

では IL-6 分泌は PAR2AP 刺激前と比べ 2.8 倍であるが、TGF- $\beta$  前投与によりこの比は約 9.8 倍となった。TGF- $\beta$  の type I 受容体阻害剤である SB431542 は TGF- $\beta$  による PAR2 mRNA 発現を抑制した。また、TGF- $\beta$  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 ESC 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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  による PAR2 mRNA 発現を抑制した。Smad4 siRNA 導入により Smad4 mRNA は約 22% 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- $\beta$  による PAR2 発現は抑制を受けなかった。

③ (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-8 mRNA, COX2 mRNA の発現が増加した。 (3) IL-17F と TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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。

④ IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  刺激により、inhibin/activin $\beta$  A mRNA は約 4 倍発現が増進した。一方で inhibin- $\alpha$  および inhibin/activin $\beta$  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 倍と発現が増進した。

#### D. 考察

本研究により、Th17 細胞が子宮内膜症組織で CCR6 を発現していることが明らかとなり、CCR6 とそのリガンドである CCL20 が子宮内膜症組織の同様な部位に局在していることが明らかにされた。CCL20 は子宮内膜症患者の末梢血中 Th17 の遊走を特異的に促進した。また、子宮内膜症間質細胞からの CCL20 分泌が IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-17A という炎症性サイトカインにより促進されることが示され、これらの作用は各種 MAP キナーゼ阻害薬により抑制された。上記の所見より Th17 細胞が子宮内膜症組織に局在していることが説明しえる。すなわち、子宮内膜症組織、特に、間質細胞で産生される CCL20 が作用して、CCR6 を発現している Th17 細胞を病巣局所へと移動を誘導すると考えられる。子宮内膜症は、慢性炎症性疾患であり、局所において上記の炎症性サイトカインの産生が増進していることが知られている。よって、免疫染色でも認められた病巣局所での CCL20 発現にはこれらの炎症性サイトカインによる刺激が関与していると考えられ、培養実験でみられた結果とよく一致する。なかでも興味深いのは、IL-17A によっても CCL20 産生が促進されることであり、このことから、子宮内膜症への Th17 細胞遊走にはいわゆるポジティブフィードバック機構も存在していると考えられる。一方、TNF $\alpha$  と IL-17A が相乗作用を示したことは、子宮内膜症の治療を考えると、いずれか一方を阻害することにより病気の進行を著しく阻止できる可能性を示唆している。また、各種 MAP キナーゼ阻害剤が炎症性サイトカインによる CCL20 産生を阻害したことも治療の観点から興味深い所見であり、

我々が以前に報告した子宮内膜症モデルマウスにおける p38MAP キナーゼ阻害剤による病巣抑制効果との関連が推測される。

次に、PAR2 に関しては、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 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  が PAR2 発現を増加させ、皮膚の線維芽細胞においては TGF- $\beta$  が、ヒト臍帯静脈内皮細胞では IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  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 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  では PAR2 発現は変化せず、これらのうち TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  が IL-6 を増加させることは、子宮内膜症の進展にかかわっていると考えられる。本研究では TGF- $\beta$  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- $\beta$  が子宮内膜症に関連し増悪因子であると思われる。しかし、TGF- $\beta$  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- $\beta$  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。

IL-17F についても重要な所見が得られた。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 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 $\alpha$  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。

最後にアクチビンについてであるが、IL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ 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次の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

今回の研究より子宮内膜症の進展機序として炎症と免疫が相互に関係しあいながら、巧妙な調節を受けていることが明らかになった。この調節機構には、Th17細胞の遊走とIL-17A, 1L-17F産生による炎症が正の増幅を受けることや、TGF $\beta$ によるPAR2の増加という分子レベルでの炎症の増幅が含まれていることが明らかとなった。また、アクチビンにもこのような炎症を仲介する作用が示唆された。以上より、適切な分子標的の抑制により子宮内膜症を進展させる重要な増幅機構を阻害できれば、非常に効果的な創薬につながる可能性が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Wada-Hiraike O, Yamamoto N, Osuga Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y: Aberrant implantation and growth

of uterine leiomyoma in the abdominal wall after laparoscopically assisted myomectomy, *Fertil Steril* 2009, 92:1747

- 2) Takamura M, Koga K, Osuga Y, Takemura Y, Hamasaki K, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y: Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision, *Hum Reprod* 2009, 24:3042-3048
- 3) Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y: Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells, *Fertil Steril* 2009, 92:1794-1798
- 4) Fu L, Osuga Y, Yano T, Takemura Y, Morimoto C, Hirota Y, Schally AV, Taketani Y: Expression and possible implication of growth hormone-releasing hormone receptor splice variant 1 in endometriosis, *Fertil Steril* 2009, 92:47-53
- 5) Kodama A, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, Takamura M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Takemura Y, Yano T, Taketani Y: Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells, *Hum Reprod* 2010;25:751-756
- 6) Koga K, Hiroi H, Osuga Y, Nagai M, Yano T, Taketani Y: Autoamputated adnexa presents as a peritoneal

- loose body, *Fertil Steril* 2010;93:967-968
- 7) Ouyang Z, Osuga Y, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y: Interleukin-4 induces expression of eotaxin in endometriotic stromal cells, *Fertil Steril* 2010; 94: 58-62
  - 8) Koga K, Osuga Y, Tajima T, Hirota Y, Igarashi T, Fujii T, Yano T, Taketani Y: Elevated serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole, *Fertil Steril* 2010, 94; 305-308
  - 9) Koizumi M, Momoeda M, Hiroi H, Hosokawa Y, Tsutsumi R, Osuga Y, Yano T, Taketani Y: Expression and regulation of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human endometrium, *Fertil Steril* 2010; 93:1538-44
  - 10) Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y: Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells, *Fertil Steril* 2010; 93: 1273-9.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) Hirata T., Osuga Y., Takamura M., Kodama A., Hirota Y., Koga K., Yoshino O., Harada M., Takamura 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.
  - 14) 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.
  - 15) 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.
  - 16) 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.
  - 17) 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. Am J Reprod Immunol.* 2011;65:421-7
- 18) 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.* 2011;27:717-20
- 19) 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.* 2011;27:351-5
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) Saito A., Osuga Y., Yoshino O., Takamura M., Hirata T., Hirota Y., Koga K., Harada M., Takemura 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.
- 24) 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.
- 25) Wang B., Koga K., Osuga Y., Hirata T., Saito A., Yoshino O., Hirota Y., Harada M., Takemura 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.
- 26) 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.
- 27) 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.

- 28) 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) 小泉美奈子, 廣井久彦, 藤本晃久, 清木孝之, 大井なぎさ, 大須賀穰, 百枝幹雄, 矢野哲, 武谷雄二; 体外受精後にPIDを発症した2症例; 第54回日本生殖医学会
- 2) 堤亮, 藤本晃久, 竹村由里, 小泉美奈子, 渡辺裕子, 大井なぎさ, 田中慧, 張士青, 廣井久彦, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二; ART妊娠と一般不妊妊娠の周産期予後の検討; 第54回日本生殖医学会
- 3) 竹村由里, 藤本晃久, 堤亮, 大井なぎさ, 小泉美奈子, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二; ART妊娠における前置胎盤のリスクについての検討; 第54回日本生殖医学会
- 4) 高村将司, 甲賀かをり, 児玉亜子, 濱崎かほり, 田島敏樹, 長谷川亜希子, 竹村由里, 原田美由紀, 森本千恵子, 平田哲也, 廣田泰, 吉野修, 大須賀穰, 武谷雄二; 低用量ピルは腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術の術後再発を低下させる; 第54回日本生殖医学会
- 5) 大須賀穰; 婦人科がんの妊孕性温存治療 子宮内膜症の妊孕性温存治療 ; 第54回日本生殖医学会
- 6) 児玉亜子, 大須賀穰, 吉野修, 泉玄太郎, 高村将司, 長谷川亜希子, 竹村由里, 原田美由紀, 平田哲也, 廣田泰, 甲賀かをり, 矢野哲, 武谷雄二; TGF $\beta$ は子宮内膜症細胞においてPAR2の発現・機能を促進する; 第14回生殖内分泌学会
- 7) 鶴賀哲史, 有本貴英, 富尾賢介, 川名敬, 中川俊介, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二; Planned treatment delayにより生児を得た子宮頸部浸潤癌合併妊娠の一例; 第118回日本産科婦人科学会関東連合地方部会
- 8) 山本直子, 甲賀かをり, 藤本晃久, 丸山正統, 稲生信一, 赤羽正章, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二; 子宮動脈バルーン留置併用子宮全摘術にて治療し得た子宮動静脈奇形の一例; 第118回日本産科婦人科学会関東連合地方部会
- 9) 鶴賀哲史, 川名敬, 織田克利, 有本貴英, 土谷聡, 清木孝之, 中川俊介, 八杉利治, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二; 卵巣癌明細胞腺癌I・II期の予後因子の検討 子宮内膜症との関連から; 第47回日本癌治療学会
- 10) 永井美和子, 甲賀かをり, 平田哲也, 平池修, 藤本晃久, 廣井久彦, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二, 福嶋敬宜; 診断的腹腔鏡検査で左付属器欠損と腹腔内遊離体を発見した一例; 第117回日本産科婦人科学会関東連合地方部会
- 11) 森住佑子, 齋藤真由子, 松本陽子, 有本貴英, 砂川空広, 川名敬, 織田克利, 中川俊介, 大須賀穰, 矢野哲, 上妻志郎, 武谷雄二; Pseudo-Meigs 症候群を合併した骨盤内腫瘍の2例; 第117回日本産科婦人科学会関東連合地方部会
- 12) 平田哲也, 大須賀穰, 高村将司,

- 児玉亜子, 甲賀かをり, 吉野修, 原田美由紀, 竹村由里, 長谷川亜希子, 田島敏樹, 矢野哲, 武谷雄二; 子宮内膜症間質細胞 (ESC) における IL-17F の作用について; 第 61 回日本産科婦人科学会
- 13) 長谷川亜希子, 大須賀穰, 広田泰, 濱崎かほり, 児玉亜子, 原田美由紀, 竹村由里, 平田哲也, 森本千恵子, 吉野修, 矢野哲, 武谷雄二; Tunicamycin(TM) は子宮内膜症間質細胞における TRAIL 誘導性アポトーシスを特異的に増強する; 第 61 回日本産科婦人科学会
- 14) 児玉亜子, 大須賀穰, 吉野修, 長谷川亜希子, 高村将司, 原田美由紀, 平田哲也, 濱崎かほり, 矢野哲, 武谷雄二; ヒト子宮内膜における BMP-7 の発現および機能に関する検討; 第 61 回日本産科婦人科学会
- 15) 吉野修, 長谷川亜希子, 大須賀穰, 武谷雄二, 西井修; ヒアルロン酸の子宮内膜症への治療効果に関する基礎的検討; 第61回日本産科婦人科学会
- 16) 吉野修, 大須賀穰, 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
- 17) 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, 大須賀穰, 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
- 18) 児玉亜子, 大須賀穰, 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 $\beta$  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
- 19) 泉玄太郎, 平田哲也, 甲賀かをり, 大須賀穰, 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
- 20) 平池修, 大須賀穰, 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
- 21) 矢野直美, 大須賀穰, 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
- 22) 鶴賀哲史, 川名敬, 有本貴英, 土谷聡, 中川俊介, 大須賀穰, 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
- 23) 宮坂亜希, 川名敬, 藤井知行, 大須賀穰, 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
- 24) 大橋奈尾子, 嘉本寛江, 永松健, 吉田志朗, 兵藤博信, 大須賀穰, 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
- 25) 齊藤泉, 磯野涉, 土谷聡, 甲賀かをり, 川名敬, 中川俊一, 大須賀穰, 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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巣粘液性腺癌 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
- 30) 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. 診断に苦慮した卵巣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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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)  $\alpha$   
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

38) 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

39) 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

40) 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

なし

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

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。

A. 研究目的

加齢や子宮内膜症・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、細胞の活性酸素(ROS)消去能が低下することによる酸化ストレスが挙げられる。こうした病態では脂質や蛋白質、核酸の酸化物が上昇する事が知られているが、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明確になっていない。

ROSの消去には、直接反応して無毒化するビタミンA・C・Eやグルタチオンといった抗酸化化合物や、抗酸化酵素がある。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負荷し、その効果について調べてきた。しかしこうした実験の場合は、細胞外からの投与であり、しかも通常は過剰量が投与されるため、代謝などに伴って内因性に生じる酸化ストレス状態を反映しているかどうかについては疑問が残る。それに対して、抗酸化に働く遺伝子を欠損するマウスでは、生成

したROSが安定に存在することで内因性酸化ストレスが生じるため、生理条件により近い状態でその影響について解析する事が可能である。

我々はこれまでに酸素分子が一電子還元を受けて生じる最初のROSであ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、酸化ストレスの妊孕性への影響について解析を行ってきた。SOD1-KO胚は、20%酸素培養では2細胞期で停止し、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。また、SOD1-KOマウスの精巣は熱ストレスに対する感受性が高く、精子形成細胞がアポトーシスを起こしやすい事を報告した(Ishii et al, Free Radic Res, 2005)。

最近、チオレドキシシン依存性に過酸化水素を除去する新規抗酸化酵素の1つ Peroxioredoxin 4(Prx4)の遺伝子欠損マウスの開発に成功し、その解析を行うこ

とで精子形成への関与を強く示唆する結果を得た。Prx4はN末に疎水性シグナル配列を有することから、主に分泌/小胞体で機能すると考えられる。一方で、性成熟した精巣では、高分子型のPrx4が発現することから、我々は精子形成への関与の可能性を提唱してきた(Sasagawa et al, Eur J Biochem, 2001; Fujii & Ikeda, Redox Rep, 2002)。

本研究は、内因性に生じる活性酸素と老化や妊孕性の低下につながる各種疾患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を用いて、卵子・精子・受精・胚発生の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酵素・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、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のGFP/Cyt c-Tgマウスの作製を行った。

## B. 研究方法

### 1. 酸化ストレスによる胚発生障害のSOD1欠損胚を用いた解析

1) SOD1欠損胚が2細胞期で発生停止する理由として、ミトコンドリアの機能が低下し、エネルギー供給の不足が生じることが主要因とされてきた。そこで、ミトコンドリア機能を評価するために、個々の胚による酸素呼吸量をScanning Electrochemical Microscope(SECM)で、ATP含量をルシフェラーゼ法で、膜電位を蛍光プローブのJC-1を用いて測定した。

2) 細胞分裂が停止した原因を明らかにするために、RT-PCRによりCdkインヒビター遺伝子(p16, p19, p21, p27)のmRNA発現を解析した。

3) SOD1欠損4細胞期胚を通常酸素に曝し、細胞死を起こした胚がアポトーシス・ネクローシス・その他の細胞死のいずれによって死ぬのか、DNA結合色素(Propidium Iodide, Hoechst33342)とFITC標識Annexin Vを用いて検討した。

### 2. SOD1欠損精子の解析

1) SOD1欠損マウスより精子を採取して、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 Activity (CASA)を用いて解析した(本実験は成育医療センター宮戸健二先生のご協力による)。

### 3. Prx4の精巣における機能の解析

1) 野生型マウスとPrx4-KOマウスについて、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を作製し、その抗体を用いて免疫染色・ウエスタンブロット解析を行った。

3) Prxのメンバーは過酸化水素を消去する過程で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て解析した。

### 4. G6PD-Tgマウスの作製と解析

1) NADPHを産生し反応を律速するヒト野生型(wtG6PD)を発現するTgマウスと、貧血患者で見出された変異型(mtG6PD)を発現する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-wtG6PD-TgとloxP-mtG6PD-Tgマウスを作製した。

2) 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G6PDを発現するマウスを作製した。

### 5. GFP/Cyt c-Tgマウスの作製と解析

1) 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) の融合遺伝子の発現を可能とする、CAGプロモーターでGFP/Cyt c 融合遺伝子をドライブするベクターを作製した。

2) 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Tgマウスを作製した。

3) マクロファージを単離後、蛍光顕微鏡下にミトコンドリアを観察した。

## 6. 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. 酸化ストレスによる胚発生障害のSOD1欠損胚を用いた解析

SOD1欠損胚を通常の酸素濃度(20%)で培養すると2細胞ですべて分裂停止した。この発生停止は、各種還元剤や抗酸化剤を培地に加えても解除されなかったが、1%酸素で培養すると解除され、ほぼ正常に発生した。そこで、20%と1%酸素下に培養する事で、SOD1欠損と野生型マウスの胚でスーパーオキシドの生成に違いがあるか調べた。その結果、スーパーオキシド生成量は1%酸素培養では違いが認められなかったが、20%酸素培養ではSOD1欠損胚の方が多かった。したがって、SOD1を欠損するために、呼吸により過剰に生じた活性酸素が酸化ストレスを惹起し、細胞分裂停止をもたらしたと考えられた。これまでの報告によると、こうした酸化ストレスによる発生障害の多くにミトコンドリア傷害が関係すると説明されていたため、ミトコンドリアの機能として酸素消費・ATP含量・膜電位を測定した。その結果、発生停止した胚でもこうしたミトコンドリアの機能はほぼ正常に維持されていることが明らかになった(Kimura et al, Mol Hum Reprod, 2010)。

細胞分裂が停止した原因としては、Cdk/サイクリンの機能傷害とCdkインヒビターの異常発現が考えられる。今回はRT-PCRによりCdkインヒビター遺伝子(p16, p19, p21, p27)の発現を解析する事で、その関与について検討した。その結果、SOD1欠損胚を20%酸素で培養した場合に、p16の発現が特に亢進していた。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。

発生が障害され細胞死に至る場合に、どのような細胞死の過程を経るかについて知る事は、活性酸素によって傷害される分子機構を知る手がかりとなる。そこで、SOD1欠損4細胞胚を通常酸素に曝し細胞死を起こした胚が、アポトーシス・ネクローシス・その他の細胞死のいずれによって死ぬのか検討したところ、少なくともその初期の段階ではアポトーシスが起ることが分った。

### 2. 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報告がないため、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*で受精させた場合の受精能は、SOD1-KO精子では著しく低下していた。

そこで、受精過程について検討を行った。その結果、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。

### 3. Prx4の精巣における機能の解析

Prx4は全身に発現が見られる小胞体/分泌型が同定されており、我々はPrx4のプロモーター/エキソン1を欠損するマウスを作製した(Iuchi et al, Biochem J,

2009)。その結果、精巣の発達障害が認められたが、成熟後には受精能に異常はなかった。しかし、Prx4-KOマウスの精巣蛋白質のウェスタンブロット解析から、高分子量蛋白質の発現が認められた。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することが分かった。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抗体で検出を試みたところ、Prx1~Prx3は過酸化されたが、Prx4の過酸化体は検出されなかったことから、過酸化水素の消去以外の働きが示唆された(Yim et al, J Biol Chem, 2011)。

#### 4. G6PD-Tgマウスの作製と解析

胚発生過程と抗酸化におけるNADPHの役割を調べるために、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に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る事で、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。コンディショナルG6PD-Tgマウスを作製するために、wtと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、まずCre recombinaseを全身に発現するCre-Tgマウスと交配し、全身にG6PD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wtG6PD-TgとmtG6PD-Tgマウスの存在が確認できたので、繁殖した後解析に用いる予定である。

#### 5. GFP/Cyt c-Tgマウスの作製と解析

Cyt cはミトコンドリア局在性のタンパクで電子伝達を担うと同時に、アポトーシスの際には細胞質に移行して、アポトーシス経路を活性化する鍵を握る蛋白質である。Cyt cを可視化することで、ミトコンドリアを介するアポトーシスの関与を明確にできる。GFP/Cyt c-Tg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。マウスより採取したマクロファージを蛍光顕微鏡下で観察したところ、紫外線照射によりミトコンドリアと思われる細胞器官が緑色蛍光を発していた。また、抗GFP抗体と抗Cyt c抗体を用いたウェスタンブロット解析から、作製したマウスでは本来のCyt cの位置と、Cyt cにGFPの分子量を足した高分子量の位置にバンドを認めた。この高分子量のバンドだけが抗GFP抗体と反応した。以上の結果から、目的のマウスを樹立できたと考える。本マウスについても、実験に供するために現在繁殖を行っている。

#### D. 考察

##### 1. 酸化ストレスによる胚発生障害のSOD1欠損胚を用いた解析(図1)

SOD1欠損胚を用いた検討結果は、2細胞期までの発生段階と、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る事を示している。したがって、酸化ストレスの影響に関しては、二つの時期を分けて考える必要がある。

2細胞で発生停止するSOD1欠損胚を、通常(20%)酸素から低(1%)酸素培養に移す事で正常に発生するようになることから、20%酸素に曝される事で生じた活性酸素により胚が酸化傷害を受けたと推定された。これまでの通常胚を用いた検討では、胚外から過酸化水素の投与などにより酸化ストレスを与えて発生過程への影響を解析する事が多かった。その結果から、ミトコンドリアが傷害されることから、エネルギー供給不足が起り、それが

発生停止をもたらすと結論されていた。しかし、今回のSOD1欠損胚を用いた検討では、胚外からROSを投与しておらず、呼吸の結果胚細胞内に内因性に生じた活性酸素が発生停止をもたらしたことを示している。ミトコンドリア機能解析の結果、呼吸量や膜電位が正常なことから、エネルギーの不足が直接の原因ではないと考えられる。また分裂停止した胚は2-3日は呼吸などの生理機能を維持しており、細胞死をもたらす傷害とは異なる機構が働いたことを示唆している。

発生停止した胚は長時間に渡って生存が確認されたので、酸化ストレスにより細胞周期の進行が特異的に阻害された可能性がある。そこで体細胞で解明されている結果も踏まえ、細胞周期の調節機構に焦点を置いた、新たな仮説を提唱したい。細胞分裂の進行にはCdkによる細胞分裂機構が活性化されている必要がある。Cdkへのサイクリンの結合に加えて、リン酸化されているCdkが脱リン酸化されることにより活性化される。Cdc25はその脱リン酸化を担うタンパク質脱リン酸化酵素であり、活性中心のシステインは特に酸化に対して感受性が高く、酸化刺激により容易に活性を失うことが知られている。すなわち、SOD1欠損胚に見られる2細胞期停止において、Cdc25の活性中心が活性酸素の標的となった可能性が考えられる。一方、活性型となったサイクリン/CdkにCdkインヒビターが結合すると不活性化し、細胞分裂の停止をもたらす。今回、Cdkインヒビターの一つで、細胞周期を抑制することで細胞老化に関わる事が知られているp16の発現亢進が認められた。このように、通常の体細胞で明らかにされた酸化ストレスによる細胞分裂停止と同じ機構で、胚発生が制御されている可能性がある。今後は、この仮説の妥当性についてさらに検証する必要がある。

1%酸素下に4細胞期まで発生させたSOD1欠損胚を20%酸素培養に移す事で、細

胞分裂停止ではなく細胞死が誘導された。このように、酸化ストレスによる影響が2細胞期までの時期と大きく異なる原因については、胚の発生段階における代謝の違いが関係すると考えられる。マウス胚では4細胞期以降呼吸活性が増し、ミトコンドリアによるATP合成が高まる。それまでは小さく、未分化な状態であったミトコンドリアが、この時期から肥大し活発に働くことが知られている。エネルギー代謝に加えて、ミトコンドリアにはアポトーシス誘導ならびに促進に働く分子が集結し、放出されたCyt cがアポトーシスの実行に関わるカスパーゼ経路を活性化する。胚に見られるアポトーシス様の細胞死が起る時期とミトコンドリアの発達の時期が重なる事に加えて、こうしたアポトーシスにおけるミトコンドリアの役割を考慮すると、酸化ストレスを受けた4細胞期胚に見られる細胞死にミトコンドリアが関わる可能性が高いと推測される。ここで観察された細胞死に、ミトコンドリアがどのように関わるかについては、以下のGFP/Cyt c-Tgマウスを用いた解析が有用であり、解明を進めたい。

## 2. SOD1欠損精子の解析

SOD1-KO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。SOD1-KO精子では脂質過酸化物が実際に増加しており、本結果と一致する。SOD1欠損雄マウスの妊孕性は野生型マウスと変わらない事から、*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運動能に大きな影響を与えないことが原因と考えられる。

## 3. Prx4の精巣における機能の解析(図2)

チオレドキシシン依存性ペルオキシダーゼ活性を有するPrxは、抗酸化に加えて活性酸素シグナルの制御を行う事が明らかになってきた。Prx4は疎水性シグナル配

列をN末端に有することから、分泌/小胞体型で働くことが報告されている。最近我々は、Prx4は細胞質でも機能し、例えばG-CSF受容体による細胞内シグナル伝達を抑制的に制御していることを報告した(Palande et al, J Cell Sci, 2011)。さらに、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。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、この精巣特異的Prx4の精子形成への関与について明らかにできると考える。

#### 4. 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。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することで、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。

#### 5. GFP/Cyt c-Tgマウスの作製と解析

作製したGFP/Cyt c-Tgマウスを用いることで、ミトコンドリアを可視化できる。未受精卵では未発達なミトコンドリアが、受精後に発達するため、本Tgマウスより採取した受精卵でミトコンドリアがどのようにして分化・発達して行くか、その過程を可視化して連続的に追うことが可能となった。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、4細胞期以降のSOD1欠損胚に見られる細胞死の解析に適用することで、アポ

トーシスの誘導に関して有用な情報が得られる。

#### 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。さらに、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Tg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) Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, Okabe M, Ikeda Y, Fujii J. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J*, 419(1);149-158:2009.

2) Shibasaki T, Iuchi Y, Okada F, Kuwata K, Yamanobe T, Bannai S, Tomita Y, Sato H, Fujii J. Aggravation of ischemia-reperfusion-triggered acute renal failure in xCT-deficient mice. *Arch Biochem Biophys*, 490(1);63-69:2009

3) Onuma K, Sato Y, Ogawara S, Shirasawa N, Kobayashi M, Yoshitake J, Yoshimura T, Iigo M, Fujii J, Okada F. Nano-scaled Particles of Titanium Dioxide Convert Benign Mouse Fibrosarcoma Cells into Aggressive Tumor Cells. *Am J Pathol*, 175(5);2171-2183:2009

4) Iuchi Y, Okada F, Takamiya R, Kibe N, Tsunoda S, Nakajima O, Toyoda K, Nagae R, Suematsu M, Soga T, Uchida K, Fujii J. Rescue of Anemia and Autoimmune Responses in SOD1-Deficient Mice by Transgenic Expression of Human SOD1 in Erythrocytes.

- Biochem J, 422(2); 313-320:2009.
- 5) Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 46(4);443-453:2009.
- 6) Kimura N, Tsunoda S, Iuchi Y, Abe H, Totsukawa K, 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(7), 441-451, 2010.
- 7) 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(7), 935-944, 2010.
- 8) Ikeda Y, Ito R, Ihara H, Okada T, Fujii J. Expression of N-terminally truncated forms of rat peroxiredoxin-4 in insect cells. *Protein Expr Purif*. 72(1), 1-7, 2010.
- 9) 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(1-2), 181-194, 2010.
- 10) 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(8), 1133-1144, 2010.
- 11) 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(44), 33834-3384, 2010.
- 12) 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.
- 13) Fujii J, Tsunoda S. Redox regulation of spermatogenic process and fertilization. *Asian J Androl, review*, 13(3):420-423, 2011
- 14) 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
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.

## 2. 著書

1) Fujii J, Iuchi Y. Requirement of Multiple Antioxidative/Redox Systems to Support Male Fertility. In *Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects*. (Glantz B, Klas Edquist eds), Nova Science Publishers, Inc, New York, p33-54 (2010)

2) Kimura N, Fujii J. Active oxygen species as a signal of embryonic developmental arrest and death. In *Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects*. (Glantz B, Edquist K eds), Nova Science Publishers, Inc, New York, p55-75 (2010)

3) 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

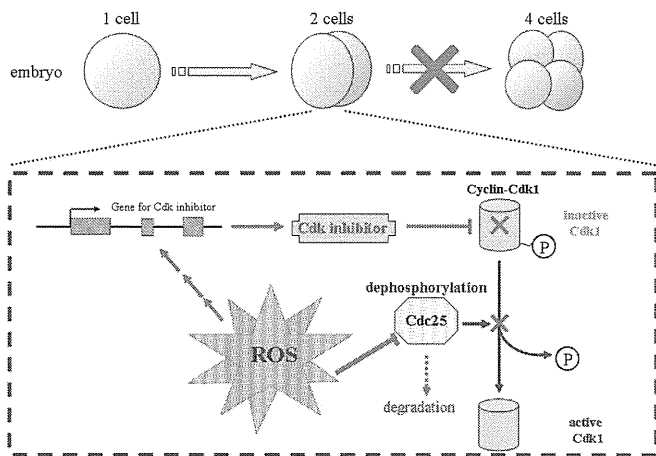


Fig 1. SOD1-KO マウス胚の発生障害から得られた活性酸素の標的と発生停止の機構

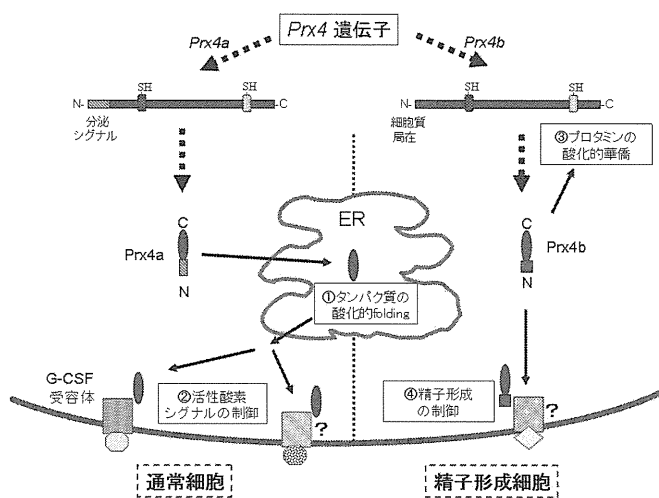


Fig 2. Prx4 の多面的な機能と精巣特異的 Prx4 分子の精子形成への関与の可能性

## 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。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。

### 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細胞の有用性を検証する。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nの提示を目指す。

### B. 研究方法

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い、分子レベルでその特徴を見いだす。細胞学的特性解析により検証する。

#### 1. 加齢モデル由来ES細胞特性解析

##### 1) ゲノム安定性研究

実験動物マウスを用いて行う。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、極限られた知見が得られるのみであった。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るゲノム安定性について検討した。対象ES細胞7株、加齢ES細胞6株を初期継代と継代数20を超えた時点で解析を行なった。染色はGバンド染色法を用いて行った。今回はGバンド詳細分析を20細胞行い、モード分析（染色体数のカウント）を30細胞、合計50細胞ずつを分析した。

## 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。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トロロジー解析を行った。

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なった。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。

(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

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2株（0-#2、0-#7）で染色体異常が認められた。さらに培養を続け20継代過ぎたところで解析した結果、染色体核型異常が検出されてきた。対象ES細胞では1株（ICSI-#2）、加齢ES細胞では5株で染色体の異常が発見された。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。さらに何番染色体にどのような異常が認められたか解析した。特定の染色体にトリソミー型の異常がおこる傾向性は見いだすことができなかった。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。

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