しているため、十分に検証することができないのが現状である。そこで、本研究では、卵子のもつ受精能力に関する基礎的研究も合わせて研究開発を行った。

A. 研究目的

卵子の生殖能力を温存する方法としては、悪性腫瘍治療にともなう化学療法や放射線治療によって引き起こされる卵巣不全、卵細胞の機能障害に対して、卵巣や卵子の凍結保存による妊孕性温存法の開発を含めた様々な検討が現在行われている。しかし、卵細胞は大きさや細胞周期が体細胞とは大きく異なることから、卵細胞の機能を完全に保存した状態での有効な凍結方法や、精子と融合する受精能力をもった卵子（成熟した卵細胞）の機能回復を図るための培養方法は未だに確立されていない。そのため、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。

凍結保存による問題点としては、凍結融解および卵巣移植による環境変化によって卵子の有する受精能力および受精後の細胞分裂や細胞分化によって個体を形成するた

めの発生能力が損傷を受ける可能性が考えられる。卵子の受精能力および発生能力を制御する分子メカニズムに関する科学的知見が不足している現状では、卵子機能の回復に関する分子レベルの指標が存在しないため、卵子の損傷度を診断することができない。

我々は、遺伝子欠損マウスを用いた分子生物学的および生化学的実験から、膜4回貫通型タンパク質 CD9 が受精の膜融合に必須であることを明らかにしてきた (Miyado *et al.* Science, 2000)。CD9 は、細胞接着分子や膜結合型細胞増殖因子などと細胞膜で複合体を形成し、細胞接着を介した細胞増殖を制御すると考えられている膜タンパク質である。本研究では CD9 が関わる膜融合機構を蛍光タンパク質との融合タンパク質を卵特異的に発現させることによって生きた卵子での 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明をめざした研究を

行った。マウス卵子とヒト卵子の受精は同様の分子メカニズムによって制御されていると考えられていることから、マウス卵子から得られる結果はヒト卵子にも応用可能であると考えられる。

## B. 研究方法

### (1) 生きた状態での受精の観察

CD9 を免疫染色した結果から、時間経過にともなって未受精卵子での CD9 の局在が大きく変化することがわかってきた。そこで、受精のイメージング系をマウス卵子を用いて構築することにより、受精前後での細胞膜の動態を経時的に観察した。特定のタンパク質に蛍光タンパク質を融合させることにより、卵子側を視覚化する研究はいままで例がない。検出には、共焦点レーザー顕微鏡およびライカ蛍光イメージングシステムを用い、3次元画像として再構築する。この系を立ち上げることより、時間的空間的なタンパク質の挙動変化を、受精に関連させて経時的に追跡することができる。現在の蛍光顕微鏡で使用するフィルターの種類および蛍光タンパク質の種類から考えると、10種類のタンパク質の挙動を生きた卵子を使って観察することが可能である。

### (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。作製に際しては卵子特異的に発現させる系統と全身に発現する系統の作製を試みたものの、結果として

卵子特異的に発現させる系統のみが樹立できた。その雌マウスから排卵された卵子を用いて、生きた卵子での CD9 の動態を観察した。プロモーターには、卵子特異的マウス ZP3 プロモーターを用いた。さらに、Tg マウスと CD9 欠損マウスを交配させることにより、EGFP-CD9 融合タンパク質が正常に機能するかどうか、融合異常を回復できるかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

国立成育医療センター動物実験指針に基づいて適切な管理基準の下で、実験を行った。

## C. 研究結果

### (1) マウス卵子での CD9 の局在解析

本研究では、受精前後での精子と卵子の動き、およびタンパク質の動態をできる限り詳細に追跡することに重点を置いた。そこで、EGFPとの融合によって可視化が可能となった CD9 の局在を生きたままの卵子で共焦点レーザー顕微鏡によって画像を取得、経時的に画像を取得することによって卵子と精子が融合するまでの一連の過程を解析した。通常、卵子でのタンパク質の局在はパラホルムアルデヒドなどで固定処理を行った後に抗体を用いて免疫染色することにより観察することにより調べられる。CD9 も固定処理後の卵子で解析されており、細胞膜上に限局することが報告されている。しかし、固定処理を行うことによる影響は全く考慮されておらず、生きた卵子での CD9 の局在も報告されていない。そこで、CD9 の局在を EGFP との融合タンパク質を使って観察を

行った。観察を行う前に CD9-EGFP が野生型の CD9 と同様の機能を持っていることを調べるため、CD9-EGFP を発現するトランスジーン（外来性に導入した遺伝子）を交配によって CD9 欠損雌マウスに導入した。その結果、CD9 欠損雌マウスは重篤な不妊症であったものの、トランスジーンを導入することによって野生型マウスと同様の産仔数を得ることができた。このことから、CD9-EGFP は CD9 と同様の機能を受精の融合過程において果たすことができると考えた。そこで、CD9-EGFP を発現した卵子で EGFP の局在を観察したところ、固定処理後の卵子での局在とは異なり、CD9 は細胞膜に限局せず、約半分の量の CD9 は細胞膜から離れ、細胞外マトリックスである透明帯と細胞膜の隙間（囲卵腔）に存在することを見出し、ウエスタ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が得られた。また、免疫染色と電子顕微鏡による観察から、野生型マウス卵子では CD9 は卵細胞膜を全体にわたって覆っている微絨毛に特異的に局在するのに対して、CD9 欠損卵子ではほとんどの微絨毛が消失していることを明らかにした。さらに、CD9-EGFP を発現させた CD9 欠損卵子では、卵細胞膜の微絨毛が再形成され、しかも、精子との膜融合能が回復した。以上のことは囲卵腔に存在する CD9 と微絨毛形成には緊密なつながりがあることを示唆している。

### (2) CD9 を含む膜構造体の発見

CD9 が囲卵腔に存在することから、CD9 が単独で放出されるのか、

または構造体の成分として存在するのかを明らかにする必要がある。ただし、CD9 は膜タンパク質であることから単独で放出されることは考え難く、何らかの構造体の成分として取り込まれており、その構造体の形成および放出に CD9 が深く関わっていることが予想された。そこで、まず、透過型電子顕微鏡によって CD9 の局在を調べた。解析には野生型卵子を用い、抗 CD9 抗体と 2 次抗体と結合させた金コロイドを用いて CD9 の局在を調べた。電子顕微鏡での観察には卵子を固定処理する必要がある、何らかの構造体が存在しても、固定処理によってダメージを受けることが危惧された。現に CD9 を含むと予想される構造体の存在を明らかにすることは非常に困難で、複数回のサンプル作製を試みた。そこで、固定処理による卵子への影響を最小限に留めるため、透明帯の一部に切れ込みを入れ、固定中での透明帯の収縮を抑えることを試みた。その結果、囲卵腔の収縮は抑えられ、金コロイドが多数付着した構造体（直径 50~250nm）によって囲卵腔が満たされていることを見出すことができた。さらに、CD9 を含む膜構造体は明瞭な 2 重脂質層を持たず、均一な内容物によって構成されていることが示された。

### (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 を含む構造体の解析には超遠心などによって分離し、質量分析によって成分分析をすることが定法であるものの、培養細胞とは異なりマウス 1 個体から 20 個程度しか得られない卵子を材料にし

ているため、質量分析に用いるために十分量のタンパク質量を集めることは困難である。そこで、卵子から透明帯を取り除いた後に、卵子の培養液中に存在する CD9 成分を抗体によって除去することにより、除去前と除去後でのタンパク質の量を特定のタンパク質についてウエスタンブロット法により比較した。卵子以外の細胞では CD9 を含む膜構造体（エキソソーム）の存在が知られていることから、特にエキソソームの成分について卵子の培養上清を用いて解析を行った。その結果、CD9 と同様の挙動をする成分として熱ショックタンパク質 HSP90 と Fc レセプターとして知られる CD64 が同定された。さらに、CD9 との関連が報告されている糖脂質 GM3 についても、抗体を用いて野生型卵子と CD9 欠損卵子での局在を調べたところ、CD9 と同様の局在をすることがわかった。以上のことから、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いることが明らかになった。そこで、卵子でもエキソソーム様の膜構造体が精子と卵子の融合に関わっていることが示唆された。さらに、卵子の培養上清には CD9 欠損卵子の融合異常を回復する活性が存在する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た。更に、酵母 two-hybrid 系から CD9 結合タンパク質として tubulin $\beta$  2A を同定した。このことから、CD9 の膜融合における機能がチューブリンを主成分とする微小管によって調節さ

れている可能性が出てきた。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 $\beta$  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。

#### D. 考察

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が明らかとなった。具体的な膜融合機構および受精の制御機構の全容解明には至っていないものの、少なくともエキソソームには 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できた。

#### E. 結論

CD9 を含む膜構造体（エキソソーム）が受精に必須で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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*, 78(2-3):



137-142 (2009).

Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Takamori K, Ogawa H, Araki Y, Miyado K, Toyama Y, Toshimori K. Equatorin: Identification and Characterization of the Epitope of the MN9 Antibody in the Mouse. *Biol Reprod*, 81(5): 889-897 (2009).

Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*, 221(2):335-342, 2009.

宮戸健二. 目で見る生殖に関連したモデル動物－受精障害モデル動物－ *Hormone Frontier in Gynecology* 16(3):2-5, 2009.

## 2. 学会発表

宮戸健二. 受精の膜融合における卵側因子 CD9 とエキソソームの役割. シンポジウム「動植物におけるアロ認証機構」第 82 回

日本生化学会大会, 神戸, 10 月 21-24 日, 2009.

河野菜摘子、宮戸健二. 膜融合を制御するテトラスパニンの役割: 受精からのアプローチ. シンポジウム「テトラスパニンの生化学」第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10 月 21-24 日, 2009.

宮戸健二. 受精の膜融合における卵側因子 CD9 とエキソソームの役割. ワークショップ「動植物におけるアロ認証機構」第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 日, 2009.

河野菜摘子、宮戸健二. 受精の膜融合における CD9 のユニークで不可欠な挙動. ワークショップ「テトラスパニン研究の新展開」第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 日, 2009.

## 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（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

高血圧症と妊孕性  
ー受精機構におけるACE2の機能解析ー

研究分担者 岡村 匡史 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨

ACE2は、血圧調整機構の主要なメタロプロテアーゼであり、心臓及び腎臓のみでなく、精子先体膜で強く発現していることを見出した。そのため、ACE2はACEと同様、受精過程に重要な機能があると考え、受精過程におけるACE2の機能解析を行った。ACE2トランスジェニックマウスでは、体外受精率、精子-卵透明帯結合能共に有意に低値を示し、ACE2阻害剤処理精子およびACE2ノックアウトマウス精子では、著しく精子-卵透明帯結合能が上昇した。以上の結果から、ACE2は精子-卵透明帯結合に重要な機能があることを証明した。

A. 研究目的

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。血圧調整機構のレニン-アンジオテンシン系(RAS)では、ACEとACE2が拮抗的に働き、それらから切り出されたアンジオテンシン(1-7)およびアンジオテンシンIIは、それぞれ血管を収縮および拡張し、血圧調整に関与することが広く知られている。

ACEは、精巣および精子で発現し、ACEノックアウト(KO)雄マウスは、不妊である(Nature, 1995)。その原因は、精子の輸卵管への到達障害と卵子透明帯への結合障害が報告されている(Proc Natl Acad Sci USA, 1998)。さらに近年、ACEが細胞表面からTESP5およびPH-20などのグルコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型蛋白質を遊離するGPIase活性を有している事が見出され、ACE KOマウス精子では、受精に関与する精子膜上のGPIアンカー型蛋白質が全く遊離されない為、精子-卵透明帯結合能不全による雄性不

妊になることが示された(Nature medicine, 2005)。

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。ヒト、マウス、ラットにおいて、ACE2 mRNAは精巣や循環器、消化器で強く発現しており(FEBS Letters, 2002, Peptides, 2005)、マウスおよびラットにおいて、ACE2タンパク質は心臓、腎臓、脳で強く発現している(Peptides, 2005)。さらに、ラット精巣では、ライディッヒ細胞に発現していることが報告されている(Endocrinology, 2004)。ACE KO雄マウスは、精子-卵透明帯結合能不全による雄性不妊になることから、本研究では、ACEのホモログとして同定され、血圧調整機構でも拮抗的に働いているACE2が、ACEと同様に妊孕性に重要な機能があると考え、受精過程におけるACE2の機能解析を行った。

B. 研究方法

1. 動物

ラット CC10 プロモーター制御下にヒト ACE2 を発現する導入遺伝子を構築し、定法に従い ACE2 トランスジェニック (hACE2Tg) マウスを作製した。実験には C57BL/6 マウスへ 6 世代以上戻し交配したものを使用した。ACE2 ノックアウトマウスは、Dr Penninger より分与を受け、コントロール系統には C57BL/6Cr (日本 SLC) を使用した。

すべて SPF 動物として飼育され、照明時間は明 12 時間 (8:00~20:00)、暗 12 時間 (20:00~8:00)、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 40~60% という飼育環境であった。水および標準飼料 (CE-2、日本クレア) は自由に摂取させ、Specific Pathogen Free 環境下で飼育した。

## 2. 表現型解析

### 1) 体外受精率

雄マウスの精巣上体尾部より精子を採取し、HTF 培地中で 2 時間前培養した。C57BL/6Cr 雌マウスに、妊馬血清性腺刺激ホルモン(セロトロピン: あすか製薬株式会社) 5 i.u およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(ゴナトロピン 1000: あすか製薬株式会社) 5 i.u を 48 時間間隔で腹腔に注射して過排卵を誘起し、卵管膨大部より未受精卵を採取後、HTF 培地中に導入した。前培養した精子を、200 精子/ $\mu\text{l}$  になるように添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養後、2 細胞期胚をカウントすることにより受精率を算定した。

### 2) 精子-卵透明帯結合能

精子および未受精卵は体外受精と同様に採取した。未受精卵を 1mg/ml ヒアルロニダーゼ(Sigma)を含む HTF 培地中に導入し、卵丘細胞を除去した。ACE2 阻害剤処理区では精子前培養培地ならびに HTF 培地に  $1.0 \mu\text{M}$  となるよう ACE2 阻害剤(DX600)を添加した。前培養精子を 100 精子/ $\mu\text{l}$  となるよう卵丘細胞除去未受精卵に添加し、1.5 時間培養した。

さらに、ガラスキャピラリーで卵子を洗浄し、2%ホルマリンで固定した。精子-卵透明帯結合数は、卵子の透明帯に結合している精子数をカウントして算出した。

### 3) 精子-卵細胞質融合能

精子-卵透明帯結合能と同様に卵丘細胞を除き、卵丘細胞除去未受精卵を酸性タイロード液中に移し卵子透明帯を除去した。その後、前培養精子を 50 精子/ $\mu\text{l}$  となるよう透明帯除去未受精卵に添加し、7 時間培養した。培養後、ガラスキャピラリーを用い卵子を洗浄し、2%ホルマリンで固定した。精子-卵細胞融合数は、卵子中に雌雄の核の有無を観察して算出した。

## 3. 発現解析

タンパク質発現は、ウェスタンブロット法にて解析した。成熟雄マウスから精巣、精巣上体、精子を採取し、ホモジナイズ後、 $8000 \times g$ , 10 分間で遠心し、上清を  $100,000 \times g$ , 90 分間で遠心した。沈殿を RIPA バッファーに溶解し、SDS-PAGE 電気泳動後 PVDF 膜に転写した。精子先体膜は、精子を 90 分間 HTF 培地中で前培養し、Ca イオノフォア処理後、同様の操作を行った。転写後の PVDF 膜を、一次抗体 anti-hACE2(R&D systems)で処理し、ECL(SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, PIERCE)で発色させた。

### (倫理面への配慮)

動物実験を行なう際には、動物実験計画書を国立国際医療センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療センターにおける動物実験に関わる指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を

講じた。

### C. 研究結果

hACE2 Tg マウスは、導入遺伝子のコピー数が異なる 2 系統 (#16 および #21) を樹立した。#21 の産仔数は、コントロール系統の C57BL/6 (B6) と同様に 7 匹前後を示したが、#16 では、半分以下の 3 匹前後と顕著に産仔数が低下していた (表 1)。精子の受精能を評価するために体外受精を行ったところ、#21 では  $90.8 \pm 1.7\%$  と、B6 マウスの  $93.6 \pm 3.2\%$  とほぼ同様な値を示したが、#16 では  $59.2 \pm 9.3\%$  と有意に体外受精率が低下していた (図 1)。さらに精子-卵透明帯結合能を検討したところ、B6 マウスでは  $6.4 \pm 4.5$ 、#21 では  $3.9 \pm 0.4$ 、さらに #16 では  $0.3 \pm 0.5$  と hACE2 Tg マウス精子では有意に精子-卵透明帯結合能が低下していた (図 2)。しかし、精子-卵細胞質融合能は、B6 マウスで  $95.1\%$ 、#21 で  $95.7\%$ 、#16 で  $95.7\%$  と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、#16 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。

#16 の体外受精率および精子-卵透明帯結合能の低下が、ACE2 特異的なものである事を確認する為に、ACE2 の特異的阻害剤である DX600 を用い同様の解析を行った。B6 マウス精子では DX600 添加区 ( $89.4 \pm 7.3\%$ ) および未添加区 ( $90.7 \pm 1.2\%$ ) と同、90%前後の高い体外受精率を示した。一方、#16 マウスでは、未添加区では  $68.4 \pm 10.6\%$  と低受精率を示したが、添加区では  $89.1 \pm 6.8\%$  とコントロールと同等まで受精率が回復した。さらに精子-卵透明帯結合能について、B6 マウス精子では未添加区で  $7.5 \pm 6.1$  であり、添加区では  $15.5 \pm 11.0$  と 2 倍上昇した。さらに、#16 では未添加区で  $0.7 \pm 0.8$  であったが、添加区では  $13.0 \pm 7.8$

と卵透明帯結合精子数が著しく上昇し、コントロールと同等まで回復した (図 3)。以上の結果から、#16 の体外受精率および精子-卵透明帯結合能の低下は、ACE2 阻害剤処理により正常とほぼ同等まで回復させることができ、ACE2 特異的であることが示された。

雄生殖組織における ACE2 発現については、ラット精巣において、ライディッヒ細胞発現していることが報告されているものの、詳細な発現解析は行われていない。そこで、雄生殖組織における ACE2 の発現をウエスタンブロット法で解析した。マウス精巣においては、ほとんど検出できなかったが、精巣上部では、頭部から尾部へ成熟が進むにつれ発現が増加していた (図 4)。さらに、成熟精子先体膜上に強く発現していることを見出した。特に hACE2 Tg マウスでは、精子先体膜により強く ACE2 が発現しており、顕著な体外受精率および精子-卵透明帯結合能の低下を示す #16 ではさらに強く発現していた (図 5)。以上の結果から、ACE2 は、雄生殖組織、特に成熟精子先体膜上に強く発現しており、ACE2 の発現増加は精子-卵透明帯結合能を低下させることが示された。

次に内在性の ACE2 を発現しない ACE2 KO マウスを用い、受精における ACE2 の機能を検討した。B6 マウス精子の精子-卵透明帯結合数は  $6.1 \pm 3.4$  であったのに対し、ACE2 KO マウス精子では  $18.7 \pm 9.1$  と 3 倍以上であり、精子-卵透明帯結合能が著しく上昇していた (図 6)。ACE2 KO マウスの産仔数、体外受精率および卵細胞質融合率は B6 マウスとほぼ同等であった。

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。

#### D. 考察

ACEおよびACE2は、共にメタロプロテアーゼであり、ACEがAngIのC末端から2つのアミノ酸を切り出すのに対し、ACE2はAngIとAngIIの両方を基質とするが、C末端から1つのアミノ酸だけを切り出すために、結果的にAngIIの産生を抑制するRASの負の制御因子として機能する。最近RASは、心臓、脳、脾、血管壁、子宮-胎盤などの多くの組織でも存在が明らかになっている。子宮に関連した疾患である妊娠高血圧症(PIH)では、脱落膜のレニン、ACE、アンジオテンシノーゲン、AT1受容体の産生亢進のみならず、胎盤ACEも亢進されることが報告されているが、PIHにおけるRASがどのように作用しているのは明らかにされていない。さらに胎児発育においても、アンジオテンシノーゲン、ACE、AT1受容体KOマウスやACE阻害剤の投与により胎児は致死的な形態形成異常を呈する事から、胎児発育におけるRASの関連も示唆されているが詳細は不明である。

一方で、受精機構についてはRASとは全く別の機序が考えられている。ACEには、RASを介して血圧調節に関与している体細胞型ACE(sACE)と、雄性生殖細胞でのみ発現している精巣型ACE(tACE)の2つのアイソフォームが存在する。sACEは2つのメタロプロテアーゼドメインを持つのに対し、スプライズバリエーションであるtACEのドメインは1つである。ACEKO雄マウスは、精子の子宮-卵管移行能および卵透明帯との結合能の低下による、生殖能低下が見られる。この症状は、tACEの再導入で回復するが、sACEでは回復しないこと

から、受精機構において、sACEとtACEは別の機能があり、tACEには精巣内または精子において特有の機能・基質があることが示唆されている。特に、tACEはジペプチダーゼ活性だけでなく、GPIase活性を有し、この活性が精子-卵透明帯結合に重要である事が示唆されている。これは血圧調節にかかわるRASとは全く別の作業機序である。ACE2はsACEと相同性があるものの、sACEは2つのメタロプロテアーゼドメインを持つのに対し、ACE2は1つのドメインしか持たない。さらに、ACE2はtACEが有している活性ドメインIIを有しておらず、ACE2とtACEは異なる遺伝子であると考えられている。

本研究において、ACE2がマウス精子先体膜ならびに精巣上で発現していることを見いだした。さらに、hACE2 TGマウスで、体外受精率、精子-卵透明帯結合能共に有意に低値を示し、ACE2阻害剤処理精子およびACE2KOマウス精子では、著しく精子-卵透明帯結合能が上昇していた。以上の結果から、ACE2は精子先体膜上に発現し、精子-卵透明帯結合能の制御において重要な機能がある事を証明した。

最近、ACE2ファミリー分子であり、プロテアーゼドメインを持たずACE2の膜貫通領域のみからなる分子Collectrinが、腎近位尿細管上皮細胞において、アミノ酸トランスポーターに結合し、その細胞膜上への発現に不可欠であることが報告された。同様に、ACE2も腸管上皮細胞におけるアミノ酸トランスポーター発現に重要である事が示されている。受精機構においても、全く新しいメカニズムが想定されるため、今後は、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。また、ヒト精子を用いて、ACE2

発現解析およびヘミゾナアッセイによる精子-卵透明帯結合能を検証することで、ヒト精子の受精における ACE2 の機能を解析していく予定である。

#### E. 結論

ACE2 遺伝子改変マウスを用いて、ACE2 が受精機構、特に精子-卵透明体結合に負の制御を行う重要な分子である事が示された。今後は、精子先体膜に存在する ACE2 の標的分子を同定し、新たな受精機構を解明していく予定である。

#### F. 研究発表

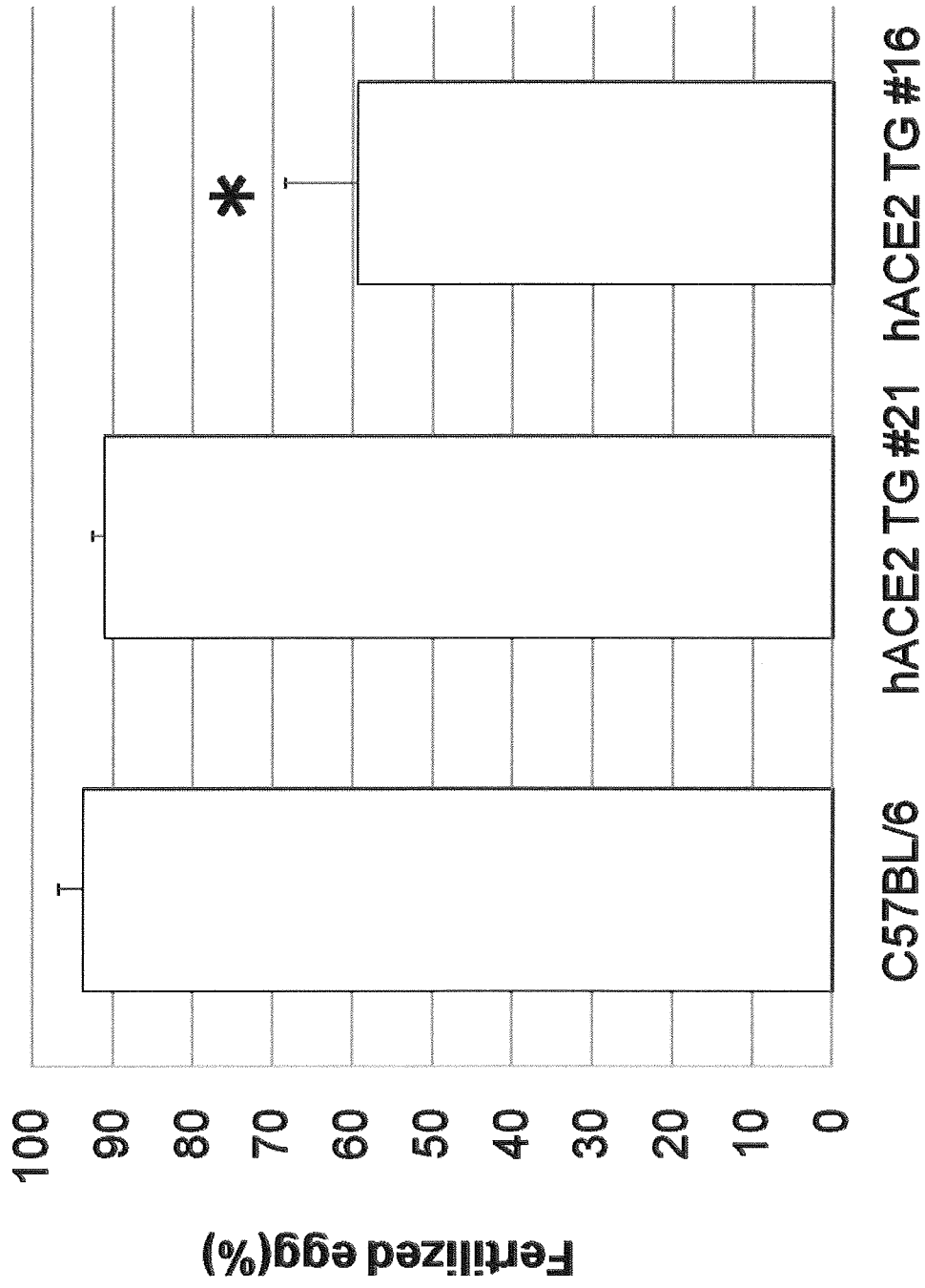
(国内学会発表)

受精における ACE2 の機能解析：後藤元人、芳賀しおり、石坂幸人、切替照雄、岡村匡史、第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009 年 5 月

#### G. 知的財産権

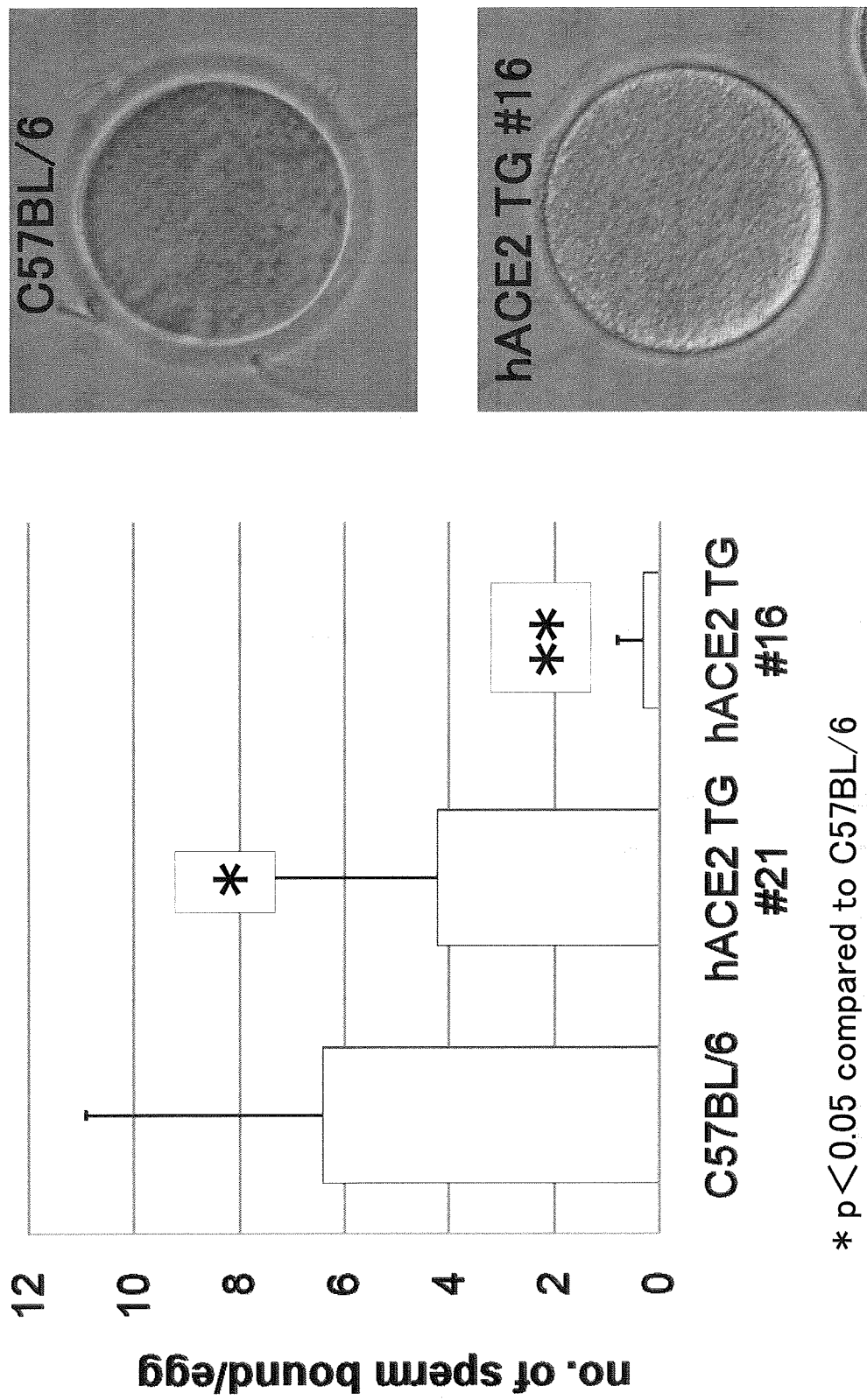
特許出願「受精を促進するための組成物」(特願2008-328105)

図1: hACE2 TGマウス体外受精率



\*  $p < 0.0001$  compared to C57BL/6

図2: hACE2 TGマウス精子-卵透明帯結合能

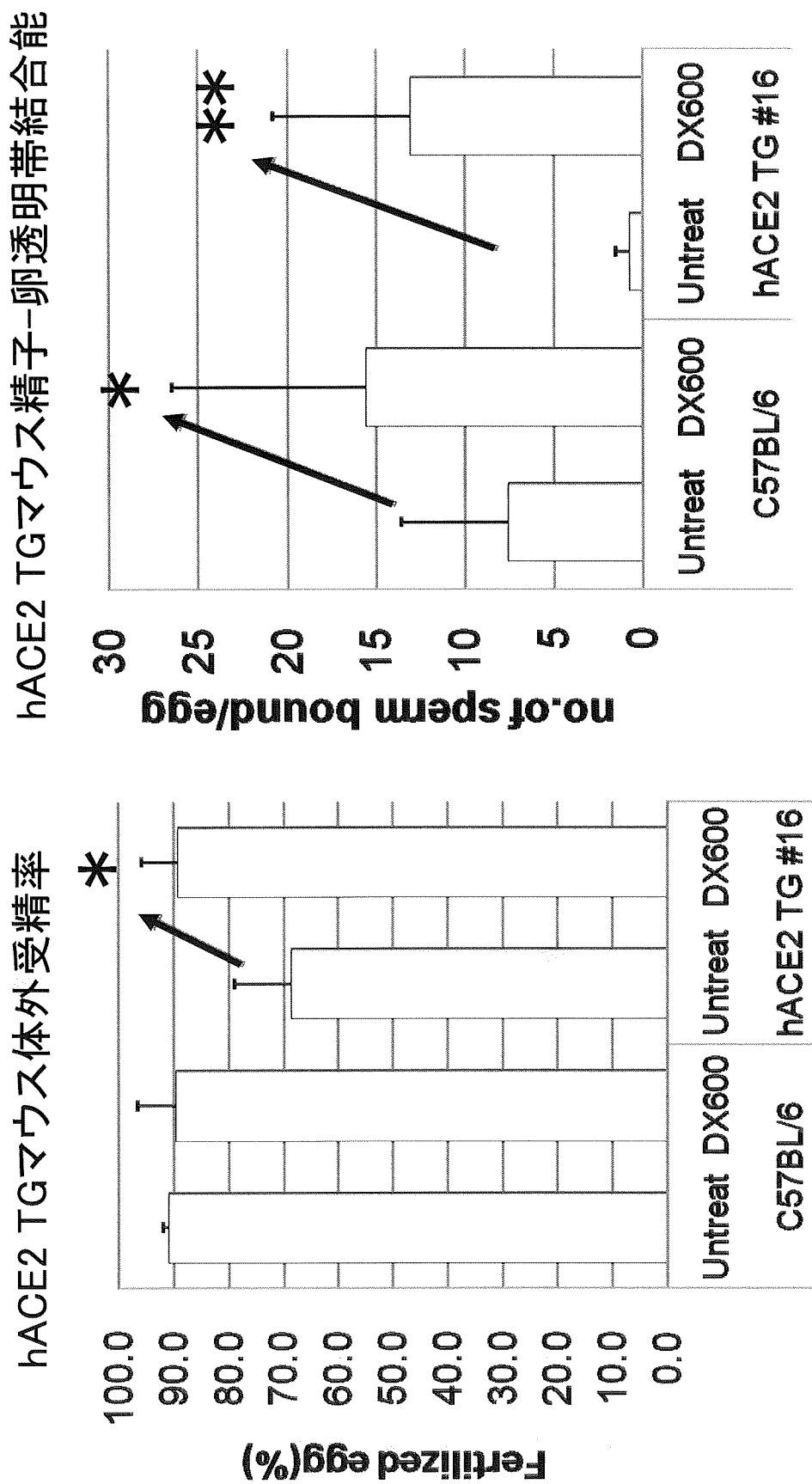


\*  $p < 0.05$  compared to C57BL/6

\*\*  $p < 0.0001$  compared to C57BL/6



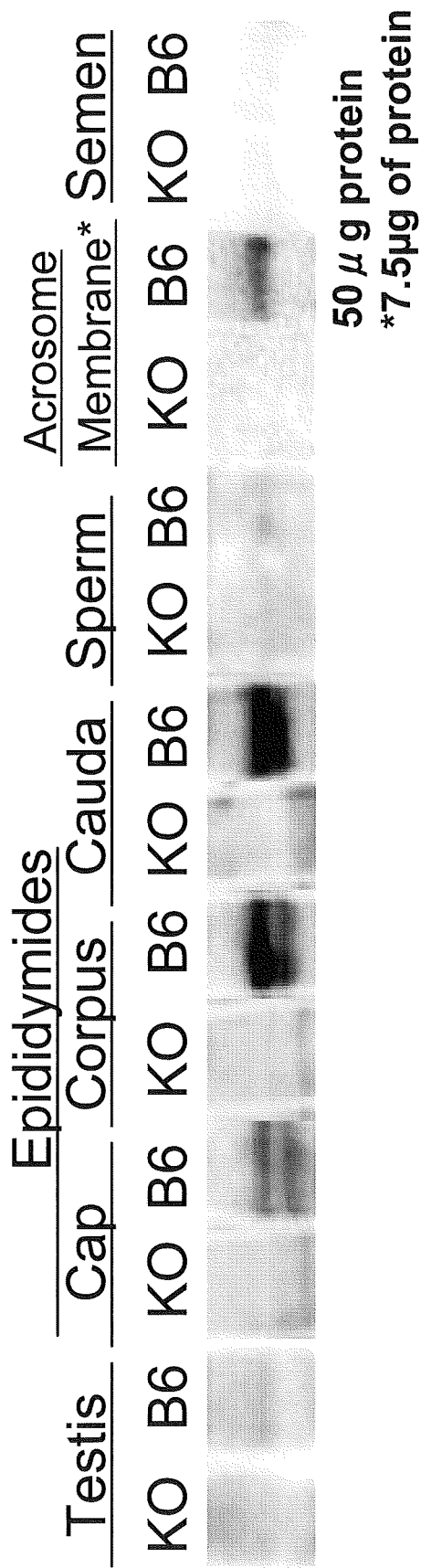
# 図3: ACE2阻害剤(DX600)の効果



\* p < 0.05 compared to untreat

\* p < 0.005 compared to untreat  
 \*\* p < 0.0001 compared to untreat

# 図4: 雄生殖組織における内在性ACE2発現



# 図5: hACE2 TGマウス精子先体膜 におけるACE2発現

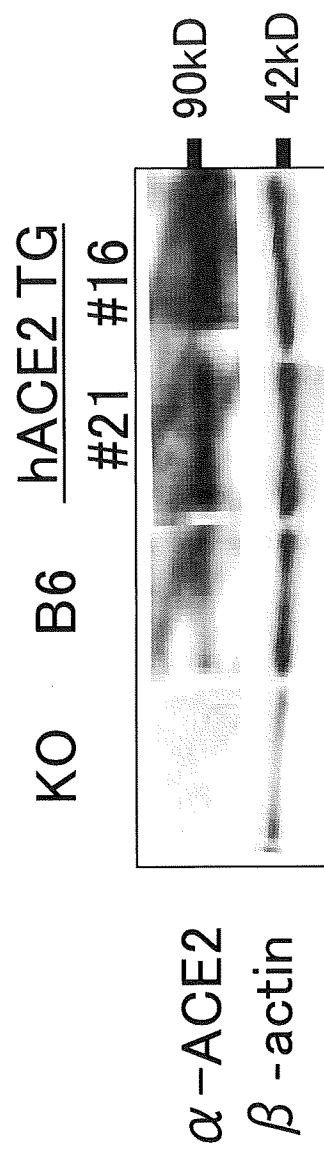
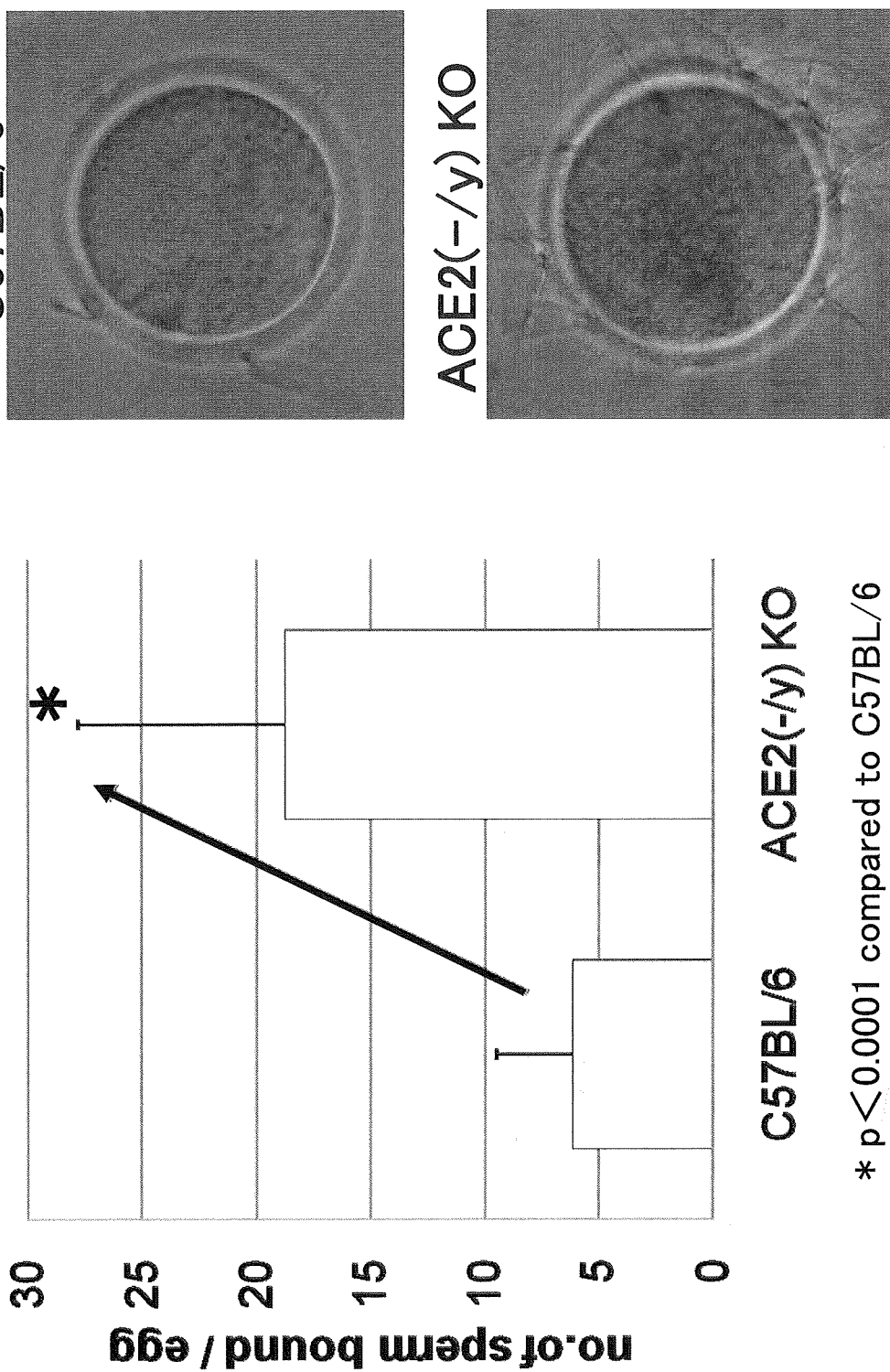


図6: ACE2 KOマウス精子-卵透明帯結合能



\*  $p < 0.0001$  compared to C57BL/6