

5) Iuchi Y, Tsunoda S, Kibe N, Suzuki S, Okada F, Fujii J. Reactive nitrogen oxide species in red blood cells are possible cause for hemolytic anemia and autoimmunity in SOD1-deficient mice.

The 6th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. June 2010, Kyoto.

6) 角田智志、木村直子、井内良仁、阿部宏之、中島修、十津川清、藤井順逸。

内因性酸化ストレス亢進によるマウス着床前胚の発生段階に依存した分裂停止および細胞死の解析。

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

7) Takahashi M, Fujii J, Araki M, Inai Y, Soga T, Miyata S, Taniguchi N, Kuroki Y. The involvement of aldehyde reductase in biosynthesis of ascorbic acid in mice.

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

8) 角田智志、岐部紀子、藤井順逸。SOD1欠損マウス胎児線維芽細胞を用いた酸化ストレスによる細胞死と増殖抑制機構の解析。

第63回日本酸化ストレス学会、横浜、2010年6月

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

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。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 細胞を用いることが有用である可能性が高く、加齢 ES 細胞特異的な細胞の表現型が見いだすことができてきた。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結果、細胞外基質の働きが減弱する特徴を持つことが示唆された。今年度は統計的により適切な方法としてバイオロ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した。接着性及び細胞外基質の性質に機能低下がおきていることが示唆された。最終的には、老化（卵子）の評価マーカーの抽出を目指す。

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ぬ問題である。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。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ー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ロ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。最終的には、老化（卵子）の評価マーカーの抽出を目指す。

B. 研究方法

1. 加齢モデル由来ES細胞特性解析

1) 網羅的遺伝子発現解析と遺伝子オントロジー解析

実験動物マウスを用いて行う。加齢モデルを構築を目指し、加齢化モデルの胚より樹立した加齢ES細胞を対象にDNAマイ

クローレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。使用したマイクロアレイは Agilent 社 Whole Mouse Genome 4x44K (1色法) で、解析に使用したソフトウェアは GeneSpring GX10 である。対象 ES 細胞に比し加齢 ES 細胞で有意(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ロジー解析を行った。

2) 定量的リアルタイム RT-PCR 解析
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。定量的 RT-PCR 法には SYBRGreenRealtime PCR Master Mix (TOYOBO) を使用した。定量的計算には、ABI software (Applied Biosystems) を用いた。

(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、国立成育医療研究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細胞特性解析

1) 網羅的遺伝子発現解析と遺伝子オンロジー解析

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。加齢と卵子の質との関わりを念頭に、加齢 ES 細胞の

網羅的遺伝子発現解析から有意差のあった遺伝子を抽出し、細胞機能に標的をしぼり細胞機能分類を行った。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ロジー解析を行った結果、加齢 ES 細胞群で低発現遺伝子では 32 もの遺伝子オンロジータームが当てはまり、機能分類することが可能であった。加齢 ES 細胞では何らかの機能的な特性が存在することが強く示唆された。細胞活動での機能分類では、“cell adhesion”、“biological adhesion”などの細胞接着の低下が示唆され、細胞成分に関する機能分類では “extracellular”に関する機能低下が示され、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。

2) 定量的リアルタイム RT-PCR 解析

遺伝子発現に有意差のあった遺伝子群から細胞接着及び細胞外基質に関連する遺伝子を抽出し、リアルタイム定量 RT-PCR 法解析を行った。Pcdhb20 (protocadherin alpha 20)、Spon2 (spondin 2, extracellular matrix protein)、Pcdhb6 (protocadherin alpha 6) や Nrpl (neuropilin 1) は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。

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した。加齢 ES 細胞の遺伝子発現で有意差のある遺伝子群の機能分類を試みた結果細胞の接着系の機能が低下していることが示唆された。定量的リアルタイム RT-PCR 法によっても細胞接着に関連する遺伝子である Pcdhb20、Pcdha6、Nrpl、Spon2 が対象 ES 細胞群に比べて加齢 ES 細胞の遺伝子発現が減少しているということがわかった。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おきていることが示唆された。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してなりうるかも今後は検討する必要がある。そのために、バリデーションを進め、定量的にも発現に有意差のある遺伝子の機能解析から胎盤発生及び機能に関わる関連性を解析していく。

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 細胞について網羅的遺伝子発現解析から遺伝子オントロジー解析を行った。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。リアルタイム RT-PCR 法解析から Pcdhb20、Spon2、Pcdhb6 や Nrpl 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。今後は、妊娠合併症を評価する分子マーカーを見出し、加齢 ES 細胞が体外培養系の有力な実験系になることを検証する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *BiochemBiophys Res Commun.* 2010;401(3):480-486.
- 2) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One.* 2010;5(9):e13017.
- 3) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *BiotechnolBioeng.* 2010;106(6):860-870.
- 4) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010;465(7295):175-181.
- 5) 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.* 2010; 19(3):480-493.

2. 学会発表

なし

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

加齢と受精現象に関する研究

研究分担者 宮戸 健二

国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部 室長

研究要旨

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。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となる。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、エビデンスに基づいた培養法の開発に至っていないのが現状である。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。

A. 研究目的

ヒト卵子の生殖能力を維持する方法として、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。一方、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、統計学的に加齢によってヒト卵子の生殖能力が低下することが報告されているが、十分な対処方法が存在しない。

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に備わっている受精能力（例えば、融合活性）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に必要な分化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分化能力を調節・維持する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が不足しており、ヒト卵子の機能回復に関する分子レベ

ルの指標が未解明であるため、卵子の損傷度すら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アプローチから、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) 受精過程の可視化

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する。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を用い、3次元画像として再構築する。この実験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

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。一系統として、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。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)

(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・承認の後(承認番号 04-004および5-9)の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の動態解析

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EGFP-CD9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、EGFP-CD9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、EGFP-CD9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、EGFP-CD9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(卵卵腔)に存在することを見出し、ウェ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、EGFP-CD9 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、何らかの膜構造体の成分の一つとして取り込まれること、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、透過型電子顕微鏡を用いて 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り、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、成功するまでに複数回のサンプル作製を試みた。結果として、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ることが有効であり、固定中での透明帯の収縮を抑えた結果として、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、質量分析を用いるためには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、除去前と除去後のタンパク質の量を特定のタンパク質についてウェ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 との関係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 β 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。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、ピンカルカロイド系のチューブリン重合阻害であるビンブラスチンには精子と卵子の融合促進活性を有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)。

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

Kawano N, Yoshida K, Miyado K, Yoshida M. Lipid Rafts: Keys to Sperm Maturation, Fertilization, and Early Embryogenesis. *Journal of Lipids*, in press.

Kawano N., Harada Y., Yoshida K., Miyado M., Miyado K. Role of CD9 in sperm-egg fusion and its general role in fusion phenomena, *Cell Fusions: Regulation and Control*. Larsson, Lars-Inge (ed). *Springer.*, 171-184, 2010.

Ito M, Miyado K, Nakagawa K, Muraki M, Imai M, Yamakawa N, Qin J, Hosoi Y, Saito H, Takahashi Y. Age-associated changes in the

subcellular localization of phosphorylated p38 MAPK in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod.*, 16(12): 928-37, 2010.

Kawano N., Kang W., Yamashita M., Koga Y., Yamazaki T., Hata T., Miyado K, Baba T. Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the Mutant Sperm are infertile in vitro. *Biol Reprod.*, 83(3):359-69, 2010.

Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res.*, 340(3):583-94, 2010.

2. 学会発表

Ito M, Nagaoka K, Kuroda K, Kawano N, Yoshida K, Harada, Y, Shikano T, Miyado M, Oda S, Toshimori K, Mizukami Y, Murata T, Umezawa A, Miyazaki S, Miyado K. Arrest of spermatogenesis at round spermatids in PLCZ1-deficient mice. Symposium: Sperm formation and differentiation, 11th International Symposium on Spermatology, June 24th-29th, 2010.

Kawano N, Araki N, Yoshida K, Yoshida M, Miyado K. The essential role of seminal vesicle secretions on the sperm fertility in the female reproductive tract. 11th International Symposium on Spermatology, June 24th-29th, 2010.

Harada Y, Iwao Y, Miyado K. Signal transduction and function of sperm citrate synthase as a sperm factor in

vertebrate fertilization. 11th
International Symposium on
Spermatology, June 24th-29th, 2010.

Takezawa Y, Nakamura A, Sakakibara K,
Kawano N, Harada Y, Yoshida K, Umezawa
A, Miyado K. Ablation of beta-catenin
suppresses membrane localization of
E-cadherin and reduces the ability of
membrane adhesion with sperm in mouse
eggs. 11th International Symposium on
Spermatology, June 24th-29th, 2010.

宮戸健二 哺乳動物における配偶子融
合の分子認証機構. シンポジウム「植物
から学ぶ受精機構：動植物共通のアロ認
証機構を考える. 第 81 回日本動物学会
大会、東京、9月24日、2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得

発明の名称：哺乳動物卵内への細胞外物
質の導入促進剤および導入方法（特許第
4448172号）

発明者：宮戸 健二、宮戸 真美、阿久
津 英憲

2. 実用新案登録 特記すべき事項な
し。

3. その他 特記すべき事項なし。

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

高血圧症と妊孕性
～受精機構におけるACE2の機能解析～

研究分担者 岡村 匡史
国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部 室長

研究要旨

ACE2 は心臓及び腎臓に強く発現し、血圧調整機構のレニン-アンギオテンシン系 (RAS) において、ACE と拮抗的に働き血圧調整に深く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) マウスでは、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が知られている。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。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。

以上の結果から、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 が発現していること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。

A. 研究目的

近年、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、それらから切り出されたアンギオテンシン II およびアンギオテンシン (1-7) 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。

ACE2 は 2000 年に ACE のホモログとして同定され、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 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 (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 GPI アーゼ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)。

近年 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。

B. 研究方法

1. 動物

ACE2 および CD9 ノックアウトマウスは、それぞれ秋田大学久場敬司博士および成育医療研究センター宮戸健二博士より分与を受けた。ACE ノックアウトマウスは、ジャクソン研究所より購入した。コントロール系統には C57BL/6Ncr (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±2°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. 発現解析

タンパク質発現は、ウエスタンブロット法にて解析した。精子先体膜は、成熟 ACE2 ノックアウト、ACE ノックアウト、C57BL/6N 雄マウスから精子を採取し、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、ホモジナイズし、8000×g, 10 分間で遠心し、上清を 100,000×g, 90 分間遠心した。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。転写後の PVDF 膜を、一次抗体 anti-hACE2 (R&D systems)、anti-ACE (Santa Cruz Biotechnology)、anti-ADAM2 (MILLIPORE) で処理し、ECL (SuperSignal West Femo Maximum Sensitivity Substrate, PIERCE) で発色させた。

3. 表現型解析

1) 精子形態観察

ACE2 ノックアウト雄マウスの精巣上体尾部より精子を採取し、HTF 培地中で前培養した。精子サンプルは 2% グルタル/0.1M カコジル酸緩衝液中で固定、洗浄後、臨界点乾燥を行ない、走査型電子顕微鏡 (SEM) で精子頭部を観察した。

2) 先体反応

精子は精子形態観察と同様に採取し、HTF (BSA-) 培地中で前培養した。0、60、120、240、360 分毎に精子サンプルは、

PBS で洗浄、4%パラフォルムアルデヒドで固定、CBB で染色後、スライドガラスへ塗抹し、倒立顕微鏡下で先体の有無を観察した。

3) 精子透明帯通過能

精子は精子形態観察と同様に採取し、HTF 培地中で2時間前培養した。CD9 ノックアウト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 と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、150 sperm/ μ l になるように添加し、37°Cで5時間培養後、ガラスキャピラリーで卵子を洗浄し、2%ホルマリンで固定後、ヘキスト染色し、困卵腔内精子数をカウントして算出した。

(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研究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、「国立国際医療研究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

1) 精子先体膜における ACE2 および

ACE の発現

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。ACE2 のマウス精巣での発現は、ほとんど検出できなかった(図1-1)。一方、精巣上体では、頭部から尾部へ成熟が進むにつれ発現量が増加しており、さらに成熟精子先体膜に強く発現していた。また、精子先体膜における ACE の発現を解析したところ、正常マウスの精子先体膜では、ACE2 と同様に精巣型 ACE (tACE) と共に、体細胞型 ACE (sACE) が強く発現していた。ACE2 ノックアウトマウス先体膜でも同様であった。ACE2 と ACE のノックアウトマウスにおいて精子先体膜で発現が確認されている ADAM2 の発現に差はなかった(図1-2)。

(2) ACE2 ノックアウトマウスにおける受精能評価

これまでの解析で、ACE2 トランスジェニックマウス精子は著しい卵透明帯結合能低下を示し、ACE2 ノックアウトマウス精子は著しい卵透明帯結合能の亢進を示すことを明らかにした。正常精子に ACE2 阻害剤を添加すると、卵透明帯結合能が亢進することから、ACE2 の機能阻害が精子の受精能を促進することが示されている。ACE2 阻害による精子受精能促進が何に起因するのかを明らかにするため、ACE2 ノックアウトマウス精子を用いて、

その先体反応を解析した。精子を HTF 培地中で培養すると、時間と共に CBB で染色される先体膜が脱落した（先体反応）精子が増加する。培養後、120 分および 240 分では、コントロール C57BL/6N マウス精子で $24.8 \pm 1.8\%$ および $40.8 \pm 7.4\%$ の精子が先体反応を起こしていたのに対し、ACE2 ノックアウトマウス精子ではそれぞれ $49.9 \pm 2.3\%$ および $63.9 \pm 6.3\%$ の精子が先体反応を起こしていた。さらにこの精子先体反応の亢進は ACE2 阻害剤 (DX600) を添加することで、ACE2 ノックアウトマウス精子とほぼ同じレベルにまで、先体反応を亢進した (図 2)。

ACE2 ノックアウトマウス精子は、精子-卵透明帯結合能、精子先体反応が亢進されていることから、次に卵透明帯通過能を検討した。CD9 ノックアウトマウス卵子は、卵子細胞質の融合不全により精子が細胞質に融合できず囲卵腔内に留まる事が知られている。そのため、透明帯を通過した精子は、囲卵腔内に留まるため、囲卵腔の精子をカウントすることにより、精子の卵透明帯通過能を評価することができる。定法に従い、CD9 ノックアウトマウスの未受精卵に、C57BL/6N および ACE2 ノックアウトマウス精子を添加し、囲卵腔内に存在する精子数をカウントした。その結果、C57BL/6N マウス精子では、 0.6 ± 0.9 個、ACE2 ノックアウトマウス精子では 9.0 ± 7.2 個と、囲卵腔に存在する精子が有意に増加していた (図 3)。

これらの表現型が、精子頭部の形態異常によって引き起こされている可能性も考えられるため、ACE2 ノックアウトマウ

スの精子を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、ACE2 ノックアウトマウスは、C57BL/6N 精子と同様に、精子頭部の形態は正常であった (図 4)。

以上の結果から、ACE2 および体細胞型 ACE は精子先体膜に発現し、ACE2 の機能が阻害されると精子-卵透明帯結合、精子先体反応および卵透明帯通過が亢進する事が明らかとなった。今まで報告されていない受精機構における RAS 系の関与を示唆する結果であり、ACE2 は受精過程においても、体細胞型 ACE と拮抗して働いている可能性が示された。

D. 考察

本研究において、ACE2 ならびに体細胞型 ACE (sACE)、精巣型 ACE (tACE) がマウス精子先体膜で強く発現していることから、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。受精能の評価では、ACE2 ノックアウトマウス精子および ACE2 阻害剤 (DX600) 処理精子では、著しく精子-卵透明帯結合能と精子先体反応が亢進されていた。さらに ACE2 ノックアウトマウス精子の卵透明帯通過能も促進されていた。次に ACE2 ノックアウトマウス精子頭部の形態は正常である為、これら受精の表現型は精子頭部の形態異常によるものではないこともわかった。

ACE および ACE2 は、共にメタロプロテアーゼであり、ACE がアンギオテンシン I の C 末端から 2 つのアミノ酸を切り出すのに対し、ACE2 はアンギオテンシン I とアンギオテンシン II 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、結果的にアンジオテンシン II 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、臍、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巢型 ACE (tACE) の 2 つのアイソフォームが存在する。体細胞型 ACE は 2 つのメタロプロテアーゼドメインを持つのに対し、スプライスバリエントである精巢型 ACE のドメインは 1 つである。ACE ノックアウトマウスは、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。一方、体細胞型 ACE ノックアウトマウスの妊孕性の著しい低下は見られないことから、受精機構において、体細胞 ACE と精巢型 ACE は別の機能が、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 個からなるアンジオテンシン I を共通基質とする。ACE により、アンジオテンシン I の末端 2 アミノ酸が切り出されて生成されるアンジオテンシン 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 (Reproduction, 2004)。さらに AT1 受容体は精子中片部や尾部で発現する事が知られている (Journal of Reproduction and Fertility, 2000)。これらから精子受精能獲得にはレニン-アンジオテンシン (RAS) 系が関与している事が推察される。

本研究において、ACE2 ならびに体細胞型 ACE がマウス精子先体膜で発現していること、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することから、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。これらから知見から受精機構においてもレニン-アンジオテンシン (RAS) 系が機能していることが示唆される。今後は、RAS 系が受精能獲得に関与している事を解明する為に、ACE2 ノック

アウト、ACE ノックアウトマウスおよび ACE2、ACE 阻害剤を用い、精子前培養上清中および精子先体膜のアンジオテンシン II、cAMP を定量する。さらにヒト精子においても RAS 系が受精能獲得に関与しているかを明らかにするために、マウスと同様の検証を行なう。また降圧剤服用者および不妊患者精子の ACE および ACE2 の発現、精子のアンジオテンシン II を定量し、降圧剤の服用と妊孕性減弱の関連を明らかにする。

E. 結論

ACE2は精子先体膜に強く発現し、ACE2の機能を阻害すると精子先体反応亢進に伴う、卵透明帯通過精子数が増加した。体細胞型ACE (somatic ACE; sACE) はACE2と同様に、精子先体膜上に発現していた。我々は、精子においてもレニン・アンジオテンシン系 (renin- angiotensin system: RAS) が発現し、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事を見出した。

今後は、遺伝子改変マウスを用いて、受精過程におけるRAS機構の解明をすると共に、不妊患者精子および降圧剤服用による妊孕性減弱とRASの関連を明らかにする。

F. 研究発表

1. *Sasawatari, S., *Okamura, T., *Kasumi, E., Tanaka-Furuyama, K., Yanobu-Takanashi, R., Senji Shirasawa3, Kato, N. and

Toyama-Sorimachi, N.* The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. *These authors equally contributed to this work., *Gastroenterology*, in press.

2. Haga, S., Nagata, N., Okamura, T., Yamamoto, N., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T. and Ishizaka, Y. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 85, 551-555 (2010).

G. 知的財産権

特許公開「受精を促進するための組成物」(特許公開2010-150162)

図1-1 雄生殖組織におけるACE2の発現

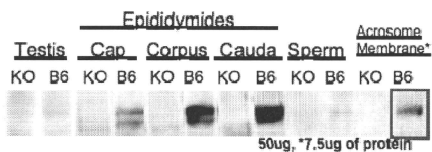


図2 ACE2ノックアウトマウス精子の先体反応

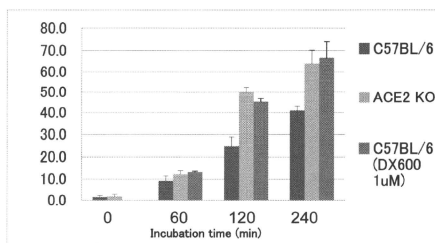


図1-2 精子先体膜におけるACE2 および ACEの発現

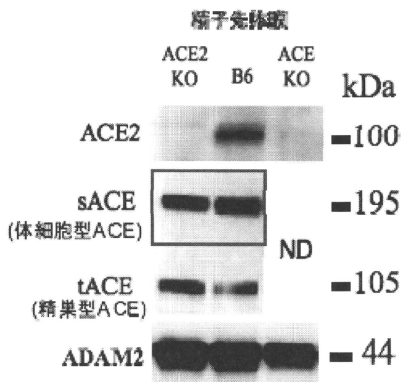


図3 ACE2ノックアウトマウス精子の卵透明帯通過能

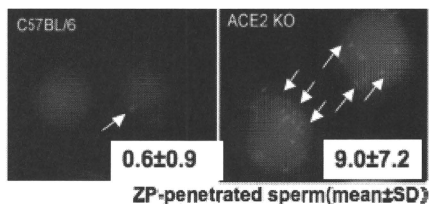
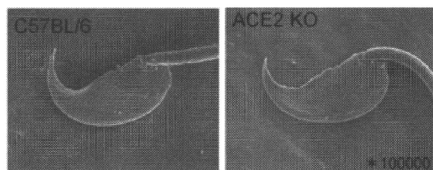


図4 ACE2ノックアウトマウス精子頭部の形態



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小林 浩	子宮内膜症合併不妊の治療法 [総論]内膜症治療と卵巣機能 4. チョコレート嚢胞と癌化	小林 浩	産科と婦人科	産科と婦人科	東京	2010	77(7)765-769
小林 浩	特集 いま改めて卵巣癌を考える 子宮内膜症の癌化とその取り扱い方	小林 浩	産婦人科治療	産婦人科治療	東京	2010	101(3) 257-263
小林 浩	特集 卵巣がんに関する最新トピックス 卵巣がん検診は有効か？	小林 浩	産婦人科の実際	産婦人科の実際	東京	2010	59(10) 1443-1449
小林 浩、鈴木光明、原田 省、星合 昊、望月紘一、百枝幹雄.	女性特有の痛みは疾患のサイン	野田起一郎	Moon Voice	株メディカルレビュー社	東京	2010	1-10
小林 浩	産婦人科研修ハンドブック	小林 浩、大井豪一.	産婦人科研修ハンドブック	海馬書房	東京	2010	
Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Masakazu Nishida, Hisashi Narahara	Aromatase inhibitors for the medical treatment of endometriosis	Jean R. Lamonte	Aromatase Inhibitors: Types, Mode of Action and Indications	Nova Science Publishers	Hauppauge, NY, USA	2010	95-111

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	Lucy A. Mitchell	Endometriosis: Symptoms, Diagnosis and Treatments	Nova Science Publishers	Hauppauge, NY, USA	2010	197-212
奈須家栄, 樽原久司	子宮内膜症における癒痕形成の病態解明と新しい薬物療法の開発		子宮腺筋症・子宮内膜症における最新の動向	日本臨牀社	大阪市	2011	83-88
Fujii J, Iuchi Y	Requirement of Multiple Antioxidative/Redox Systems to Support Male Fertility.	Glantz B Edquist K	Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects	Nova Science Publishers	Hauppauge	2010	33-54
Kimura N Fujii J	Active oxygen species as a signal of embryonic developmental arrest and death	Glantz B Edquist K	Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects	Nova Science Publishers	Hauppauge	2010	55-75
Kawano N, Harada Y, Yoshida K, Miyado M, Miyado K.	Role of CD9 in sperm-egg fusion and its general role in fusion phenomena	Larsson, Lars-Inge	Cell fusion: Regulation and Control	Springer	London, UK	2010	171-184