

201018012A

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23年 (2011)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…………… 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…………… 27  
小林 浩
4. ミトコンドリアとストレスの研究…………… 37  
末岡 浩
5. 子宮内膜症における病態の解明と新規治療薬の探索…………… 45  
檜原 久司
6. 子宮内膜症：発症・進展におけるproteinase-activated receptor 2 (PAR2)  
の発現制御とその意義についての検討…………… 49  
大須賀 穰

|  |    |
|--|----|
| 7. 酸化ストレスによる受精・胚発生の障害機構に関する研究 .....      | 55 |
| 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 .....                  | 79 |

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）  
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

国立成育医療研究センター 母性医療診療部 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。

①ヒト顆粒膜細胞において老化により強く発現亢進する GSTT1 と p38MAPK の相互作用について解析を行った。GSTT1 の発現は p38MAPK の活性化および細胞内局在とよく相関しており、p38MAPK が細胞質内に局在して強く活性化するとき、GSTT1 が発現亢進していることが明らかとなった。顆粒膜細胞株で RNAi により GSTT1 の発現制御を行ったところ、p38 は核で活性化していることが明らかとなった。また、GSTT1 発現制御細胞では Steroidogenic Acute Regulatory protein の発現が著しく増加しており、p38alpha 発現制御細胞でも同様の結果が得られた。GSTT1 の発現は p38 阻害剤により抑制されることから、GSTT1 は p38 シグナルの下流でホルモン制御を行っている可能性が示唆された。

②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。PCOS 症例に低刺激排卵誘発を行い、排卵率は 70%、周期あたり妊娠率は 10%、流産率は 25%であった。刺激開始から排卵に至るまでの治療に要した日数は約 14 日、多胎率は 9%、卵巣過剰刺激症候群の発生は認めなかった。まずクロミフェン療法を行い、無効症例はメトフォルミン＋クロミフェン併用療法あるいは低用量 FSH 療法を行うことが推奨された。治療中の妊娠は 6 回目までに限られるので、そのような症例には腹腔鏡、ART などの治療を考慮する必要が高いと考えられた。

③子宮内膜症に特異的に発現している遺伝子群として、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。代表的 44 遺伝子のうち酸化ストレスは 4/5 を占め、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。HNF-1beta 遺伝子をノックダウンすると細胞増殖が抑制される事が判明した。過剰な酸化ストレスに対する解毒機構の破綻、すなわち stress-resistance な状態から stress-response な状態に移行することががん化の引き金になる可能性が示唆された。

④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、mtDNAコピー数について40歳未満群に比較し、40歳以上群では胚および顆粒膜細胞について有意な差は認めなかったが、減少傾向を示した。卵子(未受精卵)および胚(受精卵)のミトコンドリア(mt)DNAコピー数はその周囲に付着する顆粒膜細胞のmtDNAコピー数を正の相関を示した。加齢による生殖細胞の妊孕性の低下がnot DNAの量的劣化による可能性を示唆した。

⑤子宮内膜症の病態の解明と新しい作用機序に基づく薬物療法の開発を目的として、エピジェネティクスの観点から検討を行った。HDAC inhibitorであるバルプロ酸、SAHA、アピシジンが子宮内膜症性嚢胞間質細胞の細胞増殖抑制、細胞周期の停止、apoptosisへの誘導に関与している可能性が示唆された。

⑥子宮内膜症の病態において重要であるproteinase-activated receptor 2 (PAR2)の発現制御とその意義について検討した。TGF $\beta$ はESCのPAR2発現を促進し、proteinaseによるIL-6産生を増強することにより子宮内膜症を進展させることが示唆された。この巧妙な機序を阻害することにより従来のホルモン剤による治療とは異なる新規の子宮内膜症治療が開発されることが期待される。

⑦活性酸素と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ことを目的とした。体外成熟した卵子の受精能ならびに発生能は、内因性に増加した活性酸素により著しく低下した。Cyclin Bの低下ならびにCdk inhibitorsの発現が亢進していることから、こうした細胞周期制御因子が活性酸素の標的分子となっている可能性が高い。

⑧実験モデルマウスの加齢胚性幹(ES)細胞を用いて、加齢ES細胞特異的な細胞の表現型が見いだすことと、その特性を裏打ちする分子レベルの特徴を探りだすため網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、①加齢ES細胞で細胞接着及び細胞外基質に関連する遺伝子発現の低下が認められた。②Pcdhb20、Spon2、Pcdhb6遺伝子発現量が加齢ES細胞で有意に低下していることが確認された。③ES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と共に、損傷度の指標を確立することが必要であり、本研究では、卵子のもつ受精能力に関する基礎的研究と培養法の開発を目指した研究開発を行った。ヒトを含めた哺乳動物の精子と卵子の膜融合には微小管によるCD9の機能制御が重要であることを明らかにすることができた。

⑩受精過程におけるACE2の機能解析を行った。精子先体膜に体細胞型ACE(sACE)と精巣型ACE(tACE)も発現しており、ACE2ノックアウトマウスでは、精子-卵透明帯結合能ならびに精子先体反応、卵透明帯通過能が亢進していた。よって、ACE2は受精過程において、負の制御を行う重要な分子であると考えられる。さらに精子先体膜にACE2と体細胞型ACEが発現している事から受精機構においてもレニン-アンギオテンシン(RAS)系が機能していることが示唆された

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 教授                 |
| 末岡 浩   | 慶應義塾大学医学部産婦人科学 准教授              |
| 植原 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 | 国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部 室長   |
| 宮戸 健二  | 国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部 室長   |
| 岡村 匡史  | 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部 室長       |

### 1. 生殖医学における加齢の現状と診断法

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。しかしながら、現在まで生殖細胞の老化の分子メカニズムについての知見は乏しく、また診断基準となる分子マーカーも少ない。我々は以前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報告した(Ito et al., 2008)。GSTT1は、phase IIの解毒作用を担うGSTのファミリー分子であり、GST活性を有する。一方で、GSTは抗酸化作用を持つ分子としても知られており、老化と密接に関係している可能性が想定される。そこで、本研究では、ヒト顆粒膜細胞において老化により強く発現亢進するGSTT1とp38MAPKの相互作用について解析を行った。ヒト顆粒膜細胞において老化により細胞質内でp38リン酸化が強く亢進するが、同時にGSTT1の発現も強く亢進していることが免疫染色により確認された。P38MAPKの細胞内局在はGSTT1の発現とよく相関していることが明らかとなった。GSTT1は酸化ストレスにより強く発現亢進することから、顆粒膜細胞において老化を制御する重要

な分子であることが示唆された。次に、GSTT1とp38MAPKの関係を詳細に検討するため、顆粒膜細胞株を用いてRNAi法によりGSTT1の発現制御を行ったところ、p38は核で活性化していることが明らかとなった。また、p38alphaの発現制御細胞を作製したところ、GSTT1の発現は抑制された。同じく、p38MAPK阻害剤処理した細胞においてもGSTT1の発現が抑制されたことから、GSTT1はp38MAPKシグナルの下流で機能する分子であることが明らかとなった。次に、顆粒膜細胞におけるGSTT1の役割を明らかにするため、GSTT1発現制御細胞のステロイド産生能について検討した。RT-PCR法によりSteroidogenic Acute Regulatory proteinの発現を確認したところ、GSTT1ノックダウン細胞において著しく発現量が増加しており、またp38alpha発現制御細胞でも同様の結果が得られた。GSTT1の発現はp38阻害剤により抑制されることから、GSTT1はp38シグナルの下流でホルモン制御を行っている可能性が示唆された。老化によるホルモン産生能の変化と強く関連しているものと推測される。

### 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

PCOSはOHSSや多胎妊娠の高リスク群

であり低刺激排卵誘発法が多数試みられている。患者個人のライフスタイルに合わせた治療を行うために、治療の利点、問題点を検討した。

PCOS に対しクロミフェン (CC) 療法、メトフォルミン+CC 療法、低用量 FSH 療法を行い、結果、治療を検討した。

PCOS74 症例、治療周期 410 周期、妊娠数 44 例で、排卵率 73.4%、周期あたり妊娠率 10.7%、流産率 25.0%であった。刺激開始から排卵までの治療に要した日数は  $14.0 \pm 5.3$  日、多胎率は 9.1%、OHSS の発生は認めなかった。メトフォルミン+CC 併用療法は排卵に要した日数は長いが単一卵胞発育が最も多く、CC 無効例に試みる有用な方法である。低用量 FSH 療法は CC 療法と同等の排卵率、妊娠率が得られ、治療に要した日数も同等であった。妊娠率は高いが、多胎が発生する危険が高いため、注意が必要である。治療 6 周期以降の妊娠例は少なかった。低用量 FSH 療法において妊娠した症例と妊娠しなかった症例の患者背景を検討したところ、BMI、男性ホルモン値が高い症例で妊娠が得られにくいことが明らかになった。

PCOS に対する低刺激排卵誘発治療の結果は良好であったが、一般排卵障害症例より流産率、多胎率が依然として高い。治療には約 2 週間を要し、日程調整が重要である。メトフォルミン+CC 療法は多胎率が低く、CC 無効例に重要な選択肢であると考えられた。妊娠率は CC 療法より低用量 FSH 療法が高いが、治療費が高く、低用量 FSH 療法でのみ多胎が発生していることから、慎重な説明が必要と考えられた。6 周期以降に妊娠する症例は限られるので、ART や腹腔鏡手術の選択肢を考慮する必要がある。FSH 療法での妊娠例、非妊娠例の比較検討ではアンドロゲン値が高く、肥満傾向にある症

例は妊娠しないので、排卵誘発に加えて減量指導も重要である。

PCOS 症例に低刺激排卵誘発を行い、排卵率は 70%、周期あたり妊娠率は 10%、流産率は 25%であった。治療に要した日数は約 14 日、多胎率は 9%、卵巣過剰刺激症候群の発生は認めなかった。まず CC 療法を行い、無効症例はメトフォルミン+CC 療法あるいは低用量 FSH 療法を行うことが推奨された。治療中の妊娠は 6 回目までに限られるので、腹腔鏡、ART などの治療の特徴を把握する必要性が高いことが明らかとなった。

### 3. 子宮内膜症に関する研究

子宮内膜症で過剰発現している酸化ストレスと解毒機構及びそのバランスの破綻が自然炎症の破綻、すなわちがん化と密接に関連していることを検討する。

子宮内膜症に特異的に発現している遺伝子群として酸化ストレス、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。代表的 44 遺伝子のうち酸化ストレスは 4/5 を占め、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。明細胞腺癌にグリコーゲン貯留がみられる原因として、HNF-1beta の下流には糖代謝に関する酵素群が存在するため、gluconeogenesis, glycolysis, glycogenolysis に異常が生じてグリコーゲン貯留が起こっていると考えられる。HNF-1beta の下流には、解毒酵素として UGT1A1 やアネキシン A4 が過剰発現していた。これらの遺伝子は解毒遺伝子として酸化ストレスと関連していることが Gene Ontology 解析で証明された。HNF-1beta 遺伝子をノックダ



ウンすると細胞増殖が抑制される事も判明した。

さらに子宮内膜症の進展と自然炎症の破綻に着目し、子宮内膜症に過剰発現している TLR および RAGE とそのリガンドの関連性を検討した。外的要因である LPS や鉄により酸化ストレスが誘導される。さらに内因性リガンドである HSP, S100, Fibronectin, ox-LDL などの Danger signal が病態形成に関与し、ほとんどのシグナルは NF-kappaB を介して悪循環することにより内膜症の進展に関与していた。解毒機構が酸化ストレスを上回っている stress-resistance な状態から、解毒機構の破綻により酸化ストレス過剰で自然炎症の破綻を呈した stress-response への移行が子宮内膜症の進展、ひいてはがん化に密接に関与していることが考えられた。

子宮内膜症の特異的発現遺伝子解析により以下の仮説を提案する。

子宮内膜症嚢胞内の出血に含まれる鉄による刺激により、酸化ストレス関連遺伝子発現が過剰発現すると同時に過剰な酸化ストレスを防御するために解毒遺伝子も過剰発現する。

通常は解毒機構が酸化ストレスを上回っているため急激な病態の進展を抑制している。

TLR, RAGE およびそのリガンドの発現により病態形成に自然炎症が関与している。自然炎症の破綻、すなわち病態の進展とともに酸化ストレスが解毒機構を凌駕すると慢性炎症の持続により子宮内膜症ががん化に向かう。

すなわち HNF-1beta だけでは発がんしないが、これに TLR, RAGE およびそのリガンドが関与した自然炎症の破綻が加わることにより子宮内膜症の病態進展ならびにがん化に向かうことが推定された。

#### 4. ミトコンドリアとストレスの研究

加齢に伴い妊娠率が低下する事実に関し、卵子由来のミトコンドリア遺伝子の質的・量的変化がもたらす胚発生效率に対する影響を明らかにするために、単一細胞から遺伝子を増幅する手法について基礎的検討を行った。

まず、ミトコンドリア遺伝子が多くの変異遺伝子によるヘテロプラスミーを有する可能性が指摘されることから、網羅的解析が必要となることを前提に、2種類の Whole genome amplification による基礎的検討を行った。Phi29 polymerase を用いた multiple displacement amplification 法および、PCR の原理による Genomplex 法を増幅効率、exon レベルの増幅精度、配列分析における精度、定量性に関する精度について遺伝子抽出法を含めて検討した。単一細胞レベルの抽出 DNA および単一細胞からは multiple displacement amplification 法で 70% の増幅効率を確保し、exon レベルにおいても、また塩基配列レベルにおいても正確性は保たれた。その一方で増幅産物に対する定量性については MLPA 法による比較定量系を用いて検討した結果、十分な再現性を有する比較定量検索には至らなかった。定性的にはミトコンドリア遺伝子における多様な変異のヘテロプラスミーを胚細胞から検索可能であることを示す結果を得た。mtDNA コピー数について 40 歳未満群に比較し、40 歳以上群では胚および顆粒膜細胞について有意な差は認めなかったが、減少傾向を示した。卵子（未受精卵）および胚（受精卵）のミトコンドリア (mt) DNA コピー数はその周囲に付着する顆粒膜細胞の mtDNA コピー数を正の相関を示した。加齢による生殖細胞の妊孕性の低下が not DNA の量的劣化

による可能性を示唆した。

## 5. 子宮内膜症における病態の解明と新規治療薬の探索

子宮内膜症は子宮内膜あるいはその類似組織が子宮外で発育増殖する疾患であり、生殖年齢女性に好発する一般的な婦人科疾患である。その発症機序は明らかではないが、2007年に子宮内膜症ではDNAのメチル化がその発症に関与しているとの報告がなされ、エピジェネティックな変化が病因として注目されるようになった。我々はヒストンのアセチル化に注目し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、アピシジンの子宮内膜症に対する治療効果について、培養子宮内膜症間質細胞を用いて検討した。

卵巣子宮内膜症性嚢胞の手術時に卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞を分離、培養した。培養細胞に対してバルプロ酸、SAHA、アピシジンを添加し、細胞増殖、細胞周期、apoptosisについての検討を行った。また、ヒストンのアセチル化についての検討としてクロマチン免疫沈降を行った。

培養子宮内膜症間質細胞の細胞増殖について BrdU の取り込みを指標として検討したところ、バルプロ酸、SAHA、アピシジンにより細胞増殖は抑制された。また、細胞周期、アポトーシスについてフローサイトメトリーを用いて検討したところ、バルプロ酸およびアピシジンの添加により、G0/G1 cell cycle arrest およびアポトーシスが誘導された。一方、SAHA の添加では、G2/M cell cycle arrest およびアポトーシスが誘導された。バルプロ酸、SAHA、アピシジンは子宮内膜症細胞のヒストン H3 および H4 の

アセチル化、細胞周期関連蛋白である p16、p21、p27、chk2 の発現を誘導した。また、SAHA およびアピシジンはアポトーシス抑制因子である Bcl-2 および Bcl-X<sub>L</sub> の発現を抑制した。一方、バルプロ酸は Bcl-X<sub>L</sub> の発現のみを抑制した。

ヒストンアセチル化をはじめとするエピジェネティクス異常が癌など様々な疾患の発症と関わることで明らかになりつつあり、分子標的薬剤として注目されている。我々の検討では HDAC inhibitor であるバルプロ酸、SAHA、アピシジンが子宮内膜症性嚢胞間質細胞の細胞増殖抑制、細胞周期の停止、apoptosis への誘導に関与している可能性が示唆された。HDAC inhibitor はヒストンアセチル化領域を高めるため、p16、p21、p27、chk2 をはじめとする細胞周期関連蛋白遺伝子の転写が活性化され、さらに Bcl-2 をはじめとするアポトーシス抑制因子の発現抑制などを介して、細胞増殖の抑制、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導に働くものと推測される。

## 6. 子宮内膜症：発症・進展における proteinase-activated receptor 2 (PAR2) の発現制御とその意義についての検討

ライフスタイルの変化にともない、子宮内膜症 (EM) 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。その機序の解明に向けて今回の研究では、proteinase activated receptor (PAR) 2 に着目した。EM では、病巣で特定の proteinase 産生が亢進することにより、その受容体である proteinase activated receptor (PAR) 2 が活性化され、IL-6 産生など EM の進展

を促進する反応が惹起される。一方、EMでは transforming growth factor beta (TGF  $\beta$ ) が病巣で増加することが報告されている。我々はこれまで不明であった PAR2 発現制御における TGF  $\beta$  の作用について検討した。

倫理委員会の承認を得、文書同意の下、卵巣子宮内膜症性嚢胞から EM 間質細胞 (ESC) を分離培養し実験した。まず ESC を TGF  $\beta$  (10ng/ml) にて刺激し、PAR2mRNA 発現を RT-PCR で測定した。次に、TGF  $\beta$  (0, 1, 5, 10ng/ml) で 24H 刺激後、PAR2 活性化のため PAR2 agonist peptide (PAR2AP) 30  $\mu$ M を 24H 添加し、上清中の IL-6 を ELISA で測定した。また SB431542 (TGF  $\beta$  type I 受容体阻害剤) 10  $\mu$ M 前投与後に同様に TGF  $\beta$ 、PAR2AP 刺激後の IL-6 を測定した。最後に PAR2siRNA 導入により PAR2 発現を抑制し、同様に TGF  $\beta$ 、PAR2AP 刺激後の IL-6 を測定した。

【結果】TGF  $\beta$  は 6 時間において最大 3.2 倍に PAR2mRNA 発現を増加させた。TGF  $\beta$  前投与なしでは PAR2AP 添加は無添加に比し IL-6 産生を 2.8 倍としたが、TGF  $\beta$  はこの比を濃度依存的に増幅し、10 ng/ml では 5.1 倍とした。SB431542 は TGF  $\beta$  投与による PAR2mRNA 増加、PAR2AP 添加による IL-6 産生の増強効果を抑制した。PAR2siRNA 導入により PAR2AP による IL-6 産生の増加、TGF  $\beta$  前投与による IL-6 産生の増強作用はともに認められなかった。

EM において TGF  $\beta$  が増加することが知られている。また、IL-6 は EM の進展を促進することが示唆されている。よって、EM における TGF  $\beta$  の増加は ESC の PAR2 発現を増加させるという機序により、proteinase による IL-6 産生などの反応を増幅して EM を進展させることが示唆された。この巧妙な機序を阻害する

ことにより従来のホルモン剤による治療とは異なる新規の子宮内膜症治療が開発されることが期待される。

ESC において TGF  $\beta$  が PAR2 発現増加を介して IL-6 産生を増強することが示された。

## 7. 酸化ストレスによる受精・胚発生の障害機構に関する研究

活性酸素が大量に生じると酸化ストレスをもたらし、それが加齢・子宮内膜症・多嚢胞性卵巣症候群などに起因する妊孕性低下の一因となる可能性が指摘されている。我々はこれまでに、活性酸素消去活性が低下することで酸化ストレスの亢進する Superoxide Dismutase-1 欠損 (SOD1-KO) マウスを用いることで、各種病態に酸化ストレスがどのような影響を与えるかについて検討してきた。SOD1-KO 胚にとっては空気中の酸素濃度 (20%) に置かれるだけでも酸化ストレスとなり、2 細胞期で発生停止し、4 細胞期以降では細胞死を起こす。また最近になって、新規抗酸化酵素の 1 つ Peroxiredoxin 4 (Prx4) の遺伝子欠損マウスの開発に成功し、その解析により精子形成への関与を強く示唆する結果を得ている。本研究は、活性酸素と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ことを目的とする。

SOD1-KO マウスの細胞では内因性に酸化ストレスを生じるため、従来から行われている外から活性酸素を添加する研究では得られない、生理的に生じる活性酸素の影響を調べることができる。解析の結果、IVMFC で得られた卵子については、精子侵入後でもほとんどの胚で卵割が起こらず、多くは前核形成前に発生停止した。SOD1-KO 胚の紡錘

体は小さく、染色体異常を示す胚が多かった。しかし、ATP含量やミトコンドリア膜電位はほぼ野生型に近い値を示した。成熟卵では正常に受精したが、Cdk-cyclinの活性を制御し細胞老化に深く関る事が知られているp16とp19の発現が著しく亢進していた。また、M期でCdk 1の活性化に働くCyclin Bのタンパク量が低下していることが明らかになった。

酸化障害に加えて、活性酸素によるシグナル制御の機構は近年注目されているが、その中でもPeroxioredoxin (Prx)の関与が重要と考えられている。Prxメンバーの1つPrx4については、性成熟した精巣でのみ高分子型が発現するが、マウスのゲノムデータベースの検索とRT-PCR解析により、この精巣特異的転写産物はプロモーター/第1エキソンが異なる事が分かった。精巣特異的配列を認識する抗体を作製し、ウェスタンブロット解析により存在を確認し、また免疫組織染色によって精子形成への分化段階にある細胞で高発現が見られた。Prx4bを発現する細胞の検索を行ったところ、セミノーマ由来の細胞に発現が認められたので、遺伝子ノックダウンやプロテオミクス解析を行うことでその機能について解明する予定である。

## 8. 加齢とES細胞

エイジングプロセスを恒久的に解析できるシステムとして加齢ES細胞が有用である可能性を見出してきた。加齢ES細胞特異的な細胞の表現型が見いだすことと、その特性を裏打ちする分子レベルの特徴を探りだすため網羅的遺伝子発現解析を行う。先行実験として階層型クラスタリング解析ではグループ化で

き、ある特徴を持つことが示唆されている。今年度は統計的により適切な方法としてバイオリジカルサンプルを複数おき、網羅的遺伝子解析を行い、分子レベルでその特徴を見いだす。これまで、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てきた(加齢ES細胞)。加齢ES細胞を対象にDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から有意(発現が2倍以上差のあるプローブでかつ、T検定( $p < 0.01$ )のものを抽出)に発現が上昇している遺伝子に対して遺伝子オントロジー解析を行った。遺伝子発現に差があると抽出されてきた遺伝子の候補より、Pcdhb20、Spon2、Pcdha6、Nrpl遺伝子を選び出し、定量的RT-PCR法によりバリデーションを行なった。その結果、抽出した遺伝子群に対しての意義付けとして機能分類するために遺伝子オントロジー解析を行った結果、機能分類することが可能であり、機能分類では細胞接着の低下が示唆され、細胞外基質に関与する遺伝子の発現低下により加齢ES細胞では接着性に機能低下がおきていることが示唆された。リアルタイム定量RT-PCR法解析を行った。Pcdhb20、Spon2、Pcdhb6などの遺伝子発現量が加齢ES細胞で有意に低下していることが確認された。加齢ES細胞では接着性及び細胞外基質の性質に機能低下が示唆された。ES細胞という分化多能性幹細胞に個体加齢の影響が投影されていることが示唆され、特に細胞接着性について機能解析を進める必要がある。抽出できた遺伝子には胎盤成熟や機能に関与する遺伝子と関連するものがあり、加齢が周産期ステージへの影響をみる評価マーカーとなりうるかも今後は検討する必要がある。

加齢 ES 細胞で細胞接着及び細胞外

基質に関連する遺伝子発現の低下が認められた。Pcdhb20、Spon2、Pcdhb6 遺伝子発現量が加齢 ES 細胞で有意に低下していることが確認された。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

卵巣機能の低下は、加齢などの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。一方、卵子の受精能力および分化能力を調節・維持する数多くの研究がおこなわれているが、分子メカニズムに関する科学的知見は現在でも不足しており、ヒト卵子の機能回復に関する分子レベルの指標が未同定であるため、卵子の損傷度すら診断することができないのが現状である。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と共に、損傷度の指標を確立することが必要である。本研究では、卵子のもつ受精能力に関する基礎的研究と培養法の開発を目指した研究開発を行った。倫理面への配慮としては、(独)国立成育医療研究センター動物実験委員会、遺伝子組換え委員会に実験計画を申請・承認後(承認番号 04-004 および 5-9)、実験指針に基づいた適切な管理基準の下で実験を行った。その結果、精子と卵子の膜融合に必須であることを既に報告している膜 4 回貫通型タンパク質 CD9 の変異体の解析から、CD9 の C 末端 7 アミノ酸に膜融合における CD9 の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。そこで、チューブリン重合促進剤および阻害剤による受精の融合効率を検討したところ、ビンカアルカロイド系のチューブリン重合阻害剤であるビンブラスチンによってマウス卵子のもつ精子との融合活性が上昇することがわかった(特許第 4448172 号 名称:哺乳動物卵内への細胞外物質の導入促進剤及び導入方法)。以上の結果から、ヒトを含めた哺乳動物の精子と卵子の膜融合には微小管による CD9 の機能制御が重要であることを明らかにすることができた。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、卵子培養法を開発するための指標として、2 つのタンパク質 (CD9 および tubulin  $\beta$  2A) を同定することができた。また、卵子の融合能力の回復にチューブリン脱重合剤が有効であることを示すことができた。

## 10. 高血圧症と妊孕性

### —受精機構における ACE2 の機能解析—

女性の晩婚に伴う妊娠希望時の年齢の上昇や、生活習慣病患者数の増加による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-アンギオテンシン系(RAS)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。

ACE は、精巣および精子で発現し、さらに ACE ノックアウト雄マウスは、不妊である。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。しかし、ACE ノックアウトマウスの不妊は、血圧調節にかかわる RAS とは全く別の作業機序であると考えられている。近年 RAS は、心臓、脳、膝、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きている。しかし、受精における ACE と ACE2 および RAS の関与については、明らかになっていない。そこで本研究では、ACE2 に ACE と同様、受精に重要な機能があると考え、受精機構における RAS の関与を明らかにする事を目的とした。

ACE2 ならびに体細胞型 ACE がマウス精子先体膜で発現しており、さらに ACE2 ノックアウトマウス精子は著しく精子-卵透明帯結合能、精子先体反応、卵透明帯通過が亢進していた。ACE2 ノックアウトマウスの精子頭部の形態は正常であった。

以上の結果から、ACE2 はこれらの受精過程において、負の制御を行う重要な分子である可能性を示した。これらの知見から受精機構においてもレニン- アンギオテンシン (RAS) 系が機能していることが示唆された。

受精機構において、体細胞 ACE と精巢型 ACE は別の機能があり、精巢型 ACE には精巢内または精子において特有の機能・基質があると考えられている。特に、精巢型 ACE 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 は精巢型 ACE が有している活性ドメイン II を有していない。また、ACE2 は体細胞型 ACE と相同性があり、アミノ酸 10 個からなるアンギオテンシン I を共通基質とする。ACE により、アンギオテンシン I の末端 2 アミノ酸が切り出されて生成されるアンギオテンシン II は、精液中に多く存在し、AT1 受容体を介した cAMP シグナル伝達経路により、精子の受精能獲得を誘導する事が知られている。以上のことから、精子受精能獲得にはレニン- アンギオテンシン (RAS) 系

が関与している事が推察される。

## 1 1. 健康危機情報

特記すべき事項なし

## II. 分担研究報告

## 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

国立成育医療研究センター 母性医療診療部 不妊診療科 医長

研究協力者 高橋 祐司・伊藤めぐむ

国立成育医療研究センター 母性医療診療部 不妊診療科 研究員

### 研究要旨

本研究では、ヒト顆粒膜細胞において老化により強く発現亢進する GSTT1 と p38MAPK の相互作用について解析を行った。GSTT1 の発現は p38MAPK の活性化および細胞内局在とよく相関しており、p38MAPK が細胞質内に局在して強く活性化するとき、GSTT1 が発現亢進していることが明らかとなった。顆粒膜細胞株で RNAi により GSTT1 の発現制御を行ったところ、p38 は核で活性化していることが明らかとなった。また、GSTT1 発現制御細胞では Steroidogenic Acute Regulatory protein の発現が著しく増加しており、p38alpha 発現制御細胞でも同様の結果が得られた。GSTT1 の発現は p38 阻害剤により抑制されることから、GSTT1 は p38 シグナルの下流でホルモン制御を行っている可能性が示唆された。

### 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、ヒト顆粒膜細胞において老化により強く発現亢進する GSTT1 と

p38MAPK の相互作用について解析を行った。

### 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℃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  $\mu$ M H202 による酸化ストレス負荷を24時間行った。また、KGN に GSTT1 および p38alpha の RNAi コンストラクトを導入し、安定形質発現細胞の選別を行った。これらの細胞の一部は遠心により上清を除去して-80℃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%ブロッカーでブロッキングした後、1 次抗体で染色し、洗浄後 Alexa488 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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) を用いて可溶画分の総タンパク質量の測定を行った。

### (5) RT-PCR

RNA 抽出試薬を用いて標本より Total RNA を精製し、これを鋳型として 1<sup>st</sup> strand cDNA を作製した。目的の遺伝子に特異的なプライマーを作製し、thermal cycler を用いて遺伝子の増幅を行った。また、内部標準として G3PDH の PCR を行い、画像解析ソフトを用いて電気泳動後増幅した遺伝子産物のバンドの濃淡を数値化した。

### (6) 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  $t$  検定により解析した。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。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。

### (7) 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. 結果

### (1) 顆粒膜細胞における p38MAPK のリン酸化

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ところ、p38MAPK は Younger 群と比較して Older 群でリン酸化が強く亢進していた (Fig 1A: 免疫染色; Fig 1B: ウェスタンブロット解析)。一方、同一患者の顆粒膜細胞において、GSTT1 の発現は老化により強く亢進していることが明らかとなった (Fig 1C)。

次に、顆粒膜細胞株 KGN に過酸化水素水  $200\ \mu\text{M}$  を 24 時間負荷して p38MAPK のリン酸化を検証した。酸化ストレスの負荷により p38MAPK のリン酸化は細胞質内で著しく亢進していることが確認された (Fig 2)。一方、p38MAPK 阻害剤で前処理した細胞では細胞質内での p38MAPK 活性化が抑制され、これと一致して GSTT1 の発現は抑制された (Fig 3)。

### (2) GSTT1 発現制御細胞における p38MAPK の細胞内局在

p38MAPK 発現制御細胞および GSTT1 発現制御細胞を作製し、それぞれの細胞に

における GSTT1 の発現および p38 活性化を免疫染色により検討した。P38MAPK ノックダウン細胞において GSTT1 の発現は著しく抑制され、p38MAPK 阻害剤を用いた場合と同様の結果が得られた (Fig 3)。一方、GSTT1 ノックダウン細胞において、p38MAPK は核内でより強く活性化していることが明らかとなった。

### (3) GSTT1 の顆粒膜細胞における役割

GSTT1 が p38 シグナルの下流に位置する分子であることから、GSTT1 がホルモン産生制御に関わる可能性について検討した。GSTT1 ノックダウン細胞において、プロゲステロンなどホルモン産生の拠点となる Steroidogenic Acute regulatory protein の発現を検討したところ、著しく亢進していることが明らかとなった (Fig 4)。同様に、p38 ノックダウン細胞においても StAR の発現は亢進していることが明らかとなった。

## D. 考察

GSTT1 は phase II の解毒作用を担う GST のファミリー分子であり、GST 活性を有する。一方で、GST は抗酸化作用を持つ分子としても知られており、老化と密接に関係している可能性が想定される。GSTT1 は他のファミリー分子とは構造的な類似性が比較的低く、生体にとって有害なホルムアルデヒドを産生することも報告されており、その機能については不明な点が多い。

顆粒膜細胞において、老化により GSTT1 の発現が亢進していることは酸化ストレスが GSTT1 の発現を制御していることを示唆している。実際、KGN 細胞において、酸化ストレス下で GSTT1 の発現は細胞質内で著しく増加しており、強い関連性が示された。また、p38MAPK の活性化は若齢では核に局在し、老齢では細胞質内に認められることをすでに報告したが、GSTT1 がこれらの変化とよく一致していることから、顆粒膜細胞の老

化と深く関わっていることが示唆された。GSTT1 発現制御細胞では、p38MAPK の活性化が核で亢進していたことは、老化との関連性を強く支持している。一方、p38alpha ノックダウン細胞や p38 阻害剤処理細胞では GSTT1 の発現は抑制されていることから、GSTT1 は p38MAPK の下流で働く分子であることが示唆された。

顆粒膜細胞において GSTT1 がどのような役割を果たしているかについては、現在詳細な検討を進めているが、ホルモン産生能を制御している可能性が得られた。今回、ノックダウン細胞を用いて Steroidogenic Acute Regulatory protein の発現の変化を確認したところ、明らかに StAR の発現は増加していたことから、GSTT1 は顆粒膜細胞においてホルモン産生を担っているものと推測される。顆粒膜細胞におけるホルモン産生能の加齢変化を引き起こす原因である可能性が示唆された。

## 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 シグナルにより GSTT1 の発現を誘導していることが明らかとなった。GSTT1 は顆粒膜細胞のホルモン産生制御を行う分子であると推測された。

## F. 研究発表 投稿中

## G. 知的財産権 特になし

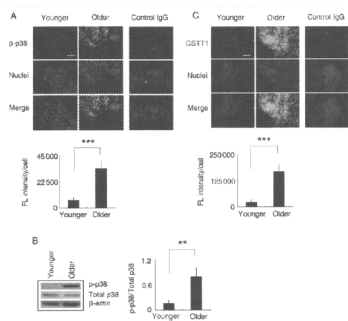


Fig 1. 顆粒膜細胞における p38MAPK のリン酸化

Green: リン酸化 p38MAPK、GSTT1

Blue: 核

Western blot には細胞質画分を使用

- ヒト顆粒膜細胞における p38 リン酸化の免疫染色
- ヒト顆粒膜細胞における p38 リン酸化のウエスタンブロット解析
- ヒト顆粒膜細胞における GSTT1 の免疫染色

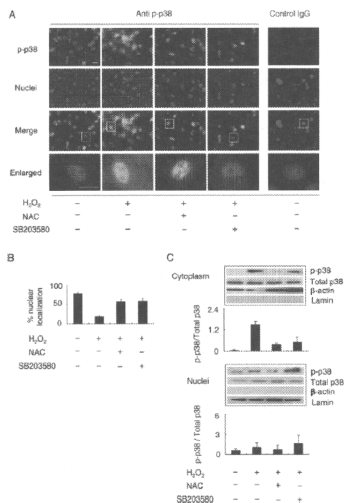


Fig 2. 顆粒膜細胞株 KGN における p38MAPK のリン酸化と局在

Green: リン酸化 p38MAPK

Blue: 核

Western blot には細胞質画分および核画分を使用

- 過酸化水素水処理した KGN 細胞における p38 リン酸化の免疫染色 (核内のリン酸化を拡大図で示す)
- 核内でのみ p38 リン酸化が見られる細胞の比率
- KGN 細胞における p38 リン酸化のウエスタンブロット解析

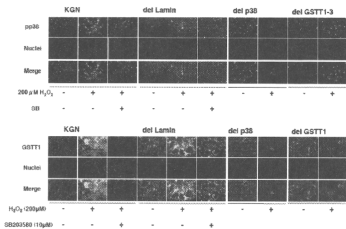


Fig 3. GSTT1 ノックダウン細胞、p38alpha ノックダウン細胞における p38、GSTT1 の発現

Green: リン酸化 p38MAPK、GSTT1  
Blue: 核

- A. 過酸化水素水処理した細胞における p38 リン酸化の免疫染色
- B. 過酸化水素水処理した KGN 細胞における GSTT1 の免疫染色

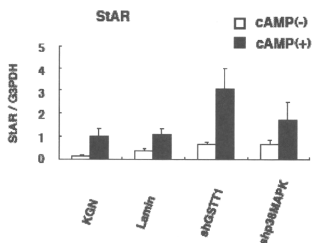


Fig 4. RT-PCR による StAR の発現解析  
GSTT1、p38alpha ノックダウン細胞において、cAMP 刺激下における StAR の発現変化を比較解析した