

201117003A・B

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23年度 総括・分担研究報告書

平成21～23年度

総合研究報告書

平成24年 (2012)年 3月

研究代表者 齊藤英和

目 次

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

I. 総括研究報告

- ライフスタイルの変化に伴う妊娠希望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 13
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 33
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 39
檜原 久司

6. 子宮内膜症：発症・進展における IL-17F とアクチビンの意義についての 検討	43
大須賀 穰	
7. 抗酸化酵素遺伝子改変マウスを用いた内因性酸化ストレスによる妊孕性低下 の機序の解明	49
藤井 順逸	
8. 加齢と ES 細胞	55
阿久津 英憲	
9. 加齢と受精現象に関する研究	59
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～	65
岡村 匡史	

平成 21～23 年度 総合研究報告書

I. 総括研究報告

ライフスタイルの変化に伴う妊娠希望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	71
---	----

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	83
----------------------	----

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 89

苛原 稔

3. 子宮内膜症に関する研究 111

小林 浩

4. ミトコンドリアとストレスの研究 123

末岡 浩

5. 子宮内膜症における病態の解明、新規治療薬の探索 131

楢原 久司

6. 子宮内膜症：発症・進展における免疫と炎症の制御機構とその意義の解明 141

大須賀 穰

7. 抗酸化酵素遺伝子改変マウスを用いた内因性酸化ストレスによる妊孕性低下
の機序の解明 155

藤井 順逸

8. 加齢とES細胞 165

阿久津 英憲

9. 加齢と受精現象に関する研究 171

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～	183
--	-----

岡村 匡史

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	191
---------------------------	-----

平成 23 年度
総括・分担研究報告書

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た。

①ヒト顆粒膜細胞においてヒト卵丘顆粒膜細胞ならびにヒト壁側顆粒膜細胞におけるオートファジーの動態を検討し、さらに卵子-卵丘細胞複合体の成熟度との関連性を検討した。LC3 陽性率は卵丘顆粒膜細胞が 45.7%に対し、壁側顆粒膜細胞が 6.38%であり、卵丘顆粒膜細胞の方が有意に高い割合を示した($P < 0.01$)。さらに卵丘顆粒膜細胞の各群の内訳は、mature 44.9%, immature 43.1%, dysmature 49.4%と卵子-卵丘細胞複合体の成熟度による差は認められなかった。卵丘顆粒膜細胞では、LH サージまたは、hCG 負荷後、排卵に備えてヒアルロン酸の合成が急速に盛んになり卵-卵丘細胞複合体が形成される。この、盛んなヒアルロン酸合成を合成のために、オートファジーを用いて、原料の調達を行っている可能性がある。

②多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) に対してクロミフェン、メトフォルミン、腹腔鏡手術、FSH 低用量漸増療法 (FSH 自己注射) 等を含む治療方針に従い、治療を行う事で7割の症例は妊娠が成立することが明らかとなった。さらに PCOS 症例に対する ART 成績の特徴を検討したところ、卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) が多く注意を要すること、PCOS の妊娠率は非 PCOS 症例と比べて変わらないこと、LOD 後の ART 成績では OHSS が非 LOD 群に比べて少なく安全である一方、採卵数が減少することが明らかとなった。

③子宮内膜症の癌化の初期イベントとしてクロマチン再構築遺伝子である ARID1A の遺伝子変異が報告されるようになった。今回はこの遺伝子機能について検討した。

チョコレート嚢胞内に出血すると、凝固→線溶→溶血→ヘモグロビン→ヘムとグロビン→鉄の放出となり、酸化ストレスの過剰産生により自然炎症の破綻が起こる。過剰鉄による持続的酸化ストレスにより慢性炎症が起こり、細胞や遺伝子 DNA が障害され、妊孕性の低下およびがん化へ向けて進展していくことが示唆された。癌化の初期に ARID1A や HNF-1beta が関与していることが推定された。

④加齢卵子に特異的に生じる変化を卵子の大きさ、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の量的分析を介して、妊孕性改善等に有用な受精・胚発生に影響を及ぼす基礎デー

タを集積することを目的とした。受精後3日目の7~8細胞分割胚割球(36歳)の平均 mtDNA copy 数は $673,722 \pm 12,952$ で、割球体積と mtDNA copy 数との間に、強い正の相関を認めた ($r=0.76$, $p<0.01$)。Veeck 分類での Grade I から mtDNA copy 数も有意差は認めなかった。卵子細胞質体積は、40歳未満群(31~39歳, $n=55$)では $305085 \pm 4329 \mu\text{m}^3$, 40歳以上群(40~47歳, $n=53$)では $419263 \pm 19362 \mu\text{m}^3$ であり、40歳以上において卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した。加齢女性由来の卵子細胞質体積は大きく異なり、mtDNA copy 数の減少を認めたことから、加齢によって胚の mtDNA 密度の減少が胚発生低下の原因と深い関係を示唆した。

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。DNAのメチル化によるエピジェネティクス異常により、発現が抑制されている遺伝子群として、BCL2-like 11、Bone morphogenetic protein 2、Heat shock 70 kDa protein 2、Insulin-like growth factor binding protein-4、Laminin α 5、 $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ 、Suppressor of cytokine signaling 2、Semaphorin 7Aをはじめとする遺伝子が抽出できた。子宮内膜症の病態形成のメカニズムには、DNAのメチル化や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クス異常が関与していることが確認された。

⑥子宮内膜症の病態において重要であるTh17細胞の分泌する別のサイトカインであるIL-17Fについて検討した。また、アクチビンが子宮内膜症で増加しているとする報告が存在するため、今回はアクチビンの子宮内膜症における役割についても検討した。子宮内膜症組織より間質細胞を分離・培養し、種々の添加実験を行った。IL-17FはIL-8、COX2の発現を促進し、TNF α との同時添加により相乗的にIL-8産生を促進した。IL-1 β , TNF α はアクチビンの産生を促進し、アクチビンはIL-6, PAR2の発現を促進した。これらの所見より、IL-17Fは子宮内膜症において炎症性サイトカインとして作用し病気の進展を促進することと、アクチビンが炎症の増幅因子として子宮内膜症の進展に関与していることが示唆された。

⑦代謝などに伴って内因性に生じる酸化ストレスが、妊孕性にどのような影響を与えるかについて明らかにするために、活性酸素の消去に関わる遺伝子改変マウスを用いて、精巣と受精過程について解析した。Superoxide dismutase-1 欠損精子は受精率が低く、早期に運動能が減衰した。Peroxisome oxidoreductin-4 欠損マウスでは精巣の萎縮が見られ精子形成に遅延を示す。本遺伝子については、新たに spermatid 特異的転写産物を同定し、精子形成への関与を示唆する結果が得られた。さらに、こうした遺伝子欠損マウスと組み合わせることで、in vivo での詳細な解析を可能とする2種類のトランスジェニックマウスを開発した。

⑧基礎研究及び臨床データに基づき加齢と妊孕性の低下について様々な側面から総括し、加齢と生殖システムについて課題を明らかにした。加齢と生殖システムに関連しては、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。加齢 ES 細胞を用いた体外培養実験系が有用な加齢と生殖システムの解析系になると思われた。

⑨卵子と精子の細胞膜に局在する E-cadherin と β -catenin の受精における機能解析を行った。E-cadherin と β -catenin の局在は、共に細胞膜に限局しており、生化学的に複合体を形成していること、受精によって卵子と精子の細胞膜が接着した直後に細胞膜での局在が消失することが明らかになった。更に、卵特異的遺伝子欠損マウスを作製して解析を行ったところ、 β -catenin 欠損卵子では、精子との細胞接着能が有為に低下した。また、細胞接着と細胞融合のメカニズムは、別々の

タンパク質によって制御されているが、タンパク質分解系の特異的阻害剤で処理された卵子は、 β -catenin の細胞膜からの消失が遅延し、卵子と精子の細胞融合率が低下することが示された。

⑩ACE2 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 ノックアウトマウスでは、精子-卵透明帯通過能が亢進し、精子前培養培地中におけるアンギオテンシン II の活性も上昇していた。さらにアンギオテンシン II は濃度依存的に先体反応を亢進した。

以上の結果から、ACE2 の機能を阻害すると、精子先体反応が促進し、卵透明帯通過精子数が増加することから、ACE2 は精子受精過程、特に精子先体反応において、負の制御を行う重要な分子であると考えられる。さらに ACE2 の機能阻害により上昇したアンギオテンシン II は、濃度依存的に先体反応を亢進することから、精子先体反応においても RAS カスケード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	准教授
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診断法

ヒト卵丘顆粒膜細胞ならびにヒト壁側顆粒膜細胞におけるオートファジーの動態を検討し、さらに卵子-卵丘細胞複合体の成熟度との関連性を検討した。

卵丘細胞は卵子-卵丘細胞複合体の成熟度合いに応じて mature, immature そして dysmature と三段階に分類した。各段階の卵丘顆粒膜細胞と壁側顆粒膜細胞は、0.1%BSA 添加 TBS で洗浄後、4%ホルマリンで 20 分間固定し、0.1%BSA 添加 PBS で洗浄し、スライドグラスに風乾固定した。

風乾固定した標本を、0.1% Tween 20 含有 PBS で洗浄し、1% BSA 添加 0.1% Tween20 / PBS でブロッキング処理を施した。一次抗体には 500 倍希釈抗 LC3 抗体を用い 4°C で一晩反応させ洗浄し

た後、1000 倍希釈 Alexa546 結合二次抗体で検出した。さらに Hoechst33342 を用いて細胞核を染色した。

蛍光染色を施した標本は、CCD カメラ内蔵倒立蛍光顕微鏡で観察し、5-10 カ所の撮影をおこない、オリンパス DP コントローラーおよび DP マネージャーを用いて解析を行った。

各細胞群のアポトーシス出現率は mature 1.01%, immature 0.92%, dysmature 3.44% と壁側顆粒膜細胞 1.11% であり、dysmature 群で有意に高い割合であった。

LC3 陽性率は卵丘顆粒膜細胞が 45.7% に対し、壁側顆粒膜細胞が 6.38% であり、卵丘顆粒膜細胞の方が有意に高い割合を示した ($P < 0.01$)。さらに卵丘顆粒膜細胞の各群の内訳は、mature 44.9%, immature 43.1%, dysmature

49.4%と卵子-卵丘細胞複合体の成熟度による差は認められなかった。

壁側顆粒膜細胞では黄体化に伴い黄体ホルモン合成を行う。よってステロイド合成は卵胞期同様行うがそれ以上の機能変化を起こさないため比較的オートファジーは低い状態と考えられる。

一方卵丘顆粒膜細胞では、LH サージまたは、hCG 負荷後、排卵に備えてヒアルロン酸の合成が急速に盛んになり卵-卵丘細胞複合体が形成される。この盛んなヒアルロン酸合成を合成のために、オートファジーを用いて、原料の調達を行っている可能性がある。また卵子の障害を防ぎ、老化を防止する恒常性を維持するはたらきも考えられた。

卵巣内におけるオートファジーの役割は、排卵過程という生理的变化に対応し、卵子-卵丘細胞複合体を形成し物理学的だけではなく、生理学的にも卵子を老化や閉鎖から機能的に保護している可能性があることを示唆した。

2. 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、ゴナドトロピン製剤による排卵誘発治療では排卵数をコントロールすることが難しく、多胎を予防する効果が確実である生殖補助医療 (ART) の利点が注目されている。従来、ART は多数の排卵卵子を得ることが前提となっていたが、生殖補助医療技術の向上により少数の成熟卵子から安定した妊娠成績を残せるようになり、副作用の負担が少ない治療として生殖補助医療がより受け入れられるようになっていく。PCOS 女性に対する ART の必要性、問題点を明らかにし、多彩なライフスタイルや患者の高齢化が顕著である PCOS 患者に対する ART 治療に有用な知見を得ることを目的とした。

PCOS の診断基準および治療方針に基

づき当施設で治療を行った PCOS 治療経過を非 PCOS 症例と比較検討した。

非 ART 累積妊娠率は 70%であった。妊娠症例の 70%以上は治療 6 周期目までに妊娠が成立しているが、2 年を越える治療を要した症例もあった。PCOS の ART 成績は非 PCOS 症例と概ね差がなかった。一方、使用ゴナドトロピン量が有意に少ないにも関わらず OHSS 発症率が有意に高かった。ART 実施前に LOD を実施した症例と非実施例との今回の比較では、FSH は有意に高く、LH は有意に低いことが明らかであった。一方、FSH の上昇、使用ゴナドトロピン量の増加が顕著で、LOD 手術による卵巣予備能の低下が明らかな症例が存在した。

PCOS 症例は排卵誘発による妊娠成績が良好であるがやや時間を要するため社会的要因も重なり治療継続を断念した症例があることが問題であり、社会的リスクが高い症例は、より早くから ART の選択肢を提示することが重要と考えられる。LOD 実施後の PCOS 例の ART 成績を検討することは比較的稀であるが ART 実施前に LOD を実施した症例と非実施例との今回の比較では、FSH は有意に高く、LH は有意に低いことが明らかで、内分泌的に PCOS の状態から離脱しており、OHSS のリスクは低く、採卵数も少なく、従ってより安全に ART を実施することが可能である。一方、FSH の上昇、使用ゴナドトロピン量の増加が顕著で、LOD においては必要以上に卵巣予備能を低下させないよう慎重に手術を実施する必要があると考えられた。

PCOS 症例に ART を実施すると非 PCOS 症例と同等の成績が得られることから、高齢、多忙な有職者など社会的リスクの高い症例は積極的に ART の選択肢を示すことが必要である。PCOS に対する ART は OHSS のリスクが高いため、ゴナドトロピン量の個別化が必要である。LOD 例は OHSS リスクが軽減してい

る一方、卵巣予備能の低下が懸念され、高齢、卵巣予備能が低い PCOS に対し LOD を行う時には慎重な判断が必要とされる。

3. 子宮内膜症に関する研究

子宮内膜症の異所子宮内膜腺管上皮細胞は毎月の出血にさらされることにより、その中の鉄がフェントン反応を介した酸化ストレスを惹起する。そのため細胞は微小環境の変化のため遺伝子変異を起し、解毒酵素・タンパクを大量に産生することにより、ストレス抵抗性を獲得している。その一つに HNF-1beta という転写因子の過剰発現が起こる。この遺伝子は酸化ストレス、糖代謝関連酵素、解毒機構関連タンパク、抗アポトーシス、細胞周期調節因子を誘導するマスター遺伝子であり、内膜症の癌化に密接に関与することが判明した。一方、癌化の初期イベントとしてクロマチン再構築遺伝子である ARID1A の遺伝子変異が報告されるようになった。今回はこの遺伝子機能について検討した。

1. ARID 遺伝子族の作用機序

ARID ファミリーには ARID1A, ARID3A, JARID1B/KDM5B が存在する。下流遺伝子を同定するためにパスウェイ解析をすると、ARID1A は HIC1 および XOX9 を介し、間接的に p53 遺伝子に影響を及ぼし、アポトーシス、細胞周期調節、クロマチン再構築に関与する重要な遺伝子であった。また、ARID3A の下流にも p53 が存在することにより、ARID ファミリーはすべてアポトーシス、細胞周期調節、クロマチン再構築に関与する重要な遺伝子であることが判明した。

2. ARID1A の生物活性と癌化機序

腎明細胞腺癌(ccRCC)の発癌はすでに解明されている。ccRCC の発癌は VHL

遺伝子の変異で起こることが知られている。VHL 遺伝子産物はElonginCを介して結合しこれにHIF-1 alpha が結合する。HIF-1 alpha は低酸素における血管新生に作用しVEGF等を産生し癌の転移に深くかかわっている。VHL が正常に作用すれば HIF-1 alpha はユビキチン化され、HIF-1 alpha が分解されるため、VEGF の産生は停止する。しかし、VHL 遺伝子に変異が起こると VHL タンパクの立体構造が変化しElonginC-VHL-HIF-1 alpha 複合体が形成されないためHIF-1 alpha にユビキチン化が起こらず、持続的にHIF-1 alpha が産生されるため血管新生が過剰に起こり癌化するとされている。

ARID1A もElonginCに結合するため、ccRCCと同様のモデルが考えられる。すなわち、ARID1A が正常であれば、ヒストンタンパクであるH2BがElonginC-ARID1A-H2B複合体を形成し、不要なヒストンタンパクは処理される。しかし、ARID1A 遺伝子に変異が起こるとARID1Aタンパクの立体構造が変化しElonginC-ARID1A-H2B複合体が形成されないためH2Bにユビキチン化が起こらず、ヒストンタンパクが処理されないため、クロマチン再構築に影響を来し癌化することが考えられる。

3. 卵巣明細胞腺癌と類内膜腺癌の病態

鉄による酸化ストレスにより活性酸素ROSが産生され、この結果細胞内シグナルが大きく変動する。ROSにより例えば、ERKのリン酸化、PTEN活性低下、NOX過剰反応、遺伝子変異、EMTが惹起される。DNA障害がおこれば細胞周期を停止させ、修復かアポトーシス化に向かうことになる。しかし、HNF-1betaが過剰発現しているため、細胞周期チェックポイントが作動せず、アポトーシスシグナルが発動しない。その結果、遺伝子変異が蓄積した癌細胞が増えて

いくことになる。この状態が前がん状態である。

チョコレート嚢胞内に出血すると、凝固→線溶→溶血→ヘモグロビン→ヘムとグロビン→鉄の放出となり、酸化ストレスの過剰産生により自然炎症の破綻が起こる。過剰鉄による持続的酸化ストレスにより慢性炎症が起こり、細胞や遺伝子 DNA が障害され、妊孕性の低下およびがん化へ向けて進展していくことが示唆された。癌化の初期に ARID1A や HNF-1beta が関与していることが推定された。

4. ミトコンドリアとストレスに関する研究

ライフスタイルの変化に伴い、生殖に携わる年齢は徐々に変化してきている。特に生殖年齢女性の高齢化による生殖能の低下は明確な少子化の要因となっており、加えて種々の人為的要因などによってさらなる低下が指摘されている。近年、多様な生殖補助技術が発展しているが、高齢による生殖能低下への有効な対応策は未解決である。わが国では、他国に比しても急速に少子高齢化が進み、社会保障関係費を増大させ、さらなる財政赤字に直面している。

加齢卵子に特異的に生じる変化を細胞質レベル、特にミトコンドリア DNA (mtDNA) 関与する遺伝子発現に焦点を当て、その原因を解明することが求められている。卵子の大きさ、mtDNA の量的分析を介して、妊孕性改善等に有用な受精・胚発生に影響を及ぼす基礎データを集積することを目的とした。

当院で行われた IVF で廃棄される未受精卵・未分割胚、分割異常胚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 受精後 3 日目の 7~8 細胞分割胚 (36 歳, $n=4$, Veeck 分類 Grade I, III のもの)

7~8 細胞期胚から割球を摘出 ($n=29$) し、検体とした。TaqMan® real-time PCR を施行し、各割球の mtDNA copy 数を定量した。

それぞれの割球の長径 D , 短径 d を倒立顕微鏡にて測定, 計測し, 体積 ($\pi ddD \div 6$) を算出した ($\pi=3.14$)。

② 卵細胞質内精子注入 (ICSI) 時に倒立顕微鏡を用いて撮影した受精卵 ($n=108$) の細胞質の測定から体積を算出した。

受精後 3 日目の 7~8 細胞分割胚割球 (36 歳) の平均 mtDNA copy 数は $673,722 \pm 12,952$ であり, 割球体積と mtDNA copy 数との間に, 強い正の相関を認めた ($r=0.76, p<0.01$)。

分割胚の形態分類との関係を分析するために, Veeck 分類での Grade I 胚からの割球 $n=13$ と Grade III 胚からの割球 $n=16$ との間の比較検討を行った。両群間の体積に差は認めず, また mtDNA copy 数も有意差は認めなかった。

卵子細胞質体積は, 40 歳未満群 (31~39 歳, $n=55$) は $305085 \pm 4329 \mu\text{m}^3$, 40 歳以上群 (40~47 歳, $n=53$) は $419263 \pm 19362 \mu\text{m}^3$ であり, 40 歳以上において卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した ($p<0.01$)。

mtDNA copy 数は割球体積と強い正の相関を認めたが, これは今後の, 胚移植の選択する上での一助になる可能性が示唆された。

また, 加齢女性由来の卵子細胞質体積は大きくなり, mtDNA copy 数の減少を認めたことから, 加齢によって胚の mtDNA 密度の減少が胚発生低下の原因と深い関係を示唆した。

5. 子宮内膜症: エピジェネティクスに基づく薬物療法の開発

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、エピジェネティクス異常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報告した。本年度はさらにDNAのメチル化によるエピジェネティクス異常により発現が抑制されている遺伝子群について、cDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析法により検討した。

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。培養卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞を、DNA脱メチル化剤である5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR)で刺激し、mRNAを抽出した。cDNAマイクロアレイを用いて、5-Aza-CdR処理により発現が亢進するmRNA群を抽出した。

その結果、DNAのメチル化によるエピジェネティクス異常により、発現が抑制されている遺伝子群として、BCL2-like 11、Bone morphogenetic protein 2、Heat shock 70 kDa protein 2、Insulin-like growth factor binding protein-4、Laminin α 5、p21^{Waf1/Cip1}、Suppressor of cytokine signaling 2、Semaphorin 7Aをはじめとする遺伝子が抽出できた。今後、これらの遺伝子群の発現抑制の機序について、詳細に検討する予定である。

本研究により、子宮内膜症の病態形成のメカニズムには、DNAのメチル化やヒストンの脱アセチル化をはじめとす

るエピジェネティクス異常が関与していることが確認された。今後の研究により、子宮内膜症におけるエピジェネティクス異常の全容の解明とエピジェネティクスの可塑性と安定性を標的とした新たな治療法の開発が期待される。また、血液や尿などの検査材料から特異的なDNAメチル化異常を検出することによる子宮内膜症の診断、子宮内膜症組織から特定のエピジェネティクス異常を検出することによる治療反応性の予測、エピジェネティクス異常の抑制による発症予防などへの応用も期待される。

6. 子宮内膜症：発症・進展におけるIL-17Fとアクチビン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。我々は免疫の観点からの検討によりTh17細胞とその産生するIL-17Aが子宮内膜症の進展に重要であることを明らかにしてきたが、今回は第一にTh17細胞の分泌する別のサイトカインであるIL-17Fについて検討した。方法は、倫理委員会の承認のもと子宮内膜症組織より間質細胞(endometriotic stromal cell; ESC)を分離・培養し、種々の添加実験を行った。その結果、IL-17F(10-100ng/ml)添加によって、有意にESCからのIL-8産生が増加した。また、IL-17F添加後4, 8時間において有意にIL-8mRNA, COX2mRNAの発現が増加した。さらにIL-17FとTNF \cdot を同時添加することにより相乗的にIL-8産生が増加

した。以上より、IL-17FがESCにおけるIL-8産生、COX2の発現を増加させ、子宮内膜症の進展に関与することが示唆された。さらに、TNF- α の存在下では、その作用が著しく増強することが明らかとなった。上記とは別に、アクチビンの子宮内膜症における役割についても検討した。背景として、諸家により子宮内膜症病変ではアクチビンAが強発現していること、また正所性子宮内膜におけるアクチビンAの発現は、子宮内膜症症例では正常よりも著明に上昇していることが報告されている。方法はIL-17Fの実験と同様にESCの培養系を使用した。結果として、IL-1 β やTNF- α 刺激により、inhibin/activin-A mRNAは約4倍発現が亢進した。一方でinhibin- α およびinhibin/activin-B mRNAの発現量はそれぞれ不変、減少となった。同刺激による培養上清中のアクチビンAのタンパク濃度は4~5倍上昇した。アクチビンAの添加実験において、添加48 hr後のESC細胞数は1.3倍に増加し、また添加6hr後のIL-6およびPAR-2 mRNAはそれぞれ4倍、3倍と発現が亢進した。以上をまとめると、子宮内膜症においてIL-17Fとアクチビンは促進因子として作用していることが示唆された。今後、これらの物質の子宮内膜症細胞への作用を標的とした治療戦略への取り組みが期待される。

7. 抗酸化酵素遺伝子改変マウスを用いた内因性酸化ストレスによる妊孕性低下の機序の解明

目的

内因性に生じる活性酸素と老化や妊孕性の低下との関連を解明することを目的とし、本年度は、1) SOD1欠損マウス精子の運動能とその受精能についての解析、2) 高分子量Prx4が精巣特異的に発現する機構の解明、3) 酸化ストレ

スの影響をin vivoで解析するためのグルコース6-リン酸脱水素酵素(G6PD)とGFP/Cyt cを発現するトランスジェニックマウスの作製、を行った。

方法

1、SOD1欠損マウスより精子を採取し、その受精能と運動能について、in vitroで解析した。

2、Prx4遺伝子欠損マウスを用いて、Prx4の精巣特異的転写産物の同定とその機能解析を行った。

3、G6PD-TgマウスならびにGFP/Cyt c-Tgマウスの作製し、その発現をmRNAならびにタンパク質の解析で確認した。

結果

1、SOD1欠損雄マウスと野生型雌マウスの交配では、ほぼ正常な数の仔が生まれた。野生型マウス卵をSOD1欠損マウスの精子を用いて培養下に受精させた場合に、受精能は著しく低下した。この時、精子の過酸化脂質量が増加していた。

2、高分子型Prx4が精巣でのみ検出されていた原因として、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キソン1からの転写産物を同定した。

3、作製したG6PD-TgマウスならびにGFP/Cyt c-Tgマウスが予想通りの遺伝子発現をする事を、ウェスタンブロットならびに蛍光顕微鏡観察によって確認した。

1、酸素に曝されることで精子の脂質の過酸化などが加速されることが、運動能と受精能低下の原因と考えられた。しかしSOD1欠損雄マウスの繁殖実験では、産仔数には大きな違いはなかったのは、受精に関わる精子の数が多きことと、in vivoでは酸素濃度が低いことから精子の運動能に大きな影響を与えなかったためと考えられる

2、Prxは活性酸素のシグナル機能を制御することが知られているが、そのメンバーであるPrx4の精巣型は精巣と精

子の機能に関わると考えられる。この精巢型Prx4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、Prx4が精子形成にどのように関与するか、今後明らかにしたい。

3、G6PD-Tgマウスは、SOD1欠損胚におけるNADPHを増加させレドックス能を高めることで、その障害が回避できるか調べるのに有効である。GFP/Cyt c-Tgマウスは、胚が細胞死を起こす機構を持続的に観察するために有用である。

考察

SOD1欠損胚を用いることによって、精子への酸化ストレスが運動能と受精能に及ぼす効果について明確にすることができた。全身性Prx4の他に、精巢特異的Prx4を同定した。こうした遺伝子欠損マウスと、新たに開発したトランスジェニックマウスと組み合わせることで、酸化ストレスと妊孕性の関連についてのより詳細な解析が可能となった。

8. 加齢とES細胞

これまで、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。最終年度は、加齢と妊孕性の低下について様々な側面から総括し、特に卵子の質と加齢に関連する不妊の現象を考察し、今後の治療の基盤となる考え方の提示を目指す。

生殖システムにおける加齢の考え方加齢と妊孕性に関し、米国(Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ART report) 及び本邦(厚生労働省)の加齢と妊孕性に関連するデータをまとめ、これまでの基礎的研究成果と臨床データを調査し、まとめる。

生殖システムにおける加齢の考え方晩婚化と妊娠・出産の加齢化が進み、その現象には社会経済、文化や様々な要因

が多角的に影響している。合計特殊出生率は1980年に1.75だったものが2009年には1.37へと低下している。女性の加齢とともに妊孕性が低下することは報告されているが、その原因の重要な要素である卵子の質については未解明のままである。

・加齢とともに卵母細胞数(Oocyte pool)の数は減少:月経周期毎に約1,000ずつ減失していくが、30歳代後半にその割合は上昇し、閉経期には総数で1,000程の卵胞数となる。絶対数としてのOocyte poolを把握するための検査は重要であり、現状の種々の内分泌及び画像検査の精度と適切な評価マーカーを増やす必要がある。更に重要なことは、数の低下とともに卵細胞の質も低下することで、臨床レベルとなるその評価を行う検査及びマーカー等の開発が必須である。

・加齢による妊孕性低下は卵母細胞の性質

8,000 サイクル/年以上卵母細胞ドナーによるARTが行われている米国のデータから、加齢による妊孕性低下は子宮の問題ではなく、卵母細胞の性質が大きく関与することが指摘できる。

・染色体の異常

加齢とともに、染色体の不分離による異数性の染色体異常率が高くなる。細胞周期制御の機能不全が考えられるが、メカニズムは不明である。

・卵細胞質の変化

加齢に伴う卵細胞質変化では、ミトコンドリアの数及び質的低下が指摘されている。ミトコンドリア機能低下によるATP産生の低下や酸化ストレスへの防御性低下などが卵細胞質の質低下の一因とされている。

卵細胞の本質として全能性と獲得することがある。卵細胞の質の低下とは、全能性獲得が低下することであり、つまり妊孕性の低下と密接に関連する。現在の不妊治療が直面している課題

は、加齢に伴う生殖システムへの影響をどう捉え医療へ反映させるかであり、社会への啓蒙も非常に重要な課題である。

基礎研究及び臨床データに基づき加齢と妊孕性の低下について様々な側面から総括し、加齢と生殖システムについて課題を明らかにした。加齢と生殖システムに関連しては、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。加齢ES細胞を用いた体外培養実験系が有用な加齢と生殖システムの解析系になると思われる。

なお、加齢と生殖システムについての内容は、専門誌に総説として報告した。

9. 加齢と受精現象に関する研究

本年度は、上皮細胞の細胞接着に必須である E-cadherin と β -catenin の受精における役割について検討した。野生型マウスの卵子および精子を採取し、免疫染色によってタンパク質の局在を調べたところ、 β -catenin、E-cadherin の局在は、共に卵子の細胞膜に認められ、細胞骨格を作るアクチンの突起様の局在と一致した。精子および卵子における β -catenin/E-cadherin 複合体の形成については、免疫沈降によって確認された。

続いて、 β -catenin^{LoxP/LoxP} マウスと卵特異的に Cre-recombinase を発現するトランスジェニックマウスの交配によって、卵特異的に β -catenin を欠損させたマウス (β -catenin^{LoxP/LoxP} ZP3-cre) を作製した。 β -catenin 欠損卵子は、形態学的には野生型卵子と同様に形成され、野生型マウスと同等数の卵子が排卵された。そこで、E-cadherin の卵子における局在

を解析したところ、 β -catenin の欠損にともない、E-cadherin が細胞膜に局在できなくなることがわかった。

次に、体外受精によって β -catenin 欠損卵の受精能力を調べたところ、卵丘細胞および透明帯を除去した卵子では、接着した精子数が少なく、精子の融合する頻度も有為に低くなった。以上の結果は、 β -catenin および E-cadherin が精子と卵子の細胞接着に重要な役割を果たしていることを示唆している。

細胞接着前後での、卵子と精子の細胞膜における β -catenin の局在についても観察した。その結果、精子と卵子の細胞膜直下に局在していた β -catenin が、細胞膜が接着して少なくとも 30 分以内に、細胞膜の裏打ちから離れ、更に、蛍光シグナルが低下することが観察された。以上の結果は、細胞接着に依存したシグナルによって、 β -catenin の細胞膜の裏打ちからの遊離と分解が起こっている可能性を示している。

そこで、卵子をユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤 (UBE1-41) で 1 時間処理した後、精子と卵子の細胞接着および細胞融合の効率を調べた。その結果、卵子の細胞膜に接着する精子数は正常レベルであったものの、細胞融合の効率が有為に低下した。一方、 β -catenin 欠損卵子を UBE1-41 で処理した場合は、融合効率はコントロール卵子と比べて、差が認められなかった。以上の結果は、 β -catenin の細胞接着後の速やかな細胞膜からの遊離と分解が、膜融合への移行にも関与していることを示唆している。

本研究の成果から、世界に先駆けて、受精における細胞接着から、その後の膜融合への移行の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。今後は、ヒト卵子の加齢の進行状況の診断、および治療法の開発に応用する。

10. 高血圧症と妊孕性 —受精機構におけるACE2の機能解析—

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 ACE2 は拮抗的に働き、アンギオテンシン (1-7) およびアンギオテンシン II は、それぞれ血管を拡張および収縮し、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、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。一方、ACE は、精巣および精子で発現し、さらに ACE ノックアウト (KO) 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明らかなとなった。これまでに、精子先体膜上には体細胞型 ACE と共に、ACE2 が高発現していることを見出しているため、ACE2 の基質であるアンギオテンシン II の濃度を定量化した。その結果、ACE2 ノックアウトマウス精子では、培養上清中のアンギオテンシン濃度が有意に上昇していた。さらに、精子前培養液中にアンギオテンシン II を添加したところ、濃度依存的に先体反応が亢進した。

本研究において、精子先体膜の ACE2 機能阻害は、精子前培養液中のアンギオテンシン II 濃度上昇を引き起こし、アンギオテンシン II は濃度依存的に先体反応が亢進を亢進する事が示された。さらに、ACE2 の機能阻害は、卵透明帯侵入精子数を著しく増加させることから、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、ACE2 は負の制御を行っていることが示された。さらに、低受精率のマウス凍結精子に ACE2 阻害剤を添加すると、受

の結合障害が報告されている。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。

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、卵子細胞質の融合不全により精子が細胞質に融合できない CD9 ノックアウトマウス卵子を用いて、精子の卵透明帯通過能を評価した。その結果、ACE2 ノックアウトマウス精子では、野生型に比べ卵胞腔に存在する精子が有意に増加しており、卵透明帯通過能が亢進している事

精率が改善することを見出しており、ACE2 阻害剤はヒトにおいても受精促進に効果がある可能性を示した。一方、ACE 阻害剤、AT1R 拮抗薬あるいは ACE2 活性化薬などの降圧剤の服用により、精子の受精能獲得が阻害され、卵透明帯通過精子数が低下する可能性も考えられた。

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

研究要旨

生殖補助医療により採取される卵子以外の卵丘顆粒膜細胞と壁側顆粒膜細胞を用いて卵子の質の低下にオートファジーならびにアポトーシスが関与するか検討を行った。各成熟段階の卵丘顆粒膜細胞ならびに卵胞壁側の壁側顆粒膜細胞を、オートファジーのマーカーである LC3 による染色し、アポトーシスの検出を Hoechst33342 による核染色によって解析した。オートファジーは卵丘顆粒膜細胞の各群で壁側顆粒膜細胞より強く発現され、アポトーシスは dysmature という閉鎖し始めている卵胞由来の卵丘顆粒膜細胞より強く発現されたが、他の群の卵丘顆粒膜細胞と壁側顆粒膜細胞の差は見られなかった。以上のことより、卵丘顆粒膜細胞はオートファジーを介して排卵に向けて卵-卵丘細胞複合体形成に関与し、卵子の質の低下には関与していない可能性がある。

A. 研究目的

哺乳動物の卵巣では、性腺刺激ホルモンであるゴナドトロピンの作用により卵胞が成熟する。その過程で、卵子との相互作用により卵胞顆粒膜細胞は分化し、卵丘顆粒膜細胞、壁側顆粒膜細胞になる。そのため卵近傍の卵丘顆粒膜細胞は、卵子の発達や成熟ならびに受精の制御をつかさどる極めて重要な役割を担っている。

オートファジーは、細胞質の一部が隔離膜と呼ばれる扁平な小胞によって囲まれ、オートファゴソームを形成し、lysosome と結合することによって内包物を分解する機能である。

このオートファジーは programmed cell death だけではなく、細胞の恒常性の維持 (クリアランス) の働きも行っている。

またオートファジーは早期胚形成期に、母性タンパク質から受精卵ゲノム由来の新たな卵タンパク質の合成に必須な機能であり、卵子と胚の発育においてもオートファジーが重要な

働きをもつ可能性が考えられる。

LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) は、酵母におけるオートファジーに必須なタンパク質 Atg8 (Aut7/Apg8) の哺乳類ホモログで、オートファジーが起こるほぼ全般において隔離膜・オートファゴソーム膜に結合していることから、オートファゴソームならびにオートファジーのマーカーとして利用することができる。

また生殖補助医療では、さまざまな成熟度の卵子-卵丘細胞複合体を採取することが出来る。これらは成熟度によって分類され治療に用いられているが、加齢に伴い過熟や変性を起こしている卵子-卵丘細胞複合体の割合が多くなる傾向にある。

本研究では、卵丘顆粒膜細胞ならびに壁側顆粒膜細胞におけるオートファジーの動態を検討し、さらに卵子-卵丘細胞複合体の成熟度との関連性を検討した。