

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 21～23 年度

総合研究報告書

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）
総合総括研究報告書

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

研究者代表者 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が目的としている。

挙児を希望する年齢が高齢化することで不妊を引き起こす病態・因子は多種存在するため、病態を解明し治療法を開発するには多面的に研究する必要性があり、班員は各分担項目より研究を進めている。

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

また、オートファジーは卵丘顆粒膜細胞に強く発現しており、細胞の分化に対応する反応と推測された。

②多嚢胞性卵巣症候群（PCOS の診断を明確にし、治療成績を検討することにより、女性の晩婚化に伴い卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する必要がある現在、患者個人のライフスタイルに合わせたリスク管理に明確な指針を示すことを目的とした。PCOS の診断基準を月経異常、卵巣所見、内分泌所見の3つを満たすものとし、治療方針としてクロミフェン、メトフォルミン、低用量FSH療法、LOD、ARTとして総合的に治療に当たる基準を示し、その各々の特徴を明らかとすることができた。

③子宮内膜症の癌化の過程では、出血による酸化ストレスに抵抗するために HNF-1beta が過剰発現し、細胞周期チェックポイントが作動し G2/M 停止を起すため、細胞は抗アポトーシスになり細胞死は起こらない。しかし、この状態が長時間持続することにより各種遺伝子が障害を受けたまま修復されないことになる。ARID1A および PIK3CA もその一連の遺伝子群であり、これらの変異遺伝子の蓄積により不安定性がおこり癌化を助長することになる。子宮内膜症からの発癌には P53 の遺伝子異常は認められないが、p53 パスウェイの異常と同じ現象が起

こっていることが推察された。

④ミトコンドリア遺伝子と卵老化との関係が示唆され、妊孕性の中で受精・胚発生に関わる卵子、および卵子に強い関わりを有する顆粒膜細胞について mtDNA の量的・質的分析を介して、加齢との関係を解明することを目的とした。未受精卵・未分割胚は、40 歳以上群は、40 歳未満群と比較し有意な減少 ($p=0.012$) を認めた。顆粒膜細胞も有意差は認めないものの 40 歳以上の群において copy 数減少傾向を示した。また、T8993G 点変異は、全ての検体において検出されなかった。加齢女性 (40 歳以上) 由来の卵子細胞質体積は若年女性由来と比較し、有意に増大していた ($p<0.01$) が、mtDNA 量は有意に減少していたことから加齢胚発生効率の低下に関与する因子として微小変異の蓄積による可能性は少なく、mtDNA の細胞質内の低密度化に関与していることが示唆された。

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、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。また、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。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分かった。

⑥子宮内膜症の発症・進展メカニズムとして重要である炎症と免疫について検討した。子宮内膜症における免疫と炎症の新たなメカニズムを明らかにすることができた。これらのメカニズムは今後の治療選択において新たなターゲットとなる可能性が期待でき、将来的には女性の妊孕性の改善、QOL の改善などに寄与すると考えられる。

⑦活性酸素の消去に関わる遺伝子の改変マウスを用いて、配偶子形成・受精・発生に焦点を当てて解析を行うことで、代謝などによって生じる内因性の酸化ストレスがどのようにして妊孕性を低下させるか、その機序を明らかにすることを目的とした。Superoxide dismutase-1 欠損胚は 2 細胞期で発生停止し、欠損精子は受精能が低く、早期に運動能が減衰した。Peroxioredoxin (Prx)-4 の欠損マウスでは、精巣の萎縮が見られ精子形成が遅れて起こった。今回、spermatid 特異的に Prx4 転写が起こることを明らかにし、精子形成への関与を示唆する結果を得た。さらに、こうした遺伝子欠損マウスと組合せることで、in vivo における酸化とレドックス反応の解明に有用な、グルコース 6-リン酸脱水素酵素と、GFP/cytochrome c 融合タンパクを発現するトランスジェニックマウスを作製した。

⑧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。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と思われる。

⑨卵子と精子の受精の分子メカニズムに関して研究を行った。解析を行ったタンパク質は膜4回貫通型タンパク質 CD9 と細胞接着に関わる E-cadherin と β -catenin であった。本研究の結果として、CD9 が卵子から膜構造体 (エキソソーム) の構成因子として放出され、エキソソームとの相互作用によって精子が融合能力を獲得することを示した。更に、E-cadherin/ β -catenin 複合体が精子および卵子の細胞膜に存在し、細胞接着に関与していることを明らかにした。続いて、精子と卵子の細胞接着から細胞融合への移行に関わるメカニズムとして、細胞接着直後に起こる β -catenin の細胞膜の裏打ちからの遊離と分解が関わっていることを示す結果が得られた。本研究の成果として、未解明であった卵子と精子の細胞接着、融合、更に接着から融合への移行のメカニズムの一端を明らかにすることができた。

⑩ACE2 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、特に受精能獲得において、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ジオテンシン II は、濃度依存的に先体反応を亢進する。近年 RAS は、心臓、脳、膵、血管壁、子宮-胎盤などの多くの組織でも存在が明らかとなっており、精子受精能獲得においても、RAS 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

檜原 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

加齢に伴う生殖能力の低下は古くから知られてきた。特に、卵子の老化は 30 代後半から急速に進行すると考えられており、女性の晩婚化は生殖機能にとって大きなリスクとなる。しかしながら、現在まで生殖細胞の老化の分子メカニズムについての知見は乏しく、また診断基準となる分子マーカーも少ない。我々は以前ストレス遺伝子の一つである GSTT1 が老化顆粒膜細胞において発現亢進していることを報告した (Ito et al.,

2008)。GSTT1 は、phase II の解毒作用を担う GST のファミリー分子であり、GST 活性を有する。一方で、GST は抗酸化作用を持つ分子としても知られており、老化と密接に関係している可能性が想定される。そこで、本研究では、ヒト顆粒膜細胞において老化により強く発現亢進する GSTT1 と p38MAPK の相互作用について解析を行った。ヒト顆粒膜細胞において老化により細胞質内で p38 リン酸化が強く亢進するが、同時に GSTT1 の発現も強く亢進していることが免疫染色により確認された。P38MAPK の細胞

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

また、オートファジーもアポトーシス・細胞内維持機構に関与するといわれており、オートファジーの顆粒膜細胞での発現を解析し、卵胞発育での関与について検討した。その結果、オートファジーは加齢ストレスに関与するのではなく排卵のために、卵丘顆粒膜細胞で卵—卵丘複合体の形成に関与する可能性が示唆された。

2. PCOS 婦人に対する生殖医療対策

女性のライフスタイルの変化により医

学的、社会的側面を考慮した生殖医療が求められ、多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は我が国の診断基準と国際的基準の乖離を解消することや、FSH 療法の副作用を解消するなど改善が急務である。PCOS に特異で安全性の高い治療法が近年注目されている現在、PCOS の診断を明確にし、治療成績を検討することにより、女性の晩婚化に伴い卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する必要がある現在、患者個人のライフスタイルに合わせたリスク管理に明確な指針を示すことを目的とした。

診断基準作成のため多施設アンケート調査により症状、検査法を検討した。治療方針検討のため、クロミフェン (CC) 療法、メトフォルミン+CC 療法、低用量 FSH 療法、腹腔鏡下多孔法 (LOD) および生殖補助医療 (ART) の成績を検討した。

PCOS の診断基準として①月経異常 (希発月経、第 1 度無月経、無排卵周期症)、②卵巣所見 (小卵胞 10 個以上)、③内分泌所見 (LH 値、男性ホルモン) を提唱した。特に検査を行う時期、採血測定系 (特に男性ホルモン検査) の標準化に関し詳細にデータを示した。治療基準作成に関しては一般排卵誘発とくに低用量 FSH 治療法成績、メトフォルミン+CC 併用療法の特徴を示した。非 ART 累積妊娠率は 70% で、70% 以上は治療 6 周期までに妊娠が成立していた。ART 治療では非 PCOS 症例と概ね差が無いが OHSS 発症率が有意に高いこと、LOD 実施後 ART は OHSS のリスク低下、採卵数減少を示した。

PCOS の診断基準として国際的にも整合性のとれた①月経異常、②卵巣所見、③内分泌所見を提唱した。また、PCOS に対する低刺激排卵誘発治療の結果は良好であったが、治療には約 2 週間を要し、6 周期以降に妊娠する症例は限られるので、社会的リスクが高い症例は、より早くから ART や腹腔鏡手術の選択肢

を考慮する必要があると考えられた。LODは多胎妊娠、OHSSがなく自然妊娠が期待でき、積極的に実施すべき治療法である。LOD手術後のARTで卵巣予備能の低下が懸念されるため、LOD手術では卵巣予備能を考慮した慎重な手術が必要と考えられた。

PCOSの診断基準を月経異常、卵巣所見、内分泌所見の3つを満たすものとし、治療方針としてクロミフェン、メトフォルミン、低用量FSH療法、LOD、ARTとして総合的に治療に当たる基準を示し、その各々の特徴を明らかとすることができた。ライフスタイルの変化や社会的要因に基づき個別化して治療に当たる有用な知見を得られたことは、今後のPCOS治療にとり重要と考えられる。

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。その破綻による癌化の過程を研究した3年間のまとめを報告する。

1. チョコレート嚢胞と発癌の関係

転写因子HNF-1betaが明細胞腺癌で過剰発現している。この転写因子の発現を詳細に検討すると、分泌期子宮内膜(核下空砲を有する細胞)、子宮内膜症腺管上皮細胞、明細胞腺癌で良性でも悪性でも共通に発現していることが判明した。また、妊娠時のアリアスステラ反応にも局在する。つまり、HNF-1betaは明細胞腺癌への直接の発癌遺伝子ではないが、子宮内膜症からの癌化を考える上で大きな示唆に富むバイオマーカーとしての転写因子である。また、明細胞

腺癌にはグリコーゲン貯留がみられるが、その原因はHNF-1betaの下流には糖代謝に関する酵素群が存在するため、gluconeogenesis, glucolysis, glucogenolysisに異常が生じてグリコーゲン貯留が起こっていると考えている。

また、HNF-1betaの下流には、解毒酵素としてUGT1A1やアネキシンA4が過剰発現することも確認した。前者はCPT-11の解毒酵素であり、後者はパクリタキセルの解毒酵素である。これらの解毒酵素が過剰発現している限り、明細胞腺癌の抗癌剤耐性は克服できない。将来の明細胞腺癌の治療はHNF-1betaの発現を制御する分子標的治療が最も有力である。

2. ARID1Aの生物活性と癌化機序

ARID1A遺伝子が正常であれば、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。この状態が前癌状態である。この状態に

ARID1A, PIK3CA の遺伝子変異が加味されることにより癌化することが推測された。

子宮内膜症の癌化の過程では、出血による酸化ストレスに抵抗するために HNF-1beta が過剰発現し、細胞周期チェックポイントが作動し G2/M 停止を起すため、細胞は抗アポトーシスになり細胞死は起こらない。しかし、この状態が長時間持続することにより各種遺伝子が障害を受けたまま修復されないことになる。ARID1A および PIK3CA もその一連の遺伝子群であり、これらの変異遺伝子の蓄積により不安定性がおこり癌化を助長することになる。子宮内膜症からの発癌には P53 の遺伝子異常は認められないが、p53 パスウェイの異常と同じ現象が起こっていることが推察された。

4. ミトコンドリアとストレスに関する研究

ミトコンドリアは生命活動に必要な酸化的リン酸化代謝機能を司る細胞内小器官であり、その内部には独自の遺伝情報であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が存在している。近年、ミトコンドリア遺伝子と卵老化との関係が示唆されてきている。酸化的リン酸化代謝機能に不可欠であるミトコンドリアに着目し、妊孕性の中で受精・胚発生に関わる卵子、および卵子に強い関わりを有する顆粒膜細胞について mtDNA の量的・質的分析を介して、加齢との関係を解明し、妊孕性改善等に有用な基礎データを集積することを目的とした。また加齢卵子に特異的に生じる変化を卵子の大きさからも検討した。

IVF で棄却された、①～⑤の検体につき、インフォームドコンセントのうえ、同意を得て使用した。

① 未受精卵および未分割胚 ($n=29$, 31～44 歳, 受精後 48 時間目で分割が認め

られないもの)。② 顆粒膜細胞 ($n=22$, 31～45 歳, IVF でヒアルロニダーゼ処理し、破棄されるもの)。③ 変性卵 ($n=9$, 33～41 歳)。④ 7～8 cell の分割胚 ($n=4$, 36 歳, 受精後 72 時間目で Veeck 分類 Grade I, III のもの, 7～8 cell 分割胚からは割球を摘出した ($n=29$)。⑤ ICSI 時に倒立顕微鏡で撮影された受精卵 ($n=108$, 卵子細胞質体積を算出した)。

未受精卵・未分割胚は、40 歳以上群 (40～44 歳, $n=14$, 603, 822±46, 153) の mtDNA copy 数は、40 歳未満群 (31～39 歳, $n=15$, 784, 307±48, 379) と比較し有意な減少 ($p=0.012$) を認めた。顆粒膜細胞も有意差は認めないものの 40 歳以上の群において copy 数減少傾向を示した。変性卵 ($n=9$) は、未受精卵, 未分割胚と比較し、著しい mtDNA copy 数の減少を確認した ($p<0.01$)。7～8 cell 分割胚割球の平均 mtDNA copy 数は 673, 722±12, 952 であった。割球体積を算出したところ、割球体積と mtDNA copy 数とは、強い正の相関を認めた ($r=0.76$, $p<0.01$)。卵子細胞質体積は 40 歳未満群 (31～39 歳, $n=55$, 305085±4329 μm^3) と比較し、40 歳以上群 (40～47 歳, $n=53$, 419263±19362 μm^3) において卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した ($p<0.01$)。

また、T8993G 点変異は、全ての検体において検出されなかった。

さらに、mtDNA 量と卵子および初期胚の割球体積に正の相関 ($r=0.76$, $p<0.01$) を示した。加齢女性 (40 歳以上) 由来の卵子細胞質体積は若年女性由来と比較し、有意に増大していた ($p<0.01$) が、mtDNA 量は有意に減少していたことから加齢胚発生効率の低下に関与する因子として微小変異の蓄積による可能性は少なく、mtDNA の細胞質内の低密度化に関与していることが示唆された。

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、エピジェネティックな変化が病因として注目されるようになった。我々はヒストンのアセチル化に注目し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、アピシジンの子宮内膜症に対する治療効果について、培養子宮内膜症間質細胞を用いて検討した。

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

培養子宮内膜症間質細胞の細胞増殖についてBrdUの取り込みを指標として検討したところ、バルプロ酸、SAHA、アピシジンにより細胞増殖は抑制された。また、細胞周期、アポトーシスについてフローサイトメトリーを用いて検討したところ、バルプロ酸およびアピシジンの添加により、G0/G1 cell cycle arrest およびアポトーシスが誘導された。一方、SAHAの添加では、G2/M cell cycle arrest およびアポトーシスが誘導された。バルプロ酸、SAHA、アピシジンは子宮内膜症細胞のヒストンH3およびH4のアセチル化、細胞周期関連蛋白であるp16、p21、p27、chk2の発現を誘導した。また、SAHA およびアピシジンはアポトーシス抑制因子であるBcl-2 およびBcl-X_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。

ヒストンアセチル化をはじめとするエピジェネティクス異常が癌など様々な疾患の発症と関わるという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。

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

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。今回の研究では、本疾患の発症・進展メカニズムとして重要である炎症と免疫について4つの課題について検討した。

①近年新たなT細胞としてTh17細胞が注目されているが、我々はTh17細胞が子宮内膜症の病巣局所に集積する機序を示した。まず、子宮内膜症病巣でTh17細胞がCCR6を発現しており、そのリガンドであるCCL20が周囲の子宮内膜症間質細胞(endometriotic stromal cell; ESC)に発現していることを示した。ついで、CCL20が末梢血よりTh17細胞を遊走させることを示した。また、培養系にて炎症性サイトカインであるIL-1 β , TNF α , IL-17AがESCからの

CCL20 産生を促進することを示した。以上の所見より、子宮内膜症の局所環境として知られている炎症が各種サイトカインを介して ESC からの CCL20 産生を増やして Th17 を局所に集積させることが示唆された。

②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。予備的な実験により TGF β が 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。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。

③Th17 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。IL-17F は ESC における IL-8, COX2 の発現を促進した。

④アクチビンの子宮内膜症における役割について検討した。IL-1 β , TNF α は ESC からのアクチビンの産生を促進し、かつ、アクチビンは ESC における IL-6, PAR2 の発現を促進した。よって、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。

以上をまとめると、子宮内膜症における免疫と炎症の新たなメカニズムを明らかにすることができた。これらのメカニズムは今後の治療選択において新たなターゲットとなる可能性が期待でき、将来的には女性の妊孕性の改善、QOL の

改善などに寄与すると考えられる。

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

細胞の活性酸素の産生増加もしくはその消去能の低下によって生じる酸化ストレスが、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原因の一つに挙げられている。しかし、酸化ストレスがどのような機序で妊孕性を低下させるかについては解明が遅れている。本研究では、抗酸化に働く SOD1 と Prx4 の遺伝子欠損マウスの卵子・精子・受精・胚発生の過程について解析することで、内因性に生じる活性酸素がどのようにして老化や妊孕性の低下をもたらすか、その機序を解明することを目的とした。

方法

1、SOD1欠損胚が2細胞期で発生停止する原因について、主に細胞周期との関連で解析した。

2、SOD1欠損マウスの精子の受精能と運動能について、in vitroで解析した。

3、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。

結果

1、SOD1欠損胚は、2細胞期までと4細胞期以降の発生段階で、酸化ストレスの与える影響が大きく異なった。2細胞期での発生停止にはミトコンドリアの関与は低かった。

2、SOD1欠損マウスの精子は、培養時間に依存して運動能が早期に減衰し、受精効率が低下した。

3、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キソン 1 からの転写産物である事

が明らかになった。

考察

1、ミトコンドリア機能解析の結果、SOD1欠損胚の発生停止は、エネルギー不足が直接の原因ではなく、細胞分裂機構が選択的に傷害されたと考えられる。細胞分裂の停止には、Cdkの脱リン酸化に働くCdc25の阻害と発現誘導されたCdkインヒビターの関与が考えられた。一方、4細胞期以降に起こる細胞死には、ミトコンドリアを介するアポトーシスが関わる可能性が高い。

2、In vitroでは、SOD1欠損マウスの精子は空気中の酸素で酸化されやすいため、受精効率の低下を引き起こしたと考えられる。しかし、SOD1欠損雄マウスの妊孕性は野生型マウスと変わらないことから、vivoでは受精に関する精子の数が多いことと、酸素濃度が低いために運動能に大きな影響を与えない可能性がある。

3、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の可能性が強く示唆された。

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胚発生に与える影響と精子の酸化ストレス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KO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、より詳細な解析が可能となった。

8. 加齢とES細胞

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、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検証し、さらに、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。

加齢モデル由来ES細胞特性解析

1) ゲノム安定性研究

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た(加齢ES細胞)。体外培養系における時間軸からゲノムに与える影響を染色体核型解析によりゲノム安定性について検討した。

2) 網羅的遺伝子発現解析と遺伝子オントロロジー解析

加齢化モデルの胚より樹立した加齢ES細胞を対象にDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

3) 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、Nrp1 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った。定量的RT-PCR法にはSYBRGreen Realtime PCR Master Mix(TOYOBO)を使用した。定量の計算には、ABI software (Applied Biosystems)を用いた。

4) 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。

1. 加齢モデル由来ES細胞特性解析

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。継代初期の

段階では対象 ES 細胞では染色体核型異常の認められたものはなかったが、加齢 ES 細胞においては染色体異常が認められた。染色体の異常は異数性の異常が多く 86%、次いで性染色体の脱落が 29%だった。今回の染色体核型異常はストキャスティックにおこることが示唆された。対象 ES 細胞の結果と比べ、加齢 ES 細胞は継代を重ねると高率に染色体異常が起こることが示唆された。

網羅的遺伝子発現解析と遺伝子オントロジー解析では、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。

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能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 万ほどの卵胞数となる。月経周期毎に約 1,000 づつ減失していくが、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。

・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。

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。

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性がある。

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。

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、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 Nrp1 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。

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。

9. 加齢と受精現象に関する研究

加齢による卵巣機能の低下は、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である。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、培養方法や培養液の組成が十分に検証できないのが現状である。そこで本研究では、卵子のもつ受精能力に関する基礎的研究を行った。具体的には、卵子の膜融合関連因子 CD9 および本研究の成果として発見された CD9 を含む卵子から放出される分泌小胞、エキソソーム (exosome)、の機能解析を行い、CD9 の C 末端領域に膜融合に必須な機能領域があることを明らかにし、C 末端に EGFP を結合させた融合タンパク質 (CD9-EGFP) を卵特異的に発現させたところ、CD9 の膜融合における機能が消失することが明らかになった。一方、N 末端に EGFP を融合させた場合は

(EGFP-CD9)、CD9 の機能へは影響はなかった。更に、CD9 結合タンパク質として tubulin β 2A (tubb2A) を同定した。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ある。Tubb2A は細胞特異的に発現するタンパク質で、このタンパク質の機能解析から受精の膜融合の分子実体に基づくことができた。また、CD9 が関わる膜融合は、他の膜融合とは異なるメカニズムによって制御されていることが示唆された。加齢による卵子の受精能が低下する一因としては、CD9 の発現量の低下とエキソソームの分泌量の低下による膜融合の低下が示唆された。そこで、微小管の重合促進・重合阻害によって受精能力を制御する方法を開発することをめざした研究を行い、重合促進剤であるビンブラスチンに卵子の融合能を回復させる働きがあることを明らかにした。

また、精子と卵子の細胞接着についても検討した。 β -catenin、E-cadherin は上皮細胞の細胞接着を制御するタンパク質である。上皮細胞以外にも、存在することが調べており、卵子でも細胞膜に局在する。本研究から、精子にも両者は細胞膜に存在することがわかり、精子と卵子の細胞接着に関わっていることが推測された。一連の解析から、 β -catenin/E-cadherin 複合体が精子および卵子の細胞膜に存在しており、受精での細胞接着に機能していることが明らかになった。更に、細胞接着後に、 β -catenin の速やかな細胞膜からの消失が起こることが判明し、 β -catenin が細胞接着だけでなく、細胞融合への移行にも関与していることが示唆された。

本研究の成果から、受精における細胞接着、膜融合、接着から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。

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。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 ノックアウト雄マウスは、不妊である。その原因は、精子の輸卵管への到達障害と卵子透明帯への結合障害が報告されている。近年 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。

ヒト ACE2 トランスジェニックマウスの精子先体膜では、ACE2 が強く発現し、体外受精率および精子-卵透明帯結合能が有意に低下していた。一方、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が明らかとなった。精子先体膜上には体細胞型 ACE と共に、ACE2 が高発現しているため、ACE2 の基質であるアンギオテンシン II の濃度を定量

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。

近年 RAS は多くの組織で機能していることが明らかとなっている。本研究により、精子受精能獲得においても RAS が機能し、ACE2 の機能障害は、精子前培養液中のアンギオテンシン II の濃度上昇を引き起した。アンギオテンシン II は AT1 受容体を介した cAMP 濃度上昇を引き起こすことで、精子の受精獲得を促進することが明らかとなった。

低受精率のマウス凍結精子に ACE2 阻害剤を添加すると、受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(特許公開 2010-150162)。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。

II. 分担研究報告