

し、減数分裂時の紡錘体の形成異常をきたし、aneuploidyの原因となり着床障害の原因となると考えられている。またmtDNAの変異に限らず、量的な機能する正常mtDNAの減少も同様の現象が発生して細胞活性が低下することが示唆される。mtDNAの量が減少することで、ATPの産生が低下し、胚発生に影響を及ぼす原因となることが示唆される。卵子は約 60×10^4 copyもの大量のmtDNAを有する卵子では影響が一層深刻であることが示唆される。本研究で、使用した分割胚は同一患者の同一時期に採卵されたものである。我々は分割胚のmtDNA copy数を計測し、割球体積とmtDNA copy数との間に強い正の相関を認め($r=0.76$)、有意性のある関係が示された($p < 0.01$)。分割胚の評価ではVeeck分類が広く用いられている。現在一般に均等な割球の大きさを有す形態良好で発生能力が高く、それぞれの割球が不均等であれば形態不良(Grade III)と評価されている。しかし、Veeck分類でのGrade I胚からの割球とGrade III胚からの割球との間の比較検討を行い、2群間のmtDNA copy数に有意差を認めなかった。継続的に胚を観察できるtime-lapse cinematographyの観察による報告で第2分割以降では卵割に必ずしも同期性はなく、分割にタイムラグがあるため、割球が不均等なことが必ずしも胚のクオリティー低下につながるとは評価できないとの報告がある。Grade I割球とGrade III割球との間にmtDNA copy数の有意差を示さなかったことは卵割との関連性に関する知見を支持している。その一方で、加齢による卵子体積の増加は、mtDNAの減少との間で相乗的にmtDNA密度が減少する関係にあることを示し、加齢変化に関して胚発生に及ぼすミトコンドリア機能が重要な鍵となることを示唆した。

E. 結論

現在、生殖補助医療(assisted genetic diagnosis)の飛躍的進歩によって、分割胚の割球を1~2個摘出し診断する着床前診断(preimplantation genetic diagnosis: PGD)が重要な位置を占めるようになってきた。また、高い妊娠率・出産率を期待するため、胚の成育に関する諸要因を評価する手法に関して、関心が払われつつある。本研究において、mtDNA copy数は割球体積と強い正の相関を認めた。これは妊娠成績を向上させる意味で、移植胚を選択する上での一助になる可能性が示唆された。

また、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($p < 0.01$)加齢によるミトコンドリアおよびmtDNAの分布や密度が胚発生へ及ぼす影響について新たな課題として注目される結果となった。

F. 研究発表

【学会発表】

1) 第143回日本生殖医学会関東地方部会. 櫻井友義, 末岡 浩, 高橋香織, 佐藤 卓, 村越行高, 渡邊広是, 田島博人, 佐藤健二, 中林 章, 吉村泰典, 大澤淑子, 橋場剛士: DM1(筋強直性ジストロフィー)のPGD(着床前遺伝子診断)にWGA(Whole Genome Amplification)を用いた臨床応用の可能性について. 2011. 2. 19, 東京

2) 第63回日本産科婦人科学会総会. 佐藤 卓, 末岡 浩, 中林 章, 高橋香織, 櫻井友義, 渡邊広是, 村越行高, 佐藤健二, 大澤淑子, 橋場剛士, 青木大輔, 吉村泰典: 次世代着床前診断に最適な全ゲノム増幅法は何か—遺伝子型に対応する新たな戦略. 2011. 8. 29-31, 大阪

3) 第 56 回日本生殖医学会. 村越行高,
末岡 浩, 高橋香織, 佐藤 卓,
櫻井友義, 渡邊広是, 田島博人,
佐藤健二, 中林 章, 久慈直昭,
吉村泰典:年齢における卵子ミトコン
ドリア DNA copy 数の重要性. 2011.
12. 8-9, 神奈川

G. 知的財産権
特になし

表1

7~8細胞の分割胚 (n=4, 36歳) の割球 29個
 平均mtDNA copy数 $673,722 \pm 12,952$ (Mean \pm SE)
 最小数 515,897. 最大数 836,410.

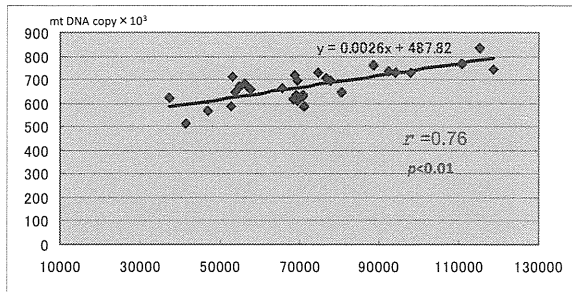


表3

40歳未満(31~39歳, n=55) $305,085 \pm 4,329$ (Mean \pm SE)
 40歳以上(40~47歳, n=53) $419,263 \pm 19,362$

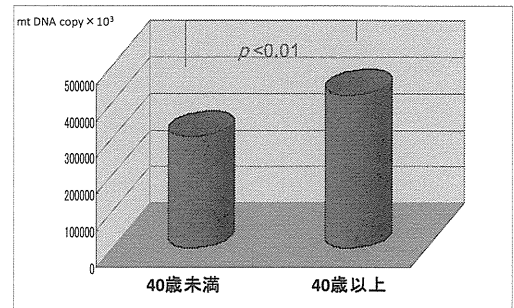


表1. 割球体積と mt DNA copy 数

表3. 卵子細胞質体積の年齢別比較

表2

7~8細胞の分割胚 (n=4, 36歳) の割球 29個
 Grade 1割球の平均copy数 $652,289 \pm 18,015$ (Mean \pm SE)
 Grade 3割球の平均copy数 $700,102 \pm 16,395$

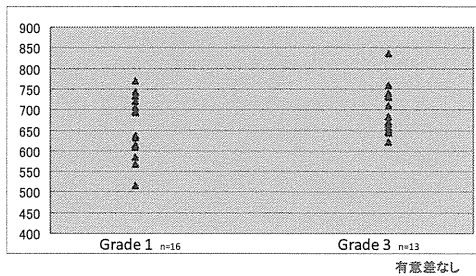


表2. 胚の形態からみた割球 mtDNA copy 数

子宮内膜症における病態の解明、新規治療薬の探索

研究分担者 楢原 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。

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(Kawano et al., 2011)。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。

(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

cDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析の結果、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。

D. 考察

cDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析により、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を抽出することができた。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、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。

E. 結論

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が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Akitoshi Tsuno, Kaei Nasu, Yukie Kawano, Akitoshi Yuge, Haili Li, Wakana Abe, Hisashi Narahara.

Fasudil hydrochloride inhibits the proliferation and the contractility and induces apoptosis of human endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis.

J Clin Endocrinol Metab (Epub

- ahead of print)
- 2) Yasushi Kawano, Yuichi Furukawa, Yukie Kawano, Kaei Nasu, Hisashi Narahara.
Thrombin-induced chemokine production in endometrial stromal cells.
Hum Reprod 2011; 26 (2): 407-413.
 - 3) Yukie Kawano, Kaei Nasu, Haili Li, Akitoshi Tsuno, Wakana Abe, Noriyuki Takai, Hisashi Narahara.
Application of the histone deacetylase inhibitors for the treatment of endometriosis: Histone modifications as pathogenesis and novel therapeutic target.
Hum Reprod 2011; 26 (9): 2486-2498.
 - 4) Kaei Nasu, Masakazu Nishida, Yukie Kawano, Akitoshi Tsuno, Wakana Abe, Akitoshi Yuge, Noriyuki Takai, Hisashi Narahara.
Aberrant expression of apoptosis-related molecules in endometriosis: a possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis.
Reprod Sci 2011; 18 (3): 206-218.
 - 5) Masatake Adachi, Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Yukie Kawano, Hisashi Narahara.
Attachment to extracellular matrices is enhanced in human endometriotic stromal cells: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011; 155 (1): 85-88.
 - 6) Kaei Nasu, Yukie Kawano, Yoshiyuki Tsukamoto, Masayuki Takano, Noriyuki Takai, Haili Li, Yuichi Furukawa, Wakana Abe, Masatsugu Moriyama, Hisashi Narahara.
Aberrant DNA methylation status of endometriosis: Epigenetics as the pathogenesis, biomarker, and therapeutic target.
J Obstet Gynaecol Res 2011; 37 (7): 683-695.
 - 7) Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara.
Role of chemokines in the pathogenesis of endometriosis.
Front Biosci 2011; S3: 1196-1204.
 - 8) Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara.
The role of apoptosis in the pathogenesis of endometriosis.
Curr Res Immunol 2011; 5: 1-18.
 - 9) Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara.
The role of the interleukin-1 system in reproductive biology.
Curr Trends Endocrinol 2011; 5: 67-73.
 - 10) 奈須 家栄, 榎原 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 pp83-88, 2011
 - 11) 奈須家栄, 川野由紀枝, 榎原久司
子宮内膜症をめぐる最近の話題ー子宮内膜症におけるエピジェネティック異常ー
産婦治療 2011;102 (3): 215-220.
 - 12) 奈須家栄, 津野晃寿, 安達正武, 弓削彰利, 川野由紀枝, 阿部若菜, 榎原久司
子宮内膜症細胞の細胞外マトリックスに対する接着性の増強
日エンドメトリオーシス会誌 2011; 32: 75-77.

2. 学会発表

1. 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会（東京都千代田区）1月 22 日-23 日

ワークショップ 1「子宮内膜症の成因に関する基礎的研究」

奈須家栄，津野晃寿，安達正武，弓削彰利，川野由紀枝，阿部若菜，榎原久司.

子宮内膜症細胞の細胞外マトリックスに対する接着性の増強

2. 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会（東京都千代田区）1月 22 日-23 日

川野由紀枝，奈須家栄，阿部若菜，津野晃寿，高井教行，吉田俊恵，梶原真理子，中尾晶子，河野康志，榎原久司.

子宮内膜症細胞に対する SAHA のエピジェネティック修飾による治療効果

3. 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会（東京都千代田区）1月 22 日-23 日

阿部若菜，奈須家栄，川野由紀枝，津野晃寿，吉田俊恵，中尾晶子，梶原真理子，河野康志，榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化における PI3K-Akt-mTOR pathway の関与

4. 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会（熊本市）5月 19 日-20 日

川野由紀枝，奈須家栄，阿部若菜，高井教行，榎原久司.

子宮内膜症細胞に対するバルプロ酸と SAHA のエピジェネティック修飾による治療効果

5. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会（大阪市）8月 29 日-31 日

津野晃寿，奈須家栄，弓削彰利，川野由紀枝，阿部若菜，唐木田真也，河野康志，榎原久司

子宮内膜症による癒痕化に対するヘパリンの作用

6. 第 63 回日本産科婦人科学会学術

講演会（大阪市）8月 29 日-31 日

川野由紀枝，奈須家栄，阿部若菜，津野晃寿，高井教行，河野康志，榎原久司

培養子宮内膜症細胞に対する HDAC inhibitor, Suberoylanilide

hydroxamic acid (SAHA) のエピジェネティック修飾による治療効果の検討

7. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会（大阪市）8月 29 日-31 日

阿部若菜，奈須家栄，川野由紀枝，津野晃寿，河野康志，榎原久司

子宮内膜症による癒痕化における phosphatidylinositol 3

kinase-Akt pathway の関与

8. XXII Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology (Taipei) 9月 23 日-27 日

Kaei Nasu.

Roles of mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated

coiled-coil-forming protein kinase (ROCK)-mediated signaling pathway in

endometriosis-associated fibrosis.

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

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

研究分担者 大須賀 穰 東京大学医学部 准教授

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。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。これらの分子は今後の子宮内膜症治療の標的となりうる可能性が考えられた。

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・増殖するのかが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、高い病原性をもつT細胞であるTh17が子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中に存在することより、子宮内膜症の病態との関係が注目されている。従来、IL-8やCOX2の増加が子宮内膜症の促進因子とされているが、本研究では、第一にTh17が分泌する代表的な炎症性サイトカインであるIL-17FがESCにおいてIL-8、COX2の発現に影響するか否か検討した。

また、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。しかし、アクチビンAの子宮内膜症における役割はこれまで検討されていない。そこで、本研究の第二の目的として子宮内膜症間質細胞 (endometriotic stromal cell : ESC) を用いて、アクチビンAの発現調節およびその機能に関して検討を行った。

B. 研究方法

研究 1 .

倫理委員会の承認と文書同意のもと、切除した子宮内膜症性卵巣のう胞よりESCを分離培養し、以下の検討に供した。(1) IL-17F(0.01ng/ml-100ng/ml)を添加し、培養上清中のIL-8の産生をELISA法にて測定した。(2) IL-17F(10ng/ml)を添加し、IL-8mRNA, COX2mRNAの発現の変化を検討した。(3) TNFa(1ng/ml)の存在下にIL-17F (1ng/ml- 100ng/ml)を添加し、培養上清中へのIL-8産生をELISA法にて測定した。(4) IL-17F(50ng/ml)と同時にIL-17Fの受容体であるIL-17RA、IL-17RCの抗体を同時に添加し、培養上清中のIL-8の産生をELISA法にて測定した。

研究 2 .

培養ESCにIL-1 β もしくはTNF- α 刺激を加え、inhibin- α , inhibin/activin β A, β B mRNA発現量を検討した。また、同培養上清中のアクチビンA濃度をELISAにて測定した。次にESCにアクチビンA(0-300 ng/ml)を添加し、ESCに対する増殖作用を細胞数計測により検討し、また子宮内膜症の増悪因子として知られているIL-6およびprotease-activated receptor-2 (PAR-2) mRNAの発現を検討した。

(倫理面への配慮)

研究は本施設の倫理委員会の承認を受け、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

研究 1 .

(1) IL-17F(10-100ng/ml)添加によって、有意にIL-8産生が増加した($P < 0.02$ vs. control)。(2) 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。(3) IL-17F と TNF α 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わかった。

研究 2.

IL-1 β や TNF- α 刺激により、inhibin/activin β A mRNA は約 4 倍発現が亢進した。一方で inhibin- α および inhibin/activin β 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 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 倍に増加した。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。

D. 考察

子宮内膜症における炎症と免疫は重要な促進因子であるにも関わらず、その機序において不明な点が多かったが、今回の検討より IL-17F とアクチビンが重要な役割を担っていることが示唆された。子宮内膜症において Th17 細胞とその分泌する IL-17A が重要であることは、我々により既に報告されているが、今回、IL-17F が ESC において IL-8 ならびに COX2 の発現を増加させたことより、Th17 細胞は IL-17A と IL-17F の両者の作用を介して子宮内膜症の進展に寄与していることが考えられた。また、TNF α との相乗作用は IL-17A においても認められていること、IL-17RA, IL-17RC は IL-17A の受容体であることも考え合わせると、子宮

内膜症においては IL-17A と IL-17C が重複した作用を持っていることが考えられた。これは治療戦略を考えるときに、IL-17A もしくは IL-17F の作用を阻害するためには、IL-17A, IL-17F の産生抑制よりも、受容体の阻害の方が効率的である可能性を示しているともいえる。

次にアクチビンについてであるが、IL-1 β や TNF α といった炎症性サイトカインによって ESC からの分泌が増加したことは、子宮内膜症における炎症の 2 次的メディエーターとしてアクチビンが作用していることを強く示唆している。また、アクチビンは ESC の増殖を促進して子宮内膜症病巣の増大に寄与していることが明らかとなった。さらに、IL-6 と PAR2 の発現を亢進したことは、更なる炎症の拡大に増幅因子として作用していることを示唆している。総合的に考えると、アクチビンは炎症が子宮内膜症を進展させる機序において促進因子・増幅因子としての役割を担っていると考えられた。よって、アクチビンの作用を抑制することにより子宮内膜症の進展を抑制することができる可能性が考えられ、今後の研究につなげたいと考えている。

E. 結論

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。

F. 研究発表。

1. 論文発表

- 1) Hirata T., Osuga Y., Takamura M., Saito A., Hasegawa A., Koga K., Yoshino O., Hirota Y.,

- Harada M., Taketani Y. Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis. *Fertil Steril.* 96:113-117, 2011.
- 2) Saito A., Osuga Y., Yoshino O., Takamura M., Hirata T., Hirota Y., Koga K., Harada M., Takamura Y., Yano T., Taketani Y. TGF-beta1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. *Hum Reprod.* 26:1892-1898, 2011.
- 3) Wang B., Koga K., Osuga Y., Cardenas I., Izumi G., Takamura M., Hirata T., Yoshino O., Hirota Y., Harada M., Mor G., Taketani Y. Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts. *Endocrinology.* 152:4984-4992, 2011.
- 4) Wang B., Koga K., Osuga Y., Hirata T., Saito A., Yoshino O., Hirota Y., Harada M., Takamura Y., Fujii T., Taketani Y. High mobility group box 1 (HMGB1) levels in the placenta and in serum in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 66:143-148, 2011.
- 5) Yoshino O., Hori M., Osuga Y., Hayashi T., Sadoshima Y., Tsuchiya H., Nishii O., Taketani Y. Myomectomy reduces endometrial T2 relaxation times. *Fertil Steril.* 95:2781-2783, 2011.
- 6) Yoshino O., Izumi G., Shi J., Osuga Y., Hirota Y., Hirata T., Harada M., Nishii O., Koga K., Taketani Y. Activin-A is induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma. *Fertil Steril.* 96:118-121, 2011.
- 7) Yoshino O., Nishii O., Osuga Y., Asada H., Okuda S., Orisaka M., Hori M., Fujiwara T., Hayashi T. Myomectomy decreases abnormal uterine peristalsis and increases pregnancy rate. *J Minim Invasive Gynecol.* 19:63-67, 2012.

2. 学会発表

- 1) 吉野修, 浅田弘法, 折坂誠, 大須賀穰, 土屋裕子, 佐渡島陽子, 古谷正敬, 小辻文和, 吉村泰典, 西井修, 武谷雄二. 筋層内子宮筋腫 (intramural myoma:IM)により誘導される子宮内膜の異常蠕動は妊娠率を低下させる. 第63回産科婦人科学会雑誌. 平成23年8月29日 大阪市
- 2) 広田泰, 大須賀穰, 上妻志郎, 武谷雄二. 子宮内膜のFKBP52-PRDX6経路が酸化ストレス防御に作用し妊娠成立に寄与する. 第63回産科婦人科学会雑誌. 平成23年8月29日 大阪市

- 3) 高村将司, 大須賀穰, 泉玄太郎, 齊藤亜子, 長谷川亜希子, 竹村由里, 原田美由紀, 平田哲也, 広田泰, 吉野修, 甲賀かをり, 武谷雄二. 子宮内膜症進展における IL-17、GRO(Growth Related Oncogene) α を介した vicious cycle の形成. 第 63 回産科婦人科学会雑誌. 平成 23 年 8 月 29 日 大阪市
- 4) 泉玄太郎, 甲賀かをり, 大須賀穰, 永井美和子, 浦田陽子, 高村将司, 齊藤亜子, 竹村由里, 原田美由紀, 吉野修, 矢野哲, 武谷雄二. 第 63 回産科婦人科学会雑誌. 平成 23 年 8 月 29 日 大阪市
- 5) 大須賀穰. 子宮内膜症の病態と治療. 第 16 回日本生殖内分泌学会 平成 23 年 11 月 19 日 東京都
- 6) 大須賀穰. 不妊症合併子宮内膜症の治療と再発予防. 第 51 回日本産科婦人科内視鏡学会 平成 23 年 8 月 5 日 大阪市

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

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

研究分担者 藤井順逸

山形大学大学院医学系研究科 生化学分子生物学 教授

研究要旨

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。Peroxioredoxin-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。

A. 研究目的

活性酸素(ROS)の産生増加、もしくは消去能が低下することによる酸化ストレスは、加齢・子宮内膜症・多嚢胞性卵巣症候群における妊孕性低下の要因の一つと考えられている。こうした病態では脂質や蛋白質、核酸の酸化物が増加する事が知られているが、酸化ストレス下ではどのような機序で妊孕性が低下するかについては解明が遅れている。

従来の研究では、*in vitro*で配偶子や胚に過酸化水素などのROSを投与することで酸化ストレスを与え、その効果について調べられてきた。しかし、通常は過剰量を細胞外から投与することから、代謝に伴って内因性に生じる酸化ストレス状態とは異なるため、こうした酸化ストレスモデルではROSの標的分子に違いが生じる可能性がある。この問題点は抗酸化に働く遺伝子を欠損するマウスを用いることで解消され、内因性酸化ストレスが亢進した状態でその影響についての解析が可能である。

これまでに酸素分子が一電子還元を受けて生じるスーパーオキシドの除去を行

うSuperoxide Dismutase-1 (SOD1)を欠損(KO)するマウスを用いて、雌マウスの妊孕性に対する酸化ストレスの影響について解析を行ってきた(Kimura et al, Mol Hum Reprod, 2010)。SOD1-KO胚は、20%酸素培養では2細胞期で発生を停止し、1%酸素培養ではほぼ正常に発生すること、また、1%酸素培養で4細胞期となった胚を20%酸素培養に移すと細胞死が誘導されることなどを明らかにしている。2細胞期停止には、細胞周期の調節に関わるCdc25などの脱リン酸化酵素やCdk inhibitor分子の関与が考えられる。

酸化ストレスは男性不妊の原因ともなっている。我々はSOD1-KO雄マウスの精巣が熱ストレスに対して脆弱になっていることを報告している(Ishii et al, Free Radic Res, 2005)が、妊孕性については検討されていなかった。

また、新規抗酸化酵素ファミリーの1つPeroxioredoxin 4(Prx4)は、性成熟した精巣でのみ高分子型Prx4が発現することから精子形成への関与がしきされていた(Sasagawa et al, Eur J Biochem, 2001)が、精巣機能にどのように関わるかにつ

いては不明であった。最近我々が開発したPrx4-KOマウスは、精巣の萎縮を示し、性成熟が遅延する(Iuchi et al, Biochem J, 2009)。その後の解析から、Prx4-KOマウスでも高分子型の発現が認められたことから、その原因究明を進めていた。

本研究は、内因性に生じる活性酸素と妊孕性の低下との関連を解明することを目的とし、SOD1とPrx4の遺伝子欠損マウスについて、精巣・精子・受精過程について解析した。また、抗酸化能を高める目的で、NADPHを生成するペントースリン酸経路の律速酵素であるグルコース6-リン酸脱水素酵素(G6PD)を発現するトランスジェニック(Tg)マウスと、Cytochrome c (Cyt c)を可視化することでミトコンドリアの解析を行うために、Green Fluorescent Protein (GFP)とCyt cの融合遺伝子を発現するTgマウスの作製を行った。

B. 研究方法

1. SOD1欠損精子の解析

1) SOD1欠損マウスより精子を採取して、精子核DNAを蛍光染色し、野生型マウス卵との受精過程について解析した。

2) 精子の運動能については、Computer-assisted sperm analysis (CASA)を用いて解析した。なお、本実験は宮戸健二先生のご協力で行った。

3) 野生型とSOD1-KOの精子の脂質過酸化の程度を、thiobarbituric acid-reactive (TBA)法で測定した。

2. Prx4の精巣における機能の解析

1) 野生型マウスとPrx4-KOマウスの精巣におけるPrx4の発現に関して、RT-PCR・ウエスタンブロット・免疫染色による解析を行った。

2) 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った。その抗体を用いて、ウエスタンブ

ロット解析と、精巣切片の免疫染色を行った。

3) Prxファミリーは過酸化水素を消去する反応過程で自らが過酸化されることから、過酸化Prxを特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブロット解析により、過酸化Prxの検出を行った。

3. ヒト G6PDを発現するTgマウスの作製と解析

1) Creを発現させることで誘導性に遺伝子発現を起こさせるベクターを用いて、野生型と変異型のヒトG6PDを発現するTgマウスを作出した。

2) 主要な臓器のmRNAの発現をRT-PCRで確認し、蛋白質を抗ヒト G6PD抗体によるウエスタンブロットで解析した。

4. Cyt cとGFPの融合遺伝子(GFP/Cyt-c)を発現するTgマウスの作出

1) 前進発現性のCAGプロモーターの制御下にGFP/Cyt-c融合遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。

2) マクロファージを単離後、蛍光顕微鏡下に観察することで、ミトコンドリアに発現しているかどうか確認した。

3) 肝臓よりミトコンドリア分画を得て、抗GFP抗体と抗Cyt c抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

5. 倫理面への配慮

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。

C. 研究結果

1. SOD1欠損精子の解析

SOD1欠損マウスの雄の妊孕性についてはこれまでに報告がなかったため、野生型雌マウスと交配して産仔数を調べた。その結果、WTとSOD1-KOで大きな違いは認めなかった。しかしin vitroでは、

SOD1-KO精子を用いた場合の受精効率が著しく低下していた(図1)。

そこで、受精過程について検討を行った結果、SOD1-KO精子を用いた場合、多数の精子が透明帯に付着している像が認められた。CASAを用いて精子の運動能を測定したところ、精子の採取直後には大きな違いは認めなかったが、培地に置かれる時間が長いほど、SOD1-KO精子では運動能の低下が著しかった。脂質過酸化の程度をTBA法で調べたところ、SOD1-KO精子の方が野生型に比べて増加していた。

2. Prx4の精巣における機能の解析

我々はPrx4のプロモーター/エキソン1を欠損するPrx4-KOマウスを作製している(Iuchi et al, Biochem J, 2009)。論文発表時には不明であったPrx4の機能については、その後、主に小胞体/分泌型として機能する事が分かってきた。Prx4-KOマウスは、精巣の発達障害による性成熟の遅延を示すが、成熟後には受精能に異常はなかった。ところが、成熟したPrx4-KOマウスの精巣蛋白質のウエスタンブロット解析から、高分子量Prx4タンパクがPrx4-KOの精巣でも発現することが分かった。DNAデータベースの検索の結果、精巣ではプロモーター/エキソン1だけが異なる転写産物が発現していることが分かった(図2)。この精巣型エキソン1のコードするペプチドに対する抗体を作製し、精巣の免疫染色を行ったところ、主にspermatidに高発現していた。

その機能を調べる目的で、精巣切片を過酸化水素処理して、過酸化型Prxとのみ反応する抗体で検出を試みたところ、Prx1~Prx3の過酸化は確認されたが、Prx4の過酸化体は検出されなかった。このことから、精巣特異的Prx4は過酸化水素の消去以外の働きをしていると考えられた。

3. G6PD-Tgマウスの作製と解析

胚発生過程におけるレドックス反応の重要性を調べるために、ペントースリン酸経路の律速酵素でNADPHの産生を行うG6PDを発現するTgマウスを作製した。恒常的にペントースリン酸経路が活性化した場合はむしろ有害に働く事が知られているため、本マウスの作製に当たっては誘導型プラスミドベクターを用い、Creマウスとの交配によりコンディショナルに誘導する系を用いた。まずヒトの野生型(wt)と変異型(mt)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-G6PD-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、Cre recombinaseを全身に発現するCre-Tgマウスと交配しG6PDを発現するマウスを得た。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wtG6PD-TgとmtG6PD-Tgマウスの存在が確認できたので、現在繁殖中である。

4. GFP/Cyt c-Tgマウスの作製と解析

目的のマウスを作製するために、CAGプロモーターの下流にGFP/Cyt-c融合遺伝子を導入したマウスを作製した。数系統が得られているが、そのうちの1系統からマクロファージを単離し、紫外線下で観察したところ、ミトコンドリアが選択的に緑色に発光していたため、目的のマウスができたと考えられる。また、GFP/Cyt cの発現をウエスタンブロットによっても確認した。本マウスについても、今後の実験に供するために現在繁殖をしている

D. 考察

1. SOD1欠損精子の解析

SOD1欠損マウスの精子では、培養時間に依存して運動能が低下したのは、培養時に曝される空気中の酸素が原因と考えられる。脂質とりわけ不飽和脂肪酸は精子の運動能維持にとって重要であるが、酸化を受けやすい。SOD1欠損精子の方が過酸化脂質の含量が多かったことが、そ

の運動能の早期消失に関わると考えられる。しかしSOD1欠損雄マウスの妊孕性については野生型マウスとの間に違いは認められなかった。これはvivoでは受精に関わる精子の数が多いことと、酸素濃度が低いために酸化されにくく運動能に大きな影響を与えないためと考えられる。

2. Prx4の精巣における機能の解析

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。Prx4は活性酸素シグナルを制御することで精巣・精子の機能に関わると考えられるが、その作用ならびに標的となる分子は未だ同定できていない。この精巣型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。

3. G6PD-Tgマウスの作製と解析

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G6PD-Tgマウスが得られた。現在は未だ繁殖している段階であるが、これから、wtG6PD-TgとmtG6PD-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。さらにSOD1-KOマウスと交配して、G6PDを過剰発現するSOD1欠損卵について解析を行うことで、酸化ストレスの亢進した状態でNADPH増加によるレドックス能の増強の効果を調べることが可能である。

4. GFP/Cyt c-Tgマウスの作製と解析

紫外線を照射したマクロファージのミトコンドリアが緑色蛍光を示し、抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット解析でGFPとCyt cの分子量を合わせた位置にバ

ンドが検出されたことから、目的とするGFP/Cyt c-Tgマウスを作製できたと考えられる。

本GFP/Cyt c-Tgマウスは、細胞内のミトコンドリアを可視化できるため、未受精卵では未発達な状態にあるミトコンドリアが受精後にどのようにして発達して行くか、顕微鏡下のビデオ撮影と併用することでその過程を追うことが可能となる。また、多くの場合、Cyt-cがミトコンドリアから細胞質へと遊離する事がアポトーシスの引金となることから、SOD1-KO;;GFP/Cyt-c-Tgマウスを作製しその胚を用いて、4細胞以降のSOD1欠損胚に見られる細胞死の解析にとって有用な情報が得られると考える。

E. 結論

SOD1欠損胚を用いることによって、内因性の酸化ストレスが精子と受精能に対する効果について明確にすることができた。また全身性Prx4の他に、精巣特異的Prx4を同定した。こうしたマウスと新たに開発した遺伝子改変マウスと組み合わせることでより詳細な解析が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujii J, Tsunoda S. Redox regulation of spermatogenic process and fertilization *Asian J Androl, review*, 13(3):420-423, 2011
- 2) Fujii J, Ito JI, Zhang X, Kurahashi T. Unveiling the Roles of the Glutathione Redox System In Vivo by Analyzing Genetically Modified Mice. *J. Clin. Biochem. Nutr. review*, 49(2):70-78, 2011
- 3) Palande K, Roovers O, Gits J, Verwijmeren C, Iuchi Y, Fujii J, Neel BG, Karisch R, Tavernier J, Touw IP. Peroxiredoxin-controlled G-CSF signalling at the endoplasmic

reticulum-early endosome interface. *J Cell Sci*, 124(21):3695-3705, 2011

4) Onuma K, Suenaga Y, Sakaki R, Yoshitome S, Sato Y, Ogawara S, Suzuki S, Kuramitsu M, Yokoyama H, Murakami A, Hamada J, Nicolson GL, Kobayashi M, Fujii J, and Okada F. Development of a Quantitative Bioassay to Assess Preventive Compounds against Inflammation-based Carcinogenesis. *Nitric Oxide*, 25(2):183-194, 2011.

5) Yim SH, Kim YJ, Oh SY, Fujii J, Zhang Y, Gladyshev VN, Rhee SG. Identification and characterization of an alternatively transcribed form of peroxiredoxin IV that is specifically expressed in spermatids of the postpubertal mouse testis. *J Biol Chem*, 286(45):39002-39012, 2011.

6) 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*, 149(4):443-453, 2011.

2. 著書

1) Fujii J, Tsunoda S, Kimura N. Antithetical Roles of Reactive Oxygen Species in Mammalian Reproduction. In *Handbook of System Biology of Free Radicals and Anti-oxidants*. (Larher I. ed), Springer-Verlag, Germany, *in press* (2012)

G. 知的財産権

特記すべき事項なし

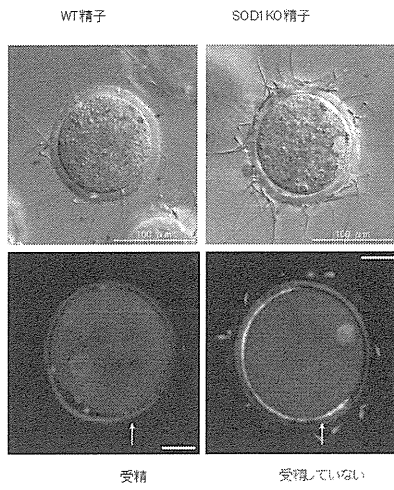


Fig 1. SOD1-KO 精子は受精障害を示す

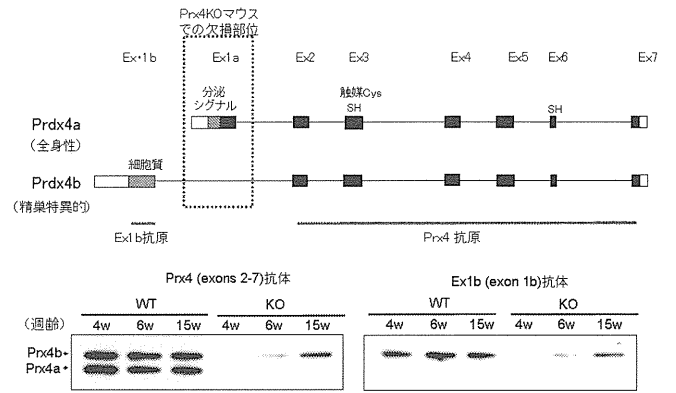


Fig 2. Prx4 の精巣特異的転写産物と抗体による検出

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

加齢と ES 細胞

研究分担者 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

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った結果、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。今年度は、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、加齢と関連する不妊治療の基盤となる考え方を提示する。

A. 研究目的

女性の生殖適齢期間は、より高齢へとシフトするわけではなく、出生数割合の年齢分布が30歳代半ばへとシフトし晩婚化により妊娠が可能である期間はより限られた短い期間となっている。出産年齢が上昇していることより加齢と卵細胞の質への影響は早急に解明しなければならない問題である。実験モデルマウスを用いて、加齢モデル由来の胚より胚性幹 (ES) 細胞を樹立することに初めて成功し、幹細胞機能維持機能及び分化機能への影響を解析したところ加齢卵子が分化動態へ影響を及ぼすことを突き止めた。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。

B. 研究方法

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。

(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

加齢 ES 細胞に関連する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

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、種々の報告より、卵母細胞や着床前の胚で染色体異常率が上昇することと、流産率の上昇が報告されている。しかし、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：出生前から卵巣内の卵母細胞はアポトーシスをおこし減少し、思春期には約40万の卵胞数となる。月経周期毎に約1,000ずつ滅失していくが、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。

D. 考察

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。

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。

E. 結論

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。その課題を検証するシステムとして加齢ES細胞の実験系が有用であることが示唆された。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Egli D, Akutsu H. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.

2) Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of