

mtDNA コピー数との関連性について検討した。また同じ卵胞内の未受精卵、未分割胚と顆粒膜細胞の mtDNA コピー数との関連性について検討した。

B. 研究方法

1) 単一細胞由来のmt DNA解析のためのWGA法の開発

① 抽出希釈DNA系列に対する稀少ヒトゲノムに対するMDAを用いたWGAと、引き続き各種遺伝子診断による解析：正常男性のリンパ球由来DNAに対して、MDAを実施し、収量を定量すると共に DNAの増幅の有無を検討した。また、正常男性のリンパ球由来DNAのMDA産物に対して、複数の遺伝子解析効率を検討するために dystrophin遺伝子の変異解析を選択した。Beggs および Chamberlain の multiple Primerを用いたmultiplex PCRを行い、19 exonの増幅の有無についてexonレベルでの増幅の効率を検討した。

また、TaqMan 蛍光 probe を用いた real-time PCRによる遺伝子解析を行い、1塩基レベルでの遺伝子微小変異における塩基配列のconcordanceについて検討した。

② MLPA法による相対コピー数解析の導入：MDA産物に対して、MLPA法による解析を行い、稀少DNAにおける相対コピー数解析の可能性および網羅的核ゲノムのdepletion分析実施の可能性を検討した。

③ mtDNAに対するMDA法による遺伝子増幅と、その産物における増幅バイアスの検討：ミトコンドリア異常症：Leigh脳症保因者（T8993G変異：変異比率：46%）のDNAに対してMDA法を実施し、鋳型と同様

の変異比率を保って増幅がなされるかを調べた。

④ 単一細胞に対するMDA法によるWGAの検討：健康者およびdystrophin遺伝子に点変異を有する患者由来のリンパ球株化細胞に対してMDA産物の収量を測定し増幅率を算出した。その際に、複数の同時遺伝学診断の実施可能性について検討した。

2) 卵子・胚・顆粒膜細胞におけるmtDNAの定量的評価

2005年8月から2010年12月まで当院当科で行われた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インフォームド・コンセントを得て検体とした。①未受精卵、未分割胚とそれぞれの卵に付着していた顆粒膜細胞（n=5）。

②2cell以上の分割胚（n=13）（受精後48～72時間目でVeeck分類grade）。③顆粒膜細胞（n=22）卵に付着していた顆粒膜細胞用いた。卵子、顆粒膜細胞の定量的評価は、mtDNAを1細胞中に9100コピー含むヒトリンパ球由来の細胞株（ATCC、143B；bone, osteocarcinoma：CRL-8393）を用いてコピー数の異なる希釈系を作成し、real-time PCRで増幅して、検量線を作成のうえ顆粒膜細胞、卵子のmtDNA コピー数を定量した。

C. 研究結果

1) 単一細胞由来のmtDNA解析のためのWGA法の開発

MDA後にChamberlainのmultiple primerを用いたPCRでは、100pg以上の群では9つのexonすべてが増幅されたが、

10pg群では5つのexonでのみ増幅された。10pg群でbandが検出されなかった部位にも singleplex PCRでは 規定の位置に bandが検出すべてのexonにおいてMDAによる増幅が確認された (図1)。微小変異を有するDNAに対して、MDA後にreal-time PCRを実施した結果は、1ng群と100pg群それぞれにおける診断の一致率は、100%(14/14)および86%(12/14)であった。10pg群においては、診断の一致率は71%(10/14)であった。MDA法とMLPA法を組み合わせたdystrophin遺伝子の全79exonの解析の結果は、100pgの鋳型量では、異なる2つの検体において、それぞれ79/79exonと78/79exonで増幅が確認された。10pgの鋳型量では、79中49のexonで増幅を認めるにとどまった。46%のミトコンドリア変異比率をもつヒト由来のDNAを100pgのDNAを鋳型とする条件でMDA増幅し、引き続き定量PCRにより当該ミトコンドリア遺伝子座の変異比率を求めた結果は48%であった。これは10細胞に相当する鋳型量の条件ではバイアスの少ないmtDNAの増幅がなされた可能性を示した。1細胞レベル相当する10pgの鋳型量では、産物の当該変異比率は38%であり、不均一な遺伝子増幅がなされた可能性が示された。MDAと異なる増幅原理を有するGenomePlex法によるWGAを並列して実施したが、MDA法を凌駕する結果には至らなかった。MLPA法による染色体サブテロメア領域における特異プローブを用いたコピー数解析を実施した結果、コピー数にはばらつきを生じたが、全染色体の93%のexonで増幅が確認された (図2)。

2) 卵子・胚・顆粒膜細胞におけるmtDNAの定量的評価

採卵後 72 時間の胚発生状況と mtDNA コピー数とに有意な関連性は認められなかった。2 年齢群に関して胚の有する mtDNA コピー数 (平均±SE) は、40 歳未満群 (n=4; 619795 ±57416) と比較し、40 歳以上群 (n=9; 599217 ±88441) において mtDNA コピー数は減少傾向を示した。未受精卵、未分割胚の mtDNA コピー数と顆粒膜細胞の mtDNA コピー数との間に正の相関の可能性が示された。顆粒膜細胞の100個あたりの mtDNA コピー数を40歳未満の群と40歳以上の群の2群間を比較した。結果、40歳未満 (n=3; 652745±128431)、40歳以上 (n=19; 490279±33297) であり、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。

D. 考察

WGAの導入の意義として、①稀少DNAの定量解析を可能とする②複数の遺伝子座の変異に対する複合的遺伝学的解析を可能とする③ランダムプライマーを用いるWGAでは、変異の部位毎のプライマー設計・条件設定が不要となる効果が発生することが挙げられ、とくにmtDNAの多様な遺伝子解析の有用性が期待される。

MDA 法は、バクテリオファージの phi29 DNA polymerase を利用し、ゲノム DNA を増幅する技術である。MDA 法による全ゲノム増幅により、鋳型 DNA のマイクログラムレベルまでの増幅が可能であった。CGH array・microarray などのゲ

ノムワイドなコピー数異常や染色体異数体の検出・同定に向けて最小量の DNA の網羅的解析の可能性が開拓された。現状では10細胞相当の100pgの鋳型DNA量が利用可能であれば、MDA法とMLPA法を組み合わせた欠失型変異を対象とする高精度の網羅的遺伝子定性解析が可能となると考えられた。さらに単一細胞からも、単回のWGAにより、引き続き複数の遺伝子解析の実施が可能であることが示された。単一細胞から得られる遺伝子の収量は20 μ g以上である。また増幅産物のmultiplex PCRとMLPA法の結果から、核ゲノムの複数遺伝子座の欠失(depletion)を主眼とした定性解析の可能性が示され、次年度以降に実施が検討されるmtDNAコピー数制御にかかわるミトコンドリア遺伝子異常の解析が望まれる。

本研究において顆粒膜細胞に1細胞あたりのmtDNAコピー数については、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。また、未受精卵、未分割胚のmtDNAコピー数と顆粒膜細胞のmtDNAコピー数との間に正の相関の可能性が示された。ミトコンドリアはadenosine diphosphateがadenosine triphosphateに変化させる酸化的リン酸化に重要な器官である。卵細胞内のATP活性の状況が着床や胚の発育の障害の原因になると考えられている。mtDNAにdeletionや点変異が存在すると、free radicals clearanceが低下し、mtDNAの酸化的損傷の結果である8-hydroxyguanosineの蓄積を生じ、

mtDNAの酸化的損傷は呼吸鎖蛋白の合成障害を惹起し、活性酸素の産生増大や新たなmtDNAの変異を引き起こす悪循環が生まれることが示唆される。その結果、胚細胞が障害され、着床障害の原因となりうることが考えられた。

E. 結論

WGAによる単一細胞の網羅的解析が可能となり、mtDNAの多様な変異に関する解析の道を開いた。未受精卵、未分割胚のmtDNAコピー数と顆粒膜細胞のmtDNAコピー数との間に正の相関の可能性が示される。mtDNAコピー数がもたらす細胞の代謝活性が卵子、顆粒膜細胞の胚発生に関わる重要な鍵になりうることが示唆された。

F. 研究発表

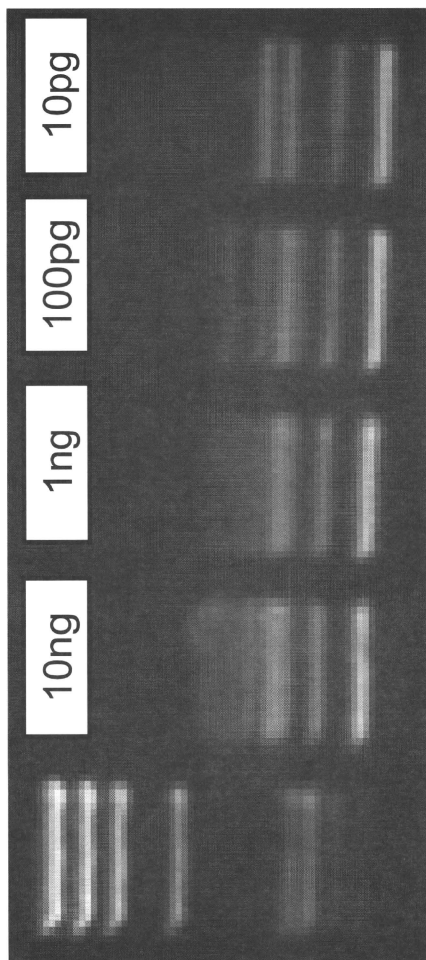
佐藤 卓、末岡 浩、中林 章、櫻井友義、渡邊広是、村越行高、佐藤健二、大澤淑子、高橋香織、橋場剛士、青木大輔、吉村泰典：複数の遺伝子座に変異を有する疾患に対するWhole genome amplification (WGA)法を用いた着床前遺伝子診断法の構築。“第62回日本産科婦人科学会学術講演会” 2010.4.23-25 (東京都)

佐藤 卓、末岡 浩、吉村泰典：着床前診断新技術とその展望。“第28回日本受精着床学会” 2010.7.28-29, (神奈川)

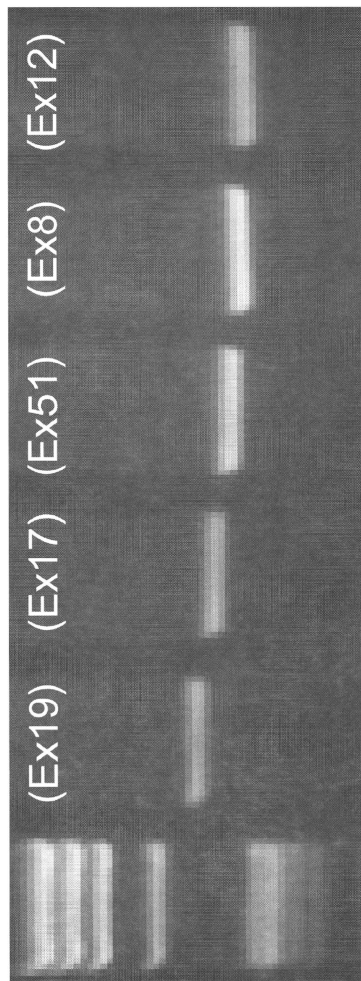
櫻井友義、末岡 浩、高橋香織、佐

藤 卓、 佐藤健二、 渡邊広是、 大澤淑子、 橋場剛士、 吉村泰典: Whole Genome Amplification (WGA) 法による triplet repeats の診断は着床前遺伝子診断 (PGD) に適応できるか? “第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会”
2010. 11. 11-12 (徳島)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

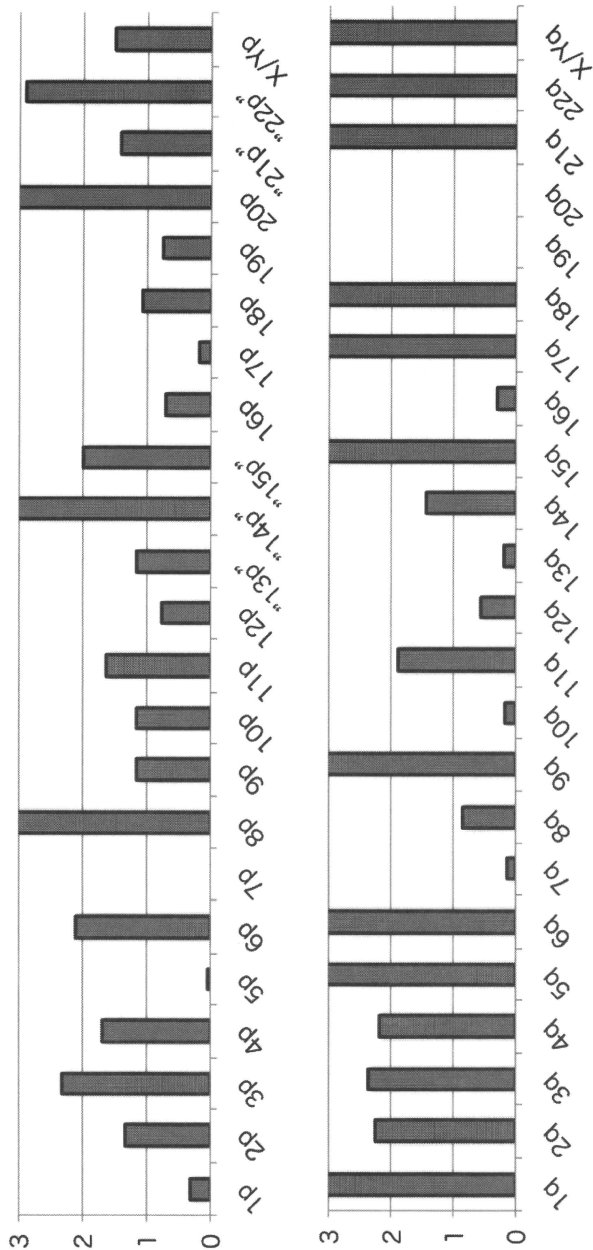


□内は
鋳型DNA量



()内
は
増幅された
部位(exon)の
番号

図1. 正常男性DNA MDA産物に対するChamberlainのmultiple primerを用いたmultiplex PCR後の電気泳動の結果(上)と、10pg群におけるband非検出部位に対する、それぞれの当該primerを用いたsingleplex PCR後の電気泳動の結果(下)



図説2. 単一細胞のMDA産物の各種遺伝子解析結果: MLPA法による染色体コピー数解析の結果
 縦軸は算出された相対コピー数である。MLPA法による染色体サブテロミア領域における特異プローブを用いたコピー数解析を
 実施した結果、コピー数にはばらつきを生じたが、全染色体の93%のexonで増幅が確認された。

子宮内膜症における病態の解明と新規治療薬の探索

研究分担者 楯原 久司 大分大学医学部産科婦人科教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

本研究は、大分大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

また、研究の対象とした症例には、事前に十分な説明を行い、文書による同意を得て、組織を採取した。

C. 研究結果

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_Lの発現を抑制した。一方、バルプロ酸はBcl-X_Lの発現のみを抑制した。

D. 考察

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与することが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

E. 結論

子宮内膜症の病態形成のメカニズムには、ヒストンの脱アセチル化をはじめとするエピジェネティックな異常に関与していると推測される。さらにヒストン脱アセチル化阻害剤は、子宮内膜症の治療薬として有望であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Masakazu Nishida, Hisashi Narahara. Aromatase inhibitors for the medical treatment of endometriosis. Ed: Jean R. Lamonte. Aromatase Inhibitors: Types, Mode of Action and Indications. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA. pp. 95-111, 2010.

2) Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Yukie Kawano, Hisashi Narahara. Roles of mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK)-mediated signaling pathway in endometriosis-associated fibrosis. Ed: Lucy A. Mitchell. Endometriosis: Symptoms, Diagnosis and Treatments. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA. pp. 197-212, 2010.

3) Kaei Nasu, Akitoshi Yuge, Akitoshi Tsuno, Hisashi Narahara.

Mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK)-mediated signaling pathway as a therapeutic target for the treatment of endometriosis-associated fibrosis. Curr Signal Transduct Ther 2010; 5 (2): 141-148.

4) Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Marina Hirao, Hironao Kobayashi, Akitoshi Yuge, Hisashi Narahara. Heparin is a promising agent for the treatment of endometriosis-associated fibrosis. Fertil Steril 2010; 94 (1): 46-51.

5) 西田正和, 榎原久司. 妊孕性向上のための内膜症治療 ジエノゲスト. 産と婦 2010; 77 (7): 828-832.

6) 奈須家栄, 榎原久司. 子宮内膜症におけるアポトーシスの異常とアポトーシスを誘導する薬物療法の可能性. 産婦治療 2010; 101 (3): 317-320.

7) 津野晃寿, 榎原久司. 性ホルモン製剤の疾患別選択. 産婦実録 2010; 59 (1): 1-20.

8) 川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 高井教行, 黎海莉, 安達正武, 吉田俊恵, 河野康志, 榎原久司. 培養子宮内膜症細胞に対するバルプロ酸のエピジェネティック修飾効果についての検討. 日エンドメトリオーシス会誌 2010; 31: 222-224.

2. 学会発表

1) 2010 Society for Gynecologic Investigation 57th Annual Meeting (Orlando, Florida, USA) March 24-27, 2010.

Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Yukie Kawano, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara. Decidualization attenuates the contractility of endometriotic stromal cells.

2) 2010 Society for Gynecologic Investigation 57th Annual Meeting (Orlando, Florida, USA) March 24-27,

2010.

Yukie Kawano, Kaei Nasu, Masakazu Nishida, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara. Application of the nuclear factor- κ B inhibitor, BAY 11-7085, for the treatment of endometriosis.

3) The First Asian Conference on Endometriosis (ACE I) (Shanghai, China) October 16-17, 2010.

Yukie Kawano, Kaei Nasu, Masakazu Nishida, Wakana Abe, Hisashi Narahara. Application of the nuclear factor- κ B inhibitor, BAY 11-7085, for the treatment of endometriosis.

4) The First Asian Conference on Endometriosis (ACE I) (Shanghai, China) October 16-17, 2010.

Wakana Abe, Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Yukie Kawano, Hisashi Narahara. Decidualization attenuates the contractility of endometriotic stromal Cells.

5) 第31回日本エンドメトリオーシス学会(京都市)2010年1月16日-17日川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 安達正武, 吉田俊恵, 河野康志, 楢原久司. 子宮内膜症に対するバルプロ酸の治療効果についての検討.

6) 第31回日本エンドメトリオーシス学会(京都市)2010年1月16日-17日津野晃寿, 奈須家栄, 安達正武, 川野由紀枝, 吉田俊恵, 河野康志, 楢原久司. 子宮内膜症による癭痕化に対するFasudilの効果.

7) 第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(東京都)2010年4月23日-25日

川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 安達正武, 河野康志, 楢原久司. 子宮内膜症に対するバルプロ酸の治療効果についての検討.

8) 第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(東京都)2010年4月23日-25日

津野晃寿, 奈須家栄, 安達正武, 川野由紀枝, 河野康志, 楢原久司. 子宮内膜症による癭痕化に及ぼすFasudilの影響.

9) 第28回日本受精着床学会総会・学術講演会(横浜市)2010年7月28日-29日

奈須家栄, 津野晃寿, 弓削彰利, 川野由紀枝, 河野康志, 楢原久司. 子宮内膜症による癭痕化に対するヘパリンの効果.

10) 第28回日本受精着床学会総会・学術講演会(横浜市)2010年7月28日-29日

川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 高井教行, 安達正武, 河野康志, 楢原久司. 培養子宮内膜症細胞に対するバルプロ酸のエピジェネティック修飾効果についての検討.

11) 第55回日本生殖医学会総会・学術講演会(徳島市)2010年11月11日-12日 奈須家栄, 弓削彰利, 津野晃寿, 川野由紀枝, 河野康志, 楢原久司. 子宮内膜間質細胞のcontractilityに対する tumor necrosis factor- α の作用.

12) 第55回日本生殖医学会総会・学術講演会(徳島市)2010年11月11日-12日 川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 阿部若菜, 高井教行, 河野康志, 楢原久司. 培養子宮内膜症細胞に対するHDAC inhibitorのエピジェネティック修飾効果についての検討.

13) 第55回日本生殖医学会総会・学術講演会(徳島市)2010年11月11日-12日 西田正和, 奈須家栄, 古川雄一, 津野晃寿, 楢原久司. 子宮内膜症細胞におけるinterferon γ により惹起されるアポトーシスの検討.

14) 第55回日本生殖医学会総会・学術講演会(徳島市)2010年11月11日-12日 津野晃寿, 奈須家栄, 川野由紀枝, 阿部若菜, 西田正和, 古川雄一, 河野康志, 楢原久司. 子宮内膜症による癭痕化に対するfasudil dihydrochlorideの効果.

15) 第55回日本生殖医学会総会・学術講演会(徳島市)2010年11月11日-12日

阿部若菜, 奈須家栄, 津野晃寿, 弓削彰利, 川野由紀枝, 河野康志, 榎原久司.
子宮内膜症による癒痕化に対する simvastatin の効果.

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

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

研究分担者 大須賀 穰 東京大学医学部講師

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。近年、子宮内膜症は慢性炎症性疾患として理解されるようになってきたが、その病態については不明な点が多い。今回我々は、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。方法は、卵巣子宮内膜症性嚢胞から子宮内膜症の間質細胞(ESC)を分離培養し、まずTGF β 、IL-1 β 、TNF α にて刺激してPAR2mRNA発現をRT-PCRで測定した。TGF β のみPAR2発現を増加させたため、TGF β 刺激後PAR2 agonist peptide (PAR2AP)を添加し、上清中のIL-6をELISAで測定した。TGF β 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 β 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。つぎに、ESCにPAR2siRNAを導入し、TGF β 、PAR2AP刺激後のIL-6を測定した結果、TGF β 前投与の増強作用は、PAR2siRNA導入により消失した。また、各種阻害薬を用いた実験によりTGF β によるPAR2の発現増加作用はMAPキナーゼ系を介することが示唆された。以上より、TGF β 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。

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。子宮内膜症患者の腹腔内貯留液内ではサイトカン、成長因子などの液性成分や細胞成分が変化しており、またそれらが複雑に関与しあい、子宮内膜症の発症、進展に寄与していると考えられている。具体的には、活性化マクロファージ、肥

満細胞、リンパ球、好酸球などの炎症細胞や、transforming growth factor (TGF)- β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10などの炎症性サイトカンの増加を認めている。近年、これらに加え、子宮内膜症細胞に発現する proteinase-activated receptor 2 (PAR2)が子宮内膜症の発展に重要な役割を担うことが注目されるようになってきた。PAR2は活性化された肥満細胞や好中球から分泌される特定のプロテアーゼによって特異的に活性化される三量体Gタンパクと共役した7回膜貫通型受容体であり、様々な組織において向炎症的に働く受容体である。トリプターゼなどの酵素がPAR2分子の細胞外アミノ末端側ペプチド鎖を特定の部位で切断することにより新しいアミノ末端ペプチド鎖を露出させ、これが同じ受容体分子の細胞外第2ループに結合後、細胞内にシグナルが誘起される。実験系では合成されたペプチド (PAR2 agonist peptide, PAR2AP) を外来性に与えることにより、アミノ酸末端側ペプチドを切断することなく受容体の活性化を誘起することができる。PAR2は子宮内膜症性間質細胞 (EmSC)において活性化されると、炎症性サイトカンであるIL-6, IL-8がなどの分泌を増加させ、また、EmSCの細胞増殖を促進する。このような作用により、PAR2は子宮内膜症の増悪を促進していると考えられている。しかしながら、これまで子宮内膜症においてPAR2の発現調節因子は明らかではなかった。そこで子宮内膜症で重要とされるサイトカンのPAR2の発現調節に与える影響について検討した。

B. 研究方法

書面によるインフォームドコンセントの上、子宮内膜症性卵巣嚢胞に対する手術時に採取し、病理組織学的に子宮内膜症と診断されたものを用いた。子宮内

膜症性卵巣嚢胞からEmSCを分離培養し以下の実験に用いた。EmSCにTGF- β 10ng/ml, IL-1 β 10ng/ml, TNF α 1ng/mlを6時間添加し、PAR2 mRNA発現をRT-PCRにて測定した。TGF- β のみが反応を示したため、ここからはTGF- β について検討した。EmSCにTGF- β 10ng/mlを0, 3, 6, 12, 24時間添加し経時的反応を、TGF- β 0, 1, 5, 10ng/mlを6時間添加し容量反応を調べた。PAR2APが起こすEmSCからのIL-6分泌に対してTGF- β の前投与が与える影響を調べるために、まずEmSCをTGF- β 10ng/ml, 24時間で刺激し、その後PAR2AP 30 μ M, 24時間刺激し、上清中のIL-6をELISAにて測定した。TGF- β のtype I receptorの阻害剤であるSB431542のPAR2 mRNAに対する影響をみるために、EmSCをSB431542 10 mM添加、TGF- β 10ng/ml 6時間添加した。SB431542のPAR2AP刺激によるIL-6分泌に対する影響を調べるために、SB431542 10mM, TGF β 10ng/ml 24時間添加、PAR2AP 30 μ Mで24時間刺激した。またPAR2 siRNAを導入したうえで、TGF- β 10ng/ml, 24時間で刺激し、その後PAR2AP 30 μ M, 24時間刺激し、上清中のIL-6を測定した。TGF- β の細胞内シグナル伝達にはSmad経路と

mitogen-activated protein kinase

(MAPK) 経路が存在する。このうちMAPK経路を調べるために、EmSCをp38 MAPK, p42/44 MAPK, stress-activated protein kinase /c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)それぞれの阻害剤にて30分刺激し、その後TGF- β (10ng/ml)で6時間刺激した。またSmad経路についてはSmad4 siRNAを導入し、TGF- β (10ng/ml)で6時間刺激し、PAR2 mRNA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

EmSCにおいてTGF- β (10ng/ml)はPAR2 mRNAを約2倍に増加させたが、IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (1ng/ml)はその作用を示さなかった。TGF- β のPAR2 mRNAに対する作用をさらに詳細に検討したところ、経時的な変化では6時間後にピークを認め約3.2倍に増加した。またTGF- β は濃度依存性にPAR2 mRNAを増加させ、以上で対象に比し有意差が認められた。EmSCにおいてPAR2AP刺激によってIL-6が分泌されることが報告されている。TGF- β 前投与はこの作用をさらに増強した。この増強作用はTGF- β の濃度依存性にみられた。PAR2AP刺激のみではIL-6分泌はPAR2AP刺激前と比べ2.8倍であるが、TGF- β 前投与によりこの比は約9.8倍となった。TGF- β のtype I受容体阻害剤であるSB431542はTGF- β によるPAR2 mRNA発現を抑制した。また、TGF- β がPAR2APによるIL-6分泌を増強させる効果も抑制した。PAR2 siRNAはEmSCにおけるPAR2 mRNA発現を約6%に抑制した。この条件下において、TGF- β がPAR2APによるIL-6分泌を増強させる効果を抑制した。このことよりTGF- β 添加、PAR2AP添加条件下でのIL-6分泌はPAR2を介していることが分かった。TGF- β の細胞内シグナル伝達経路についての検討で、Smad経路とMAPK経路のどちらの経路を介しているか調べるために、Smad4 siRNA導入またはMAPK阻害剤を使用した。MAPK阻害剤のうちp38 MAPKの阻害剤とp42/44 MAPKの阻害剤がTGF- β によるPAR2 mRNA発現を抑制した。Smad4 siRNA導入によりSmad4 mRNAは約2.2%に抑制され、Smad4のタンパク量の減少も認めたが、この条件下ではTGF- β によるPAR2発現は抑制を受けなかった。

D. 考察

PAR2発現調節はこれまで他の細胞においていくつかの報告がある。変形性膝

関節症の軟骨細胞ではIL-1 β 、TNF- α 、TGF- β がPAR2発現を増加させ、皮膚の線維芽細胞においてはTGF- β が、ヒト腓肭静脈内皮細胞ではIL-1 β やTNF- α がPAR2を増加させる。今回の結果では子宮内膜症間質細胞においてはIL-1 β 、TNF- α ではPAR2発現は変化せず、これらのうちTGF- β のみがPAR2 mRNA発現を増加させた。以上よりPAR2発現調節の反応は細胞によって異なると考えられた。TGF- β は広く生体内に分布している多機能のサイトカンであり、細胞増殖、分化、アポトーシス、血管新生などの様々な役割を様々な組織において果たす。癌においては癌の浸潤、転移や癌抑制などの二面的な作用があるといわれている。ほかにも線維症、免疫疾患、血管病変、骨軟骨疾患などにTGF- β のシグナル異常が関与するといわれている。このためこれらの疾患で治療のターゲット候補として研究が進められている。子宮内膜症においては腹腔内貯留液、また卵巣子宮内膜症性嚢胞内容液にその濃度の増加がみられ、免疫染色では子宮内膜症組織に発現する。機能としては子宮内膜症の増悪因子であるcolony-stimulating factor (CSF)-1を促進し、また腹膜中皮細胞に子宮内膜上皮細胞が侵入する細胞侵入モデルにおいてその作用を促進するという報告があり、TGF- β は子宮内膜症を増悪因子させる重要なサイトカインと考えられている。本研究でも、TGF- β がPAR2 mRNA発現を増強させ、PAR2刺激によるIL-6分泌を増加させた。IL-6は子宮内膜症患者の腹腔内貯留液に増加している。よって子宮内膜症で増加しているTGF- β がこのIL-6の増加に寄与していることも考えられる。またIL-6はマクロファージの活性化、子宮内膜細胞の細胞増殖、子宮内膜症においてアロマターゼ活性化、hepatoglobinなどの産生をおこし、子宮内膜症の増悪にかかわる。ゆえにTGF- β がIL-6を増加させることは、子宮内膜症の進展にかかわつ

ていると考えられる。本研究ではTGF- β がPAR2のシステムを介し、子宮内膜症の増悪に関与していることを示した。本研究以外にもTGF- β が子宮内膜症に関連し増悪因子であると報告があり、治療のターゲットになると思われる。しかし、TGF- β は広く生体内に分布しているうえに、癌に対しては抑制と促進の二面性を持つように、多彩な作用を持つため、さらなる検討が必要と考えられる。本研究で明らかにしたTGF- β がMAPKを介しPAR2を増加させてIL-6分泌作用を増強するという機序は、子宮内膜症の病態解明の一助になると考えられる。

E. 結論

子宮内膜症で増加しているTGF- β が、子宮内膜症間質細胞に作用してMAPKを介してPAR2の発現を増加させることにより、IL-6の分泌を亢進させるという、子宮内膜症進展における巧妙な機序が示唆された。この一連の過程を遮断することが子宮内膜症の治療につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shi J., Yoshino O., Osuga Y., Koga K., Hirota Y., Nose E., Nishii O., Yano T., Taketani Y. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells. *Am J Reprod Immunol.* (in press)
- 2) Harada M., Osuga Y., Izumi G., Takamura M., Takemura Y., Hirata T., Yoshino O., Koga K., Yano T., Taketani Y. Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study. *Gynecol Endocrinol.* (in press)
- 3) Wada-Hiraike O., Osuga Y., Hiroi

H., Fujimoto A., Maruyama M., Yano T., Taketani Y. Sessile polyps and pedunculated polyps respond differently to oral contraceptives. *Gynecol Endocrinol.* (in press)

- 4) Harada M., Hiroi H., Fujiwara T., Fujimoto A., Kikuchi A., Osuga Y., Momoeda M., Kugu K., Yano T., Taketani Y. Case of chronic ectopic pregnancy diagnosed in which the complete shape of the fetus was visible by ultrasonography. *J Obstet Gynaecol Res.* 36:462-465, 2010.

- 5) Hasegawa A., Yoshino O., Osuga Y., Kodama A., Takamura M., Nishii O., Taketani Y. Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model. *Fertil Steril.* 93:2757-2759, 2010.

- 6) Hirata T., Osuga Y., Takamura M., Kodama A., Hirota Y., Koga K., Yoshino O., Harada M., Takemura Y., Yano T., Taketani Y. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology.* 151:5468-5476, 2010.

- 7) Hirota Y., Acar N., Tranguch S., Burnum K.E., Xie H., Kodama A., Osuga Y., Ustunel I., Friedman D.B., Caprioli R.M., Daikoku T., Dey S.K. Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:15577-15582, 2010.

- 8) Isono W., Tsutsumi R., Wada-Hiraike O., Fujimoto A., Osuga Y., Yano T., Taketani Y. Uterine artery pseudoaneurysm after cesarean section: case report and literature review. *J Minim Invasive Gynecol.* 17:687-691, 2010.

9) Yoshino O., Hayashi T., Osuga Y., Orisaka M., Asada H., Okuda S., Hori M., Furuya M., Onuki H., Sadoshima Y., Hiroi H., Fujiwara T., Kotsuji F., Yoshimura Y., Nishii O., Taketani Y. Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids. Hum Reprod. 25:2475-2479, 2010.

10) Mori M., Kitazume M., Ose R., Kurokawa J., Koga K., Osuga Y., Arai S., Miyazaki T. Death effector domain-containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice. J Clin Invest. 121:318-327, 2011.

11) Taguchi A., Koga K., Osuga Y., Fujimoto A., Miyasaka A., Yano T., Kurokawa M., Taketani Y. Successful management of a ruptured endometrial cyst in acute leukemia. Fertil Steril. 95:292 e291-293, 2011.

2. 学会発表

1) 吉野修, 大須賀穣, 矢野哲, 西井修, 武谷雄二. ヒト卵巣における bone morphogenetic proteins 2(BMP2)の役割に関する検討. 第62回日本産科婦人科学会 平成22年4月24日東京

2) 高村将司, 甲賀かをり, 泉玄太郎, 児玉亜子, 田島敏樹, 長谷川亜希子, 竹村由里, 原田美由紀, 吉野修, 大須賀穣, 武谷雄二. 腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術後の再発率低下に低用量ピル(OC)は有益である. 第62回日本産科婦人科学会 平成22年4月24日東京

3) 児玉亜子, 大須賀穣, 吉野修, 泉玄太郎, 高村将司, 長谷川亜希子, 竹村由里, 平田哲也, 甲賀かをり, 矢野哲, 武谷雄二. TGF β は子宮内膜症細胞において PAR2 の発現ならびに機能を増強する. 第62回日本産科婦人科学会 平成22年4月24日東京

4) 泉玄太郎, 平田哲也, 甲賀かをり,

大須賀穣, 高村将司, 小倉さやか, 児玉亜子, 北麻里子, 竹村由里, 森本千恵子, 矢野哲, 武谷雄二. 子宮腺筋症に対する Dienogest の効果. 第62回日本産科婦人科学会 平成22年4月24日東京

5) 平池修, 大須賀穣, 竹村由里, 小泉美奈子, 甲賀かをり, 廣井久彦, 藤本晃久, 丸山正統, 百枝幹雄, 久具宏司, 矢野哲, 武谷雄二. 子宮内膜ポリープに対する黄体・卵胞ホルモン混合製剤の効果についての検討. 第62回日本産科婦人科学会 平成22年4月24日東京

6) 矢野直美, 大須賀穣, 矢野哲, 藤本晃久, 北村邦夫, 武谷雄二. レボノルゲストレル(LNG)単独投与による緊急避妊の作用機序の検討. 第62回日本産科婦人科学会 平成22年4月24日東京

7) 鶴賀哲史, 川名敬, 有本貴英, 土谷聡, 中川俊介, 大須賀穣, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二. 鼠径部腫瘍を発症した真性半陰陽の一例. 第119回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年6月13日東京

8) 宮坂亜希, 川名敬, 藤井知行, 大須賀穣, 中川俊介, 上妻志郎, 武谷雄二. 術前診断に苦慮した妊娠初期に脱落膜変化した子宮内膜症性卵巣嚢胞の1例. 第119回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年6月13日東京

9) 大橋奈尾子, 嘉本寛江, 永松健, 吉田志朗, 兵藤博信, 大須賀穣, 亀井良政, 藤井知行, 上妻志郎, 武谷雄二. 鎌状赤血球症合併妊娠の一例. 第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

10) 齊藤泉, 磯野涉, 土谷聡, 甲賀かをり, 川名敬, 中川俊一, 大須賀穣, 百枝幹雄, 矢野哲, 武谷雄二. 水腎症をきたして発見された特異部位子宮内膜症の一例. 第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

11) 長坂貴顕, 中江華子, 藤本晃久, 大

須賀穰，矢野哲，武谷雄二．当科における単孔式腹腔鏡下手術の現況．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

12) 宮下真理子，原田美由紀，藤本晃久，大須賀穰，矢野哲，武谷雄二．当科における過去5年間の腹腔鏡下手術に伴う合併症の検討．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

13) 後藤美希，山口俊一，兵藤博信，大須賀穰，亀井良政，藤井知行，上妻志郎，武谷雄二．腹腔内異物のように描出された油性造影剤の長期遺残の1例．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

14) 荒川敬一，松本陽子，有本貴英，土谷聡，織田克利，川名敬，中川俊介，大須賀穰，百枝幹雄，矢野哲，上妻志郎，武谷雄二．遠隔転移をきたした卵巢粘液性腺癌 pT1a 期の2例．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

15) 高橋千波，小泉美奈子，藤本晃久，中澤明里，中尾美木，大須賀穰，百枝幹雄，矢野哲，武谷雄二．診断に苦慮した卵巢外子宮内膜症性嚢胞の2症例．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

16) 松本玲央奈，保谷茉莉，梁井葉子，永松健，兵藤博信，大須賀穰，亀井良政，藤井知行，上妻志郎，武谷雄二．ハプトグロビン欠損症合併妊娠の分娩管理に対する考察．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

17) 神尊貴裕，北麻里子，兵藤博信，小松篤史，吉田志朗，大須賀穰，亀井良政，藤井知之，上妻志郎，武谷雄二．妊娠後期に統合失調症が増悪し，電気けいれん療法で改善を認め満期産に至っ

た一例．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

18) 井上恵莉，土屋聡，織田克利，川名敬，中川俊介，大須賀穰，百枝幹雄，矢野哲，武谷雄二．卵管采原発の卵管癌の1例．第120回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成22年11月28日つくば市

19) 広田泰，DeyS.K.，大須賀穰，上妻志郎，武谷雄二．子宮のp53欠損は早産を誘導する．第15回生殖内分泌学会 平成22年11月21日 豊中市

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（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

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

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

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。

A. 研究目的

活性酸素が老化や各種疾患に関与することは広く知られている。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原因の一つとなる可能性が指摘されている。我々はこれまでに、活性酸素消去能の低下により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が増し、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事を明らかにした。また最近になって、新規抗酸化酵素の一つ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。そのために、1. SOD1-KOマウスの卵子における受精ならびに発生過程について解析することで、内因性に生じる酸化ストレスの影響を明らかにする。2. 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、活性酸素ならびに酸化産物の還元解毒化に働くため、その主要な供給源で

あるペントースリン酸経路の活性亢進によって妊孕性が高まる可能性が指摘されている。そこで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)の卵巣機能や胚の発生過程に果たす役割を明らかにするためにヒトG6PDを発現するトランスジェニックマウス(hG6PD-Tg)の作製と解析を行う。さらに、3. Prx4については、精子形成に関与する可能性が高いため、精子形成ならびに男性不妊との関連に着目して、その遺伝子産物の機能解明を行う。

B. 研究方法

本研究に関わる遺伝子組換え実験は「山形大学遺伝子組換え実験安全委員会」の承認の下に、また動物実験は「山形大学動物実験委員会」の承認の下に行われた。

1. 酸化ストレスによる受精・発生障害機構の解明

1) 体外成熟・受精・発生(IVMFC)させたSOD1-KO卵と胚について解析した。過排卵処理で得られた排卵卵子と卵核胞期卵子を成熟させて、野生型マウスの精子で受精させ、細胞分裂過程について調べた。

2) 20%酸素下に培養したSOD1欠損胚が細胞分裂を停止した原因を明らかにするために、細胞周期の進行に必須のCdk1を活性化するCyclinの発現をウエスタンブロットにより、代表的なCdk Inhibitor遺伝子(p16, p19, p21, p27)のmRNAの発現を

RT-PCRにより解析した。

3) アポトーシスにはミトコンドリアが深く関わっていることから、SOD1欠損胚の細胞死にミトコンドリアがどのように関与するかを明らかにするために、Cytochrome cとGreen Fluorescent Protein (GFP) の融合遺伝子(Cyt-c/ GFP)を発現を可能とするCAGプロモーターでCyt-c/GFP融合遺伝子をドライブするベクターを作製した。定法によりマウス胚にマイクロインジェクションし、偽妊娠雌マウスに移植した。

2. hG6PD-Tgマウスの作製と解析

NADPHを産生し反応を律速するヒト野生型 (hwt) G6PDを発現するhwtG6PD-Tgマウスと、貧血患者で見出された変異型 (hmt) G6PDを発現するhmtG6PD-Tgマウスの作製を行った。まずloxP-STOP-loxP配列をプロモーター上流に持つプラスミドを作製し、loxP-hwtG6PD-TgとloxP-hmtG6PD-Tgマウスを作製した。本マウスと臓器特異的に Creを発現するマウスを交配することで臓器特異的にhwtG6PDを発現するマウスの作製が可能であるが、まずはCreを全身に発現するCre-Tgマウスと交配し、hG6PDを全身に発現するマウスを作製した。

3. Prx4の精巣における機能の解析

野生型マウスと我々が作製したPrx4-K0マウスについて、精巣におけるPrx4の発現に関して、RT-PCR・ウェスタンブロット・免疫染色による解析を行った。Prx4には全身性に発現する転写産物に加えて、精巣特異的に発現する転写産物が見出されたため、精巣特異的Prx4タンパク質だけを認識する抗体の作製を行い、その抗体を用いた解析を行った。

C. 研究結果

1. 酸化ストレスによる受精・発生障害機構の解析

1) IVFIC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-K0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。

2) Cdk/cyclinの活性を制御する代表的なCdk Inhibitor遺伝子(p16, p19, p21, p27)について、RT-PCR解析を行ったところ、細胞老化に深く関する事が知られているp16とp19の発現が著しく亢進している事が分った。また、M期でCdk 1の活性化に働くCyclin Bのタンパク質量が低下していることが明らかになった。

3) Cytochrome cとGFPの融合遺伝子が発現するTg (Cyt-c/GFP-Tg)マウスを作製するために、CAGプロモーターの下流にCyt-c/GFP融合遺伝子を導入したプラスミドコンストラクトを作製した。マウス受精卵にマイクロインジェクションし、偽妊娠雌マウスに移植しているの、誕生を待つて解析に供する予定である。

2. hG6PD-Tgマウスの作製と解析

コンディショナルhG6PD-Tgマウスを作製するために、ヒト野生型 (hwt) と変異型 (hmt) のG6PDとloxP配列を組込んだプラスミドベクターを作製し、loxP-hG6PD-Tgマウスを得た。全身に過剰発現するG6PDの影響を調べるために、まずCre recombinaseを全身に発現するCre-Tgマウスと交配し、全身にhG6PDを発現するマウスを作製した。得られた仔の遺伝子型の解析から、その仔のうちの何匹かに目的とするhwtG6PD-Tgマウスの存在が確認できた。hmtG6PD-Tgマウスについては、現在交配中である。両系統のG6PD-Tgマウスが得られたら、その卵巢機能ならびに卵・胚の解析を行う予定である。

3. Prx4の精巣における機能の解析

Prx4は性成熟した精巣でのみ高分子型が発現することから、まず最近我々が作製したPrx4-K0マウスの精巣における発現について調べた。その結果、野生型マウスに比べて、発現量は低下しているものの、週齢の進んだPrx4-K0マウスでも高分子型Prx4だけは発現していることが分

かった。マウスのゲノムデータベースの検索により、プロモーター/第1エクソンの異なる転写産物が存在する事が分かったので、RT-PCRにて転写産物を確認した。以後、全身に発現する転写産物と精巣特異的に発現する転写産物を、それぞれ Prx4aとPrx4bとして区別する。Prxbは第1エクソンにコードされるアミノ酸だけが異なるので、その配列を認識する抗体を作製し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、Prx4bタンパク質は性成熟した精巣にのみ発現していることを確認した。精巣の免疫組織染色でも、精子形成への分化段階にある細胞で高発現が見られることが分かった。

Prx4bの機能を詳しく解析するためには、培養細胞を用いた検討が有効であるため、発現細胞の検索を行ったところ、調べた二十数種類の株細胞のうち、セミノーマ由来の1細胞にのみ発現が認められたので、本細胞を用いた解析を行っている。これまでのところ、siRNAによるノックダウンでは増殖能などに影響は認められていない。

D. 考察

1. 酸化ストレスによるSOD1-KO胚の発生障害機構を解析したところ、SOD1欠損によってもたらされる活性酸素の増加は、細胞分裂に関する特定の因子に作用しその機能傷害をもたらすことが分かった。これは、胚に過酸化水素などを外から加えて行った検討について報告されているミトコンドリア傷害や細胞死と異なる結果である。このように外因性の活性酸素に対し、内因性に生じる活性酸素は、酸化に対して感受性の高い細胞分裂機構に特異的に作用する事が示唆されたため、細胞周期の進行に関わるCdkならびにCdk inhibitorsについて検討したところ、Cyclin Bの低下とp16およびp19といったCdk inhibitorsの発現亢進が認められた。こうした分子が酸化ストレスによりどのような影響を受けるのか明らかにするこ

とで、生理的な酸化障害について明らかにできると考える。

一方、4細胞期で酸化ストレスに曝されたSOD1-KO胚が細胞死を起こすことについては、ミトコンドリアの関与が考えられたため、アポトーシスの誘導に重要なCyt-cの細胞内挙動を知るためにCyt-c/GFP-Tgマウスの作製を行っている。本マウスの胚ではCyt-cを可視化できるため、細胞死の解析にとって有用な情報が得られると考える。

2. 受精ならびに胚発生に大きな影響を与えるレドックス系を制御するG6PDを過剰発現するhG6PD-Tgマウスが得られた。今後hwtG6PD-TgとhmtG6PD-Tgマウスの卵巣・精巣・卵子・精子・胚について解析する事で、NADPH供給の増加によるレドックス能の亢進が、卵巣機能や胚の発生能にどのように寄与するか解明する事ができると考える。

3. 活性酸素シグナルを制御することで精巣・精子の機能に関ると考えられるPrx4については、これまで精巣でのみ高分子型として検出されたPrx4が、遺伝子の5'上流のプロモーターから転写される精巣特異的エクソン1からの転写産物である事が明らかになった。この精巣型Prx4bを認識する特異抗体と発現細胞を用いた解析を行う事で、Prx4bの精子形成への関与について明らかにできると考えられる。

E. 結論

内因性に生じる酸化ストレスは、胚の細胞分裂機構に特異的に作用する事で、発生異常をもたらすことが分かった。レドックス能を高めることで、こうした障害を改善し妊孕性が高まる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) [Fuji J, Tsunoda S](#)

Redox regulation of spermatogenic

process and fertilization
Asian J Androl, *review*, in press, 2011
2) Fujii J, Ito JI, Zhang X, and Kurahashi T.
Unveiling the Roles of the Glutathione Redox System In Vivo by Analyzing Genetically Modified Mice.
J. Clin. Biochem. Nutr. *review*, in press, 2011
3) Ikeda Y, Nakano M, Ihara H, Ito R, Taniguchi N, Fujii J. Different consequences of the reactions with hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide in the hyperoxidative inactivation of rat peroxiredoxin-4. J Biochem, in press, 2011.
4) 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, 16, 441-451, 2010.
5) 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, 48, 935-944, 2010.
6) Ikeda Y, Ito R, Ihara H, Okada T, and Fujii J. Expression of N-terminally truncated forms of rat peroxiredoxin-4 in insect cells. Protein Expr Purif. 72, 1-7, 2010.
7) Iuchi Y, Roy D, Okada F, Kibe N, Tsunoda S, Suzuki S, Takahashi M, Yokoyama H, Yoshitake J, Kondo S, Fujii J. Spontaneous skin damage and delayed wound healing in SOD1-deficient mice. Mol Cell Biochem, 341, 181-194, 2010.
8) Bertolotti M, Yim SH, Masciarelli S, Kim YJ, Garcia-Manteiga JM, Vene' R, Iuchi Y, Kang MH, Fujii J, Rubartelli

A, Rhee SG, Sitia R. B to plasma cell terminal differentiation entails oxidative stress and profound reshaping of the antioxidant responses. Antioxid Redox Signal, 13, 1133-1144, 2010.
9) Otaki N, Chikazawa M, Nagae R, Shimozu Y, Shibata T, Ito S, Takasaki Y, Fujii J, Uchida K. Identification of a lipid peroxidation product as the source of oxidation-specific epitopes recognized by anti-DNA autoantibodies. J Biol Chem, 285, 33834-3384, 2010.

2. 学会発表

1) Fujii J, Iuchi Y, Zhang X, Tsunoda T, and Ikeda Y. Peroxiredoxin 4 is a multifunctional redox protein working in endoplasmic reticulum and cytoplasm. International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine (FRCM2011) Jan, 2011, Kyoto
2) Tsunoda S, Kibe N, Kurahashi T, Fujii J. SOD1 deficiency induces the cellular senescence in mouse embryonic fibroblast even at low oxygen condition.
International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine (FRCM2011) Jan, 2011, Kyoto
3) Takahashi M, Miyata S, Fujii J, Ueyama S, Araki M, Soga T, Fujinaga R, Taniguchi N, Kuroki Y. The role of aldehyde reductase in biosynthesis of ascorbic acid in mice.
International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine (FRCM2011) Jan, 2011, Kyoto
4) 藤井順. SOD1 欠損マウス胎児線維芽 Prx4 の抗酸化活性による活性酸素シグナルの制御 (ワークショップ)
第33回日本分子生物学会第83回日本生化学合同年会. 2010年12月、神戸