

齢と卵子の質との関わりを念頭に、加齢 ES 細胞の網羅的遺伝子発現解析から有意差のあった遺伝子を抽出し、細胞機能に標的をしぼり細胞機能分類を行った。抽出した遺伝子群に対しての意義付けとして機能分類するために遺伝子オントロジー解析を行った結果、加齢 ES 細胞群で低発現遺伝子では 32 もの遺伝子オントロジータームが当てはまり、機能分類することが可能であった。加齢 ES 細胞では何らかの機能的な特性が存在することが強く示唆された。細胞活動での機能分類では、“cell adhesion”、“biological adhesion”などの細胞接着の低下が示唆され、細胞成分に関する機能分類では“extracellular”に関する機能低下が示され、細胞外基質に関与する遺伝子の発現低下により加齢 ES 細胞では接着性に機能低下がおきていることが示唆された。

遺伝子発現に有意差のあった遺伝子群から細胞接着及び細胞外基質に関連する遺伝子を抽出し、リアルタイム定量 RT-PCR 法解析を行った。Pcdhb20 (protocadherin alpha 20)、Spon2 (spondin 2, extracellular matrix protein)、Pcdhb6 (protocadherin alpha 6) や Nrp1 (neuropilin 1) は遺伝子発現量が加齢 ES 細胞で有意に低下していることが確認された。

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

個体加齢と卵細胞質との関連性について卵細胞機能に関する新たな分子メカニズムの解明を行う。加齢モデルを構築し、卵細胞への影響を観察する実験システムは個体あるいはそれより得られるサンプルの希少性よりこれまで世界的にも十分な解析システムが構築されず、知見が得られてもバリデートす

るシステムを構築することは極めて重要である。本研究では、胚盤胞期胚の将来胎児となる内部細胞塊から樹立される ES 細胞を加齢化モデルの胚より樹立しその特性解析から加齢化卵の多分化能性へ寄与する性質を体外培養系で探る実験系を構築した。加齢 ES 細胞の遺伝子発現で有意差のある遺伝子群の機能分類を試みた結果細胞の接着系の機能が低下していることが示唆された。定量的リアルタイム RT-PCR 法によっても細胞接着に関連する遺伝子である Pcdhb20、Pcdha6、Nrp1、Spon2 が対象 ES 細胞群に比べて加齢 ES 細胞の遺伝子発現が減少しているということがわかった。加齢 ES 細胞では接着性及び細胞外基質の性質に機能低下がおきていることが示唆された。ES 細胞という分化多能性幹細胞に個体加齢の影響が投影されていることが示唆され、特に細胞接着性について機能解析を進める必要がある。抽出できた遺伝子には胎盤成熟や機能に関与する遺伝子と関連するものがあり、加齢が周産期ステージへの影響をみる評価マーカーとしてなりうるかも今後は検討する必要がある。そのために、バリデーションを進め、定量的にも発現に有意差のある遺伝子の機能解析から胎盤発生及び機能に関わる関連性を解析していく。

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

加齢モデルマウス由来の卵子をもとに樹立した ES 細胞について網羅的遺伝子発現解析から遺伝子オントロジー解析を行った。加齢 ES 細胞で細胞接着及び細胞外基質に関連する遺伝子発現の低下が認められた。リアルタイム RT-PCR 法解析から Pcdhb20、Spon2、Pcdhb6 や 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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Chen A, Egli D, Niakan K, Deng J, Akutsu H, Yamaki M, Chad C,

Fitz-Gerald F, Zhang K, Melton D, Eggan

K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of

human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell

lines. *Cell Stem Cell*. 2009; 4:103-106.

2) Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence

of tetraspanin CD9. *Differ.* 2009; 78:137-142.

3) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2009;19:480-493.

4) Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells.* 2009; 14:1395-1404.

5) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell.* 2009; 5: 491-503.

6) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 401(3):480-486.

7) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi

Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One.* 2010; 5(9):e13017.

8) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 106(6):860-870.

9) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010; 465(7295):175-181.

10) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(3):480-493.

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

12) 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 cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 1, Article number: 68

13) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram*. 2011;13(4):361-370.

14) Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 2011; 286(23):20345-20353.

15) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 2011; 7(5):e1002085.

16) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011;11:22.

17) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 2011; 286(13):11593-11603.

2. 学会発表  
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

加齢と受精現象に関する研究

研究分担者 宮戸 健二

国立成育医療研究センター 研究所 生殖・細胞医療研究部 室長

研究要旨

本研究では、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  $\beta$ -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/ $\beta$ -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  $\beta$ -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。

A. 研究目的

加齢にともな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 歳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、出産にとって大きなリスクとなっている。

卵子の受精能力を回復・維持させる研究がおこなわれているが、受精の分子メカニズムに関する科学的知見が不十分なため、卵子の機能異常や機能改善に関する分子レベルでの指標が設定できず、卵子の加齢度合いの進行状況を診断することができないのが現状である。

我々は、遺伝子欠損マウスを用いた分子生物学的および生化学的アプローチから、膜 4 回貫通型タンパク質 CD9 が受精の膜融合に必須であることを報告した (Miyado *et al.* *Science*, 2000; Miyado *et al.* *PNAS*, 2008)。一方、卵子と精子の細胞接着のメカニズムは、教科書的な書籍にも記載されているインテグリンと ADAM ファミリーの関与が、遺伝子欠損マウスの解析によって否定されてしまった後、不明のままである。

本研究では、CD9 の精子と卵子の細胞融合における役割と、E-cadherin と  $\beta$ -catenin の細胞接着における役割、更に、細胞接着から細胞融合への移行の分子メカニズムに関して研究を行った。

B. 研究方法

(1) 試料の作製

モデル動物として、8~12 週齢の性成熟した C57BL/6 系統のマウスを用いた。卵子は過排卵処理されたマウスの卵管膨大部より採取された。精子は同じ系統の 8~12 週齢の性成熟した雄マウスの精巣上体から集められた。

(2) 体外授精

8~12 週齢の性成熟した C57BL/6 系統の雌マウスから集められた卵子を、受精培地 (TYH 培地) を含むドロップ内に集め、事前に TYH 培地で 2 時間培養し、受精能を獲得させた精子を  $1.5 \times 10^5/\text{ml}$  の最終濃度になるよう添加し、6、24 時間培養、固定処理をした後、授精効率、融合精子数の測定を測定し、更に、免疫

染色によってタンパク質の局在解析を行った。また、卵子を取り囲む細胞外マトリックスである透明帯を、酸性タイロード液への数十秒の暴露によって除去した後、事前に TYH 培地で 2 時間培養した精子を  $1.5 \times 10^5/\text{ml}$  の最終濃度になるよう添加し、1 時間培養後、卵子の細胞膜に接着した精子数を数えることにより、細胞接着能を定量化した。更に、卵子から精子への蛍光試薬である 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) の移行を利用して、卵子に融合した精子数を定量化した。

### (3) 免疫染色

2%パラホルムアルデヒド、0.1%ホルムアルデヒドを含む HEPES 溶液 (pH8.0) (HBS) で処理した標本を 3%牛血清を含む溶液で希釈した 1 次抗体と 2 時間反応させ、洗浄後 Alexa488 または Alexa564 結合 2 次抗体と 1 時間反応させた。同時に、細胞の核を DAPI で染色した。蛍光像の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いた。撮影した写真の蛍光強度からヒストグラムを作成し、細胞膜でのタンパク質の局在変化を定量化した。

### (4) ウェスタンブロット解析

HBS 溶液中に集められた卵子および精子に SDS サンプルバッファーを加え、沸騰処理し、遠心処理により DNA 成分を沈殿させた後、上清をサンプルとして用いた。SDS-PAGE により展開した後、PVDF 膜に転写し、1 次抗体と室温 2 時間の反応を行った後、Horseradish Peroxidase (HRP) 結合 2 次抗体と反応させ、洗浄の後、ECL 検出キット (GE ヘルスケア) により、抗体特異的に結合するタンパク質を検出した。

約 1,000 個のマウス卵子および 2 匹分の精巣上体精子を集めた後、タンパク質複合体形成の有無について、免疫沈降法を用いて解析を行った。

(5) 卵特異的  $\beta$ -catenin、E-cadherin、 $\alpha$ -catenin 欠損マウスの作製

それぞれの遺伝子の両端にバクテリオファージ由来の LoxP 配列が挿入されたマウスを米国ジャクソン研より購入した。ジャクソン研の BB Knowles 教授より、卵特異的に Cre-recombinase を発現するトランスジェニックマウスを提供して頂き、交配によって卵特異的にそれぞれの遺伝子が欠損したマウスを 3 系統作製した。

### (6) 統計処理

卵子の細胞膜に接着した精子数、融合精子数、2 細胞期胚に発生が進んだ胚の数を測定した後、結果を *t* 検定により解析することにより、有為差について検定を行った。

### (7) 倫理面への配慮

(独) 国立成育医療研究センター動物実験委員会、遺伝子組換え委員会に実験計画を申請・承認の後 (承認番号 04-004 および 5-9) の実験指針に基づいて適切な管理基準の下で実験を行った。

## C. 研究結果

### (1) CD9 とは?

CD9 (Cluster of Differentiation 9) は膜 4 回貫通型タンパク質で、4 つの細胞膜貫通領域、大きさの異なる 2 つの細胞外領域、比較的短い 2 つの細胞内領域をもっている。膜貫通型タンパク質の中には、CD9 のように膜 4 回貫通型タンパク質が知られている。その中には、クローディン (Claudin)、オクルディン (Occludin) のような細胞間の接着構造を形成することが知られているタンパク質や、コネクシン (Connexin) のようにギャップジャンクションを形成するタンパク質が知られているが、いずれもファミリーを形成して複数の相同性のあるタンパク質が知られている。しかし、多細胞生物が膜 4 回貫通型タンパク

質ファミリーを複数もっている理由は不明である。CD9 と同様の構造をもった膜タンパク質はテトラスパニンと呼ばれるタンパク質ファミリーを形成しており、哺乳動物、ショウジョウバエ、線虫では約 30 種類のファミリー分子が知られ、植物ではそれらを上回る約 60 種類の分子が同定されている。それぞれの遺伝子は特定の染色体領域ではなく、複数の染色体に別々に存在し、進化的にどの遺伝子がプロトタイプであるかは不明である。

CD9 は血小板の細胞膜に対する抗体の抗原として発見され、また、B 細胞の分化初期において特異的に細胞膜に存在する膜タンパク質としても報告された。その後の解析から、樹状細胞、T 細胞といった免疫系細胞でも CD9 が発現していることが明らかとなった。さらに、癌細胞の運動能を抑制する抗体の抗原として単離された MRP-1 は CD9 と同一のタンパク質である。加えて、CD9 はヒトやマウスの胚性幹細胞 (ES 細胞) や間葉系幹細胞といった多分化能をもった未分化な細胞の細胞膜に豊富に存在するタンパク質で、未分化細胞を選別するための細胞表面マーカーの 1 つとしても知られる。抗 CD9 抗体は免疫系細胞のフローサイトメトリー用に数多くの種類が販売されており、容易に入手できる。抗 CD9 抗体が認識するエピトープはいずれも第 2 ループ内に存在し、抗 CD9 抗体はループ構造が作る立体構造を認識することが報告されている。還元条件下では、エピトープとなる立体構造が壊され、抗体による検出が難しくなることから、ウエスタンブロット法による CD9 タンパク質の検出には非還元条件で調整されたサンプルを用いる。数は少ないものの、還元条件下でも CD9 を認識する抗体も販売されている。また、抗体認識部位と考えられている第 2 ループの塩基配列の保存性は低く、言い換えると種特異的で、複数の動物種の CD9 を共通に認識する抗

体は知られていない。一方、膜貫通領域や細胞内領域の保存性は高く、ヒトとカエル間でもアミノ酸配列は保存されている。CD9 の機能領域の解析は、生物種によって配列の特異性がある第 2 ループについて主に行われており、今までの報告から、第 2 ループの構造が隣接する因子との相互作用に機能していると考えられている。

CD9 を含むテトラスパニンの生理的機能は細胞接着因子であるインテグリンとの関連から調べられており、インテグリンの補助因子として報告されている。しかし、インテグリンファミリーに属する遺伝子を発生工学的手法を用いて破壊した場合の表現型は、胚性致死にいたるものが多く、それに対してテトラスパニンの場合では、異常は認められるものの、胚性致死のような重篤な表現型を示す系統は知られていない。このことから、生体内においてテトラスパニンと複合体を形成する因子はインテグリン以外に存在すると考えられる。また、テトラスパニンの中では、CD9 と最もアミノ酸配列の相同性が高い CD81 は CD19 と複合体を形成することが報告されており、CD81 を欠損したマウスでは CD19 を欠損したマウスと同様に免疫系に異常をきたし、抗体産生が異常となることが報告されている。培養系を用いた解析から、CD81 は CD19 が細胞膜に局在するために必須であり、CD19 は CD81 を介して他の因子と複合体を形成しており、遺伝子欠損マウスの表現型とも一致している。さらに、マウスと同様に抗体産生能が低下した病態をもつ被験者で CD81 遺伝子に変異が起こり、CD81 の発現が消失していることが報告されている。テトラスパニンの機能がヒトでもマウスでも共通して証明された例は CD81 が初めてである。一方、CD9 が欠損したことによるヒトの不妊症は現在のところ報告されていない。

(2) CD9 欠損雌マウスは不妊で、CD9 欠損卵子は受精の膜融合に異常を示す

常法に従って作製された CD9 欠損マウスは、野生型と同じように正常に発育し、外見的、組織学的な解析からも特別な異常は見つけれず、雄の生殖能力は正常であったものの、CD9 欠損雌マウスは重篤な不妊症状を発症することがわかった。CD9 欠損雌マウスの卵成熟過程に特別な異常は認められなかったことから、受精から着床前期の間で異常が起こることが予想され、まず最初に、受精過程について体外培養系を用いて調べた。その結果、CD9 欠損卵子は精子と受精することができず、多数の精子が透明帯と卵細胞膜の間のスペースに溜まった状態になることが観察された(図 1)。さらに、透明帯を人為的に除去した CD9 欠損卵子に精子を加えると、精子は卵細胞膜に結合するが、融合はきわめて稀にしか起こらないことがわかった。すなわち、CD9 欠損卵子では、精子との細胞融合の手前で受精のステップが進まなくなってしまうため、通常は精子が融合した後に起こる卵子の変化(表層反応)が起こらず、多くの精子が透明帯の内側に入った状態になってしまった。さらに、CD9 欠損卵子では精子との融合後の発生過程にも異常があるかどうかを調べるために、野生型精子を CD9 欠損卵子の細胞質へ直接マイクロインジェクション(ICSI)したところ、野生型卵子と同等の頻度で産仔が得られたことから、CD9 欠損卵子では発生過程は正常であることがわかった。

(3) CD9 の細胞融合における機能の手がかり

遺伝子欠損マウスの研究からは、研究を新しい方向に大きく転換させる結果が得られる場合がある。CD9 の受精における役割も、遺伝子欠損マウスの解析を通じて初めて明らかになったものである。しかし、多くの場合には遺伝子欠損

マウスの異常を見つけられないか、異常が認められたとしても、培養系による解析が困難で、それ以上の解析が進まない例がある。それだけ、生体内での解析は生体外とは異なる多くの因子の影響を考慮しなければならない。CD9 の場合は、受精における精子と卵子の膜融合に必須であることが明らかにはなったものの、既知の機能ドメインを持たない CD9 の機能解析はなかなか進まなかった。しかし、最近の研究から新しい展開への手がかりを得ることができた。

まず、CD9 の挙動を生きた卵子で観察するために、CD9 とクラゲ由来の蛍光タンパク質として知られる GFP との融合タンパク質を卵子に発現させた。GFP に CD9 が融合したタンパク質(CD9-EGFP)を卵子だけで発現させるベクターを構築し、CD9 欠損雌マウスに導入したところ、CD9 欠損マウスの受精障害を野生型マウスと同等のレベルまで回復させ、CD9 欠損雌マウスから健康な仔を得ることができた。次に、排卵した卵子を観察したところ、従来の顕微鏡観察では認められなかったようなパターンで CD9 が存在することが生きた卵子での観察から明らかとなった。従来の観察では、CD9 は卵子の細胞膜に存在すると考えられていたが、生きた卵子では細胞膜に限定されず、細胞膜と透明帯と呼ばれる卵子を取り囲む細胞外マトリックスの隙間(囲卵腔、perivitelline space)に約半分の量の CD9 が存在することが明らかになった。さらに、囲卵腔に存在する CD9 を透明帯を取り除いた卵子の培養液から回収し、透明帯を除去した CD9 欠損卵子と混合した後に精子と体外受精を行ったところ、CD9 欠損卵子の受精障害を完全に回復させることができた。さらに、透明帯を除去した野生型卵子と CD9 欠損卵子を共培養し、そこに精子を加えることによっても野生型卵子のエキソソームによって融合能を獲得した精子が CD9 欠損卵子に融合することができた(図 1)。



以上のことは、卵子から围卵腔に分泌された CD9、または CD9 を含む構造体が精子と卵子の融合に機能していることを示す有力な証拠である。さらに、透過型電子顕微鏡による観察から、CD9 単独ではなく、CD9 を含む構造体が围卵腔に存在することがわかった。その直径は 50~250nm であり、細胞膜のように明瞭な 2 重脂質層をもっていなかった (図 1)。CD9 を含む膜構造体が細胞外に存在するという報告は、免疫系の B 細胞や樹状細胞ですでに報告されており、エキソソーム (exosome) と呼ばれ、細胞間での物質のやり取りに関わっていると考えられている。そこで、卵子での CD9 を含む膜構造体もこのエキソソームの仲間ではないかと推測された。また、従来の研究では、CD9 は卵子の細胞膜上に存在する微絨毛 (microvilli) の構成成分で、CD9 欠損卵子では微絨毛の形態が異常であることから、CD9 は微絨毛の形成および機能に関わっていると予想され、微絨毛に機能障害がある CD9 欠損卵子は精子との融合はできないと考えられてきた。しかし、エキソソームとの共培養によって CD9 欠損卵子と精子との融合が可能になったことは、微絨毛は必須ではなく、エキソソームが必要であることを示している。また、今までの研究から、微絨毛は排卵直後の卵子からエキソソームが放出される過程で形成される副産物ではないかと予想される。

#### (4) エキソソームの生理機能と細胞融合における役割

CD9 などのテトラスパニンを含む膜構造体は、前述のようにエキソソームと呼ばれ、その存在は 1970 年代から議論されてきた [19]。癌細胞を培養したときに培養液中に存在する微細な構造物は、細胞から放出される機能を有した膜構造体といった報告がある一方で、細胞膜の破片であるといった考えもあり、機能性の構造体としての地位が確立されたの

は、ここ 7 年のことである。エキソソームと命名された構造体は細胞核にも存在するが、ここで言うエキソソームとは全くの別物である。免疫系の樹状細胞でエキソソームの機能解析が進んでおり、エキソソームの構成成分として CD9 などのテトラスパニン、糖脂質 (ガングリオシド) GM3、熱ショックタンパク質ファミリー HSP70 および HSP90、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の構成員である class I 抗原が含まれていることが知られている。また、エキソソームの形成経路として、細胞膜の一部がエンドサイトーシスによって内在化し、エンドソームとの融合によって形成された多胞性エンドソーム (multivesicular body) の一部がエキソソームとして、エンドサイトーシスによって細胞外に放出されることが知られている。放出されたエキソソームは標的細胞の細胞膜と融合することにより、エキソソーム内にある物質 (タンパク質や mRNA など) を標的細胞に導入するという報告がある。

一方、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) が感染した細胞から次の細胞に伝播するときには、細胞がもっているエキソソームの形成経路を HIV-1 が乗っ取り、より効率よく周辺の細胞に HIV が感染することが示されている。このことは、エキソソームを介した細胞融合のメカニズムがウイルスと受精で共通していることを示唆している。エキソソームは何らかの因子を細胞から細胞へ輸送するための必要であると考えられているが、膜融合に関してはその実体は不明である。膜融合には何らかのエネルギーが必要であるとも考えられることから、ATP などの高エネルギーを産生するための酵素類を運ぶ可能性も考えられる。

#### (5) CD9 結合タンパク質の同定

CD9 変異体の解析から、CD9 の C 末端 7 アミノ酸に機能領域があることを明らかにした。更に、酵母 two-hybrid 系

から CD9 結合タンパク質として tubulin  $\beta$  2A を同定した。このことから、CD9 の膜融合における機能がチューブリンを主成分とする微小管によって調節されている可能性が出てきた。今後は、加齢による生殖能の低下について受精効率の観点から解析を行う。特に CD9 および tubulin  $\beta$  2A の機能に注目して研究を行う。本研究では、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す。

受精における膜融合の研究は、プロテアーゼの研究からはじまり、接着因子などの膜タンパク質の研究へと移行し、CD9、Izumo が融合に必須であることが明らかになった後は、大きな進展がなかった。しかし、最近になって受精とウイルスの細胞への感染機構が類似した分子機構を使っている可能性が出てきた。その分子機構の中核となるのはエキソソームと呼ばれるナノサイズの膜構造体である。今後は有機化学に関わる分野との共同研究を推進することが重要となってくるであろう。ヒトの不妊症との関連はまだ謎であり、更なる研究が必要である。

#### (6) 卵子、精子における E-cadherin、 $\beta$ -catenin の局在解析

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。 $\beta$ -catenin、E-cadherin の局在は、共に卵子の細胞膜および細胞膜直下に認められ、細胞骨格の一つであるアクチンの突起上の局在と一致した (図 2)。しかし、 $\beta$ -catenin とアクチンの結合を介在すると考えられている  $\alpha$ -catenin の局在は卵子の細胞質の中心部分に収束しており、E-cadherin、 $\beta$ -catenin とは明らかに異なっていた。更に、E-cadherin および  $\beta$ -catenin は精子細胞膜にも存在することが、ウェスタンブロット解析によっても確認された (図 3)。また、精子および卵子におけ

る  $\beta$ -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 (図 4)。

#### (7) $\beta$ -catenin 欠損卵子の受精能に関する検討

$\beta$ -catenin<sup>LoxP/LoxP</sup> 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  $\beta$ -catenin を欠損させたマウス ( $\beta$ -catenin<sup>LoxP/LoxP</sup> ZP3-cre) を作製した。 $\beta$ -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ることがわかった。そこで、E-cadherin の卵子における局在を解析したところ、 $\beta$ -catenin の消失にともない、E-cadherin のシグナルが細胞質内に観察され、細胞膜に局在できなくなることがわかった。

次に、体外授精によって  $\beta$ -catenin 欠損卵の受精能力を調べたところ、卵丘細胞や透明帯が存在する場合は、精子との融合効率、2 細胞期胚への移行効率の低下は観察できなかった。しかし、卵丘細胞および透明帯を除去した卵子では、精子との接着した精子数が少なく、その結果として精子の融合する頻度も有為に低いことがわかった (図 4)。以上の結果は、 $\beta$ -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。

#### (8) 細胞接着前後での $\beta$ -catenin の局在変化に関する検討

体外授精によって受精能を調べる過程で、卵子および精子の細胞膜における  $\beta$ -catenin の局在についても観察を行った。その結果、最初は精子と卵子の細胞膜直下に局在していた  $\beta$ -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細胞膜から離れ、更に、蛍光シグナルが明らかに低下することが観察された (図 5)。以上の結果は、細胞接着に依存した何らかのシ

グナルによって、 $\beta$ -catenin の細胞膜の裏打ちからの遊離と、それに続くタンパク質分解が起こっている可能性を示している。

(9) タンパク質分解阻害剤を用いた  $\beta$ -catenin の分解の阻害と、膜融合への異常効率についての検討

体外授精に用いる前に、卵子をユビキチンを介したタンパク質分解系の特異的阻害剤であるユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤 (UBE1-41) (BIOGENOVA) (10  $\mu$ M) で 1 時間処理することにより、精子と卵子の細胞接着および細胞融合の効率を調べた (図 6)。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、 $\beta$ -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。以上のことから、 $\beta$ -catenin は精子と卵子の細胞接着に重要な役割を果たすと同時に、細胞接着後の速やかな細胞膜からの遊離および分解が、膜融合への移行に関与していることを示唆している。

#### D. 考察

$\beta$ -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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -catenin の速やかな細胞膜からの消失が起こることが判明し、 $\beta$ -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、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。この結果から、卵子の受精能力についての新しい指標を示すことができた。今後は、卵子が有するタンパク質分解のメカニズムを明らかにすることにより、受精のメカニズムについて、更に解析を進めると共に、得られた結果を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努めたい。

#### E. 結論

本研究から、精子と卵子の細胞接着には  $\beta$ -catenin/E-cadherin 複合体が関与しており、その後の膜融合への移行には  $\beta$ -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が明らかになった。

#### F. 研究発表

1. Zhang J, Dong J, Gu H, Yu S, Zhang X, Gou Y, Xu W, Burd A, Huang L, Miyado K, Huang Y, Chan HC. CD9 is critical for cutaneous wound healing through JNK signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(1): 226-36 (2012).
2. Ito M, Imai M, Muraki M, Miyado K, Qin J, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Hosoi Y, Saito H, Takahashi Y. GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-MK2 signaling pathway in human granulosa cells: possible association with mitochondrial activity. *Aging*, 3(12):1213-23 (2012).
3. 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 cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports*, 1: Article 68 (2011) (Miyado K is a corresponding author) .
4. Sato B, Katagiri Y, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*, 11: 22 (2011).
  5. Kawano N, Yoshida K, Miyado K, Yoshida M. Lipid Rafts: Keys to Sperm Maturation, Fertilization, and Early Embryogenesis. *Journal of Lipids*, in press. (査読あり)
  6. Kawano N., Harada Y., Yoshida K., Miyado M., Miyado K. Role of CD9 in sperm-egg fusion and its general role in fusion phenomena, Cell Fusions: Regulation and Control. Larsson, Lars-Inge (ed). *Springer.*, 171-184, 2010. (査読なし)
  7. Ito M, Miyado K, Nakagawa K, Muraki M, Imai M, Yamakawa N, Qin J, Hosoi Y, Saito H, Takahashi Y. Age-associated changes in the subcellular localization of phosphorylated p38 MAPK in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod.*, 16(12): 928-37 (2010) (査読あり)
  8. Kawano N., Kang W., Yamashita M., Koga Y., Yamazaki T., Hata T., Miyado K., Baba T. Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the Mutant Sperm are infertile in vitro. *Biol Reprod.*, 83(3):359-69 (2010) (査読あり)
  9. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells were immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circulation Res*, 106(10):1613-23 (2010) (査読あり)
  10. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res.*, 340(3):583-94 (2010) (査読あり)
  11. Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. *Artif Organs*, 34(4):280-8 (2010) (査読あり)
  12. Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*, 78(2-3): 137-42 (2009) (査読あり)
  13. Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Takamori K, Ogawa H, Araki Y, Miyado K, Toyama Y, Toshimori K. Equatorin: Identification and Characterization of the Epitope of

the MN9 Antibody in the Mouse. *Biol Reprod*, 81(5) 889-97 (2009) (査読あり)

14. Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*, 221(2):335-42 (2009) (査読あり)

G. 知的財産権  
特になし

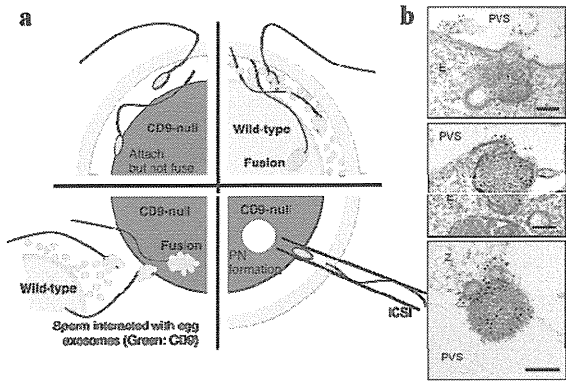


図 1. CD9 を含むエクソソームの放出と精子の融合活性の調節のモデル図  
 (a) CD9 欠損卵子とエクソソームの膜融合への関与の模式図  
 (b) 卵子から放出されるエクソソームの免疫電子顕微鏡像

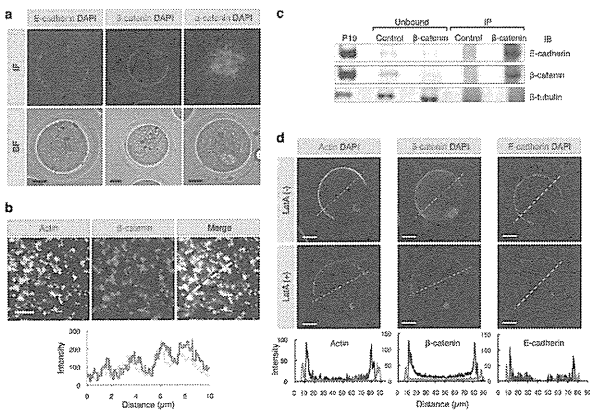


図 2. 卵細胞膜における E-cadherin、 $\beta$ -catenin、アクチン繊維の共局在  
 (a) E-cadherin (赤),  $\beta$ -catenin (赤),  $\alpha$ -catenin (緑) の免疫染色  
 (b)  $\beta$ -catenin とアクチンの共局在  
 (c) E-cadherin/ $\beta$ -catenin 複合体形成の免疫沈降による解析  
 (d) アクチン重合阻害剤による E-cadherin、 $\beta$ -catenin の局在変化

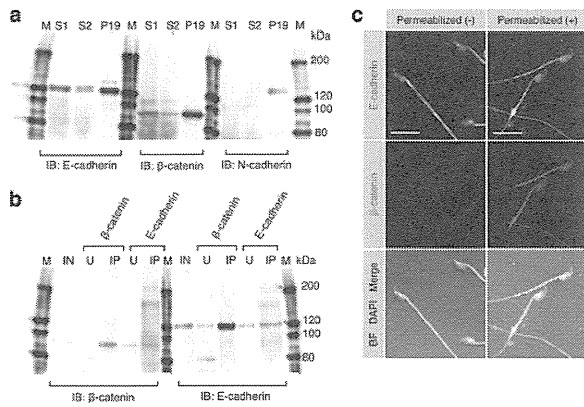


図 3. 精子における E-cadherin/ $\beta$ -catenin 複合体形成の生化学的解析

(a) ウェスタンブロット解析による E-cadherin,  $\beta$ -catenin, N-cadherin の発現解析

(b) 免疫沈降による E-cadherin/ $\beta$ -catenin 複合体形成の解析

(c) 免疫染色による E-cadherin,  $\beta$ -catenin の局在解析

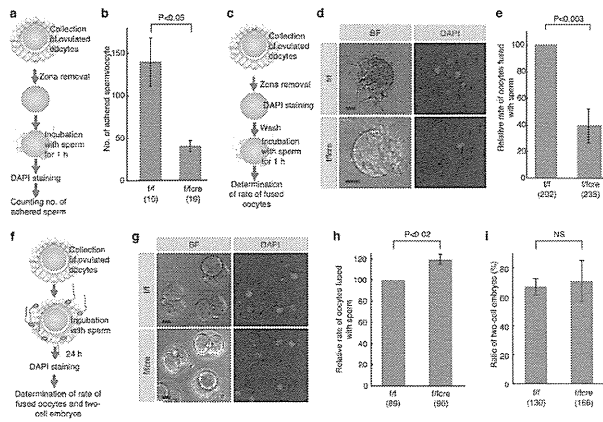


図 4.  $\beta$ -catenin 欠損卵子の受精能の検討

(a) 透明帯除去卵子での接着アッセイの流れ

(b) 卵細胞膜に接着した精子数の測定

(c) 透明帯除去卵子での融合アッセイの流れ

(d) 融合精子の顕微鏡画像

(e) 融合精子数の測定

(f) 2細胞期胚の形成アッセイの流れ

(g) 2細胞期胚の顕微鏡画像 (h. i) 測定

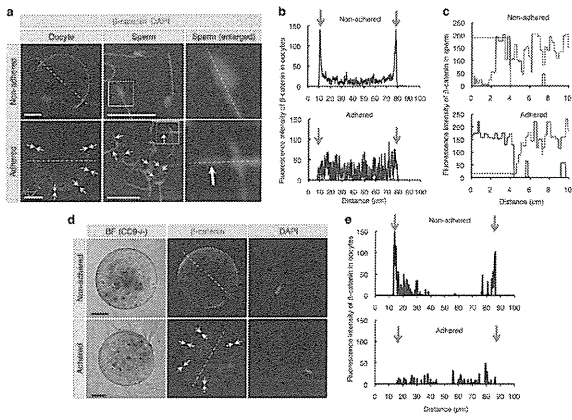


図 5. 精子と卵子の接着直後に起こる  $\beta$ -catenin の細胞膜からの消失  
 (a) 野生型卵子での  $\beta$ -catenin の局在変化  
 (b) デンシトメロリーによる卵子の画像解析  
 (c) デンシトメロリーによる精子の画像解析  
 (d) CD9 欠損卵子での  $\beta$ -catenin の局在解析  
 (e) デンシトメロリーによる CD9 欠損卵子の画像解析

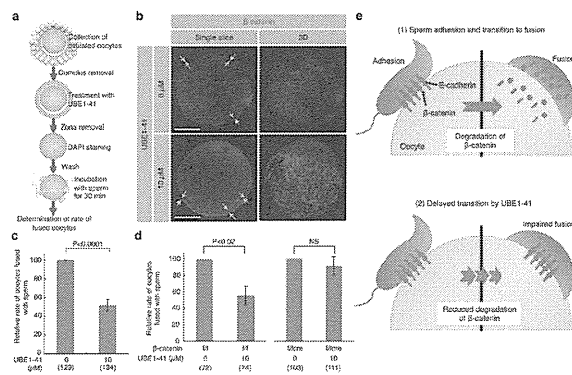


図 6. ユビキチン化阻害剤 UBE1-41 処理の受精能に対する効果  
 (a) 阻害剤処理アッセイの流れ  
 (b) 顕微鏡画像  
 (c) 野生型卵子での検討  
 (d)  $\beta$ -catenin 欠損卵子での比較検討  
 (e) モデル図



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）  
総合分担研究報告書

高血圧症と妊孕性  
～受精機構におけるACE2の機能解析～

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

研究要旨

ACE2 は心臓及び腎臓に強く発現し、血圧調整機構のレニン- アンジオテンシン系 (RAS)において、ACE と共に血圧調整に深く関与することが広く知られている。ACE は精巣および精子で発現し、ACE ノックアウトマウスでは、精子-卵透明帯結合能不全と精子の輸卵管への到達障害による雄性不妊が知られている。そのため、ACE2 は ACE と同様、受精過程に重要な機能があると考え、受精過程における ACE2 の機能解析を行った。

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では、精子の卵透明帯結合能および精子-卵透明帯通過能が亢進していた。さらに、ACE2 の機能を阻害すると、精子前培養培地中におけるアンジオテンシン II の濃度は有意に上昇し、アンジオテンシン 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、脾、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。

A. 研究目的

近年、女性の晩婚に伴う妊娠希望時の年齢の上昇や、生活習慣病患者数の増加による降圧剤の服用と妊孕性減弱の関連が指摘されている。血圧調整機構のレニン- アンジオテンシン系 (RAS) では、ACE と ACE2 が拮抗的に働き、それらから切り出されたアンジオテンシン (1-7) およびアンジオテンシン 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 (FEBS Letters, 2002、Peptides, 2005)、マウスおよびラットにおいて、ACE2 タンパク質は心臓、腎臓、脳で強く発現している (Peptides, 2005)。さらに、ラット精巣では、ライディッヒ細胞に発現していることが報告されている (Endocrinology, 2004)。

ACE は、精巣および精子で発現し、さらに ACE ノックアウト (KO) 雄マウスは、不妊である (Nature, 1995)。その原因は、精子の輸卵管への到達障害と卵子透明帯への結合障害が報告されている (Proc Natl Acad Sci USA, 1998)。さらに近年、ACE が細胞表面から TESP5 お

よびPH-20などのグルコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型蛋白質を遊離するGPIアーゼ活性を有している事が見出され、ACE KO マウス精子では、受精に関与する精子膜上のGPIアンカー型蛋白質が全く遊離されない為、精子-卵透明帯結合能不全による雄性不妊になることが示された (Nature medicine, 2005)。

近年RASは、心臓、脳、脾、血管壁、子宮-胎盤などの多くの組織でも存在が明らかになってきている。しかし、受精におけるACEとACE2およびRASの関与については、明らかになっていない。本研究では、ACE2にACEと同様、受精に重要な機能があると考え、受精機構におけるRASの関与を明らかにする事を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 動物

ACE2 トランスジェニック (hACE2Tg) マウスは、ラット CC10 プロモーター制御下にヒト ACE2 を発現する導入遺伝子を構築し、定法に従い作製した。実験には C57BL/6 マウスへ6世代以上戻し交配したものを使用した。ACE2 および CD9 ノックアウトマウスは、それぞれ秋田大学久場敬司博士および成育医療研究センター宮戸健二博士より分与をうけた。ACE ノックアウトマウスは、ジャクソン研究所より購入した。コントロール系統には C57BL/6NCr (日本 SLC) を使用した。

すべて SPF 動物として飼育され、照明時間は明 12 時間 (8:00~20:00)、暗 12 時間 (20:00~8:00)、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 40~60% という飼育環境であった。水および標準飼料 (CE-2、日本クレア) は自由に摂取させ、Specific Pathogen Free 環境下で飼育した。

### 2. 生化学的解析

#### 1) タンパク質発現解析

タンパク質発現は、ウエスタンブロッ

ト法にて解析した。精子先体膜は、成熟雄マウスから精子を採取し、精子を 90 分間 HTF 培地中で前培養した。Ca イオンフォア処理後、ホモジナイズし、 $8000 \times g$ , 10 分間で遠心後、上清を  $100,000 \times g$ , 90 分間遠心した。沈殿物を RIPA バッファーに溶解し、一次抗体 anti-hACE2 (R&D systems)、anti-ACE (Santa Cruz Biotechnology)、anti-ADAM2 (MILLIPORE) で処理し、ECL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, PIERCE) で発色させた。

#### 2) アンジオテンシン II 濃度測定

成熟雄マウスから精子を採取し、精子を 4 時間 HTF 培地中で前培養した。精子培養液を  $150,000 \times \text{rpm}$ , 15 分間遠心し、上清を凍結乾燥し、EIA kit Buffer で融解し、これを Angiotensin II EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc) を用いてアンジオテンシン II 濃度を測定した。

### 3. 表現型解析

#### 1) 精子形態観察

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

#### 2) 先体反応の評価

ACE2 ノックアウト雄マウスの精巣上体尾部より精子を採取し、HTF (BSA-) 培地中で前培養した。各濃度のアンジオテンシン II を添加し、PBS で洗浄後、4% パラフォルムアルデヒドで固定した。CBB で染色後、スライドガラスへ塗抹し、倒立顕微鏡下で先体の有無を観察した。

#### 3) 体外受精

雄マウスの精巣上体尾部より精子を

採取し、HTF 培地中で2時間前培養した。C57BL/6Cr 雌マウスに、過排卵を誘起し卵管膨大部より未受精卵を採取後、HTF 培地中に導入した。前培養した精子を、200 sperm/ $\mu$ l になるように添加し、37°Cで24時間培養後、2細胞期胚をカウントすることにより受精率を算定した。

#### 4) 精子-卵透明帯結合能の評価

精子および未受精卵は体外受精と同様に採取した。未受精卵を1mg/ml ヒアルロニダーゼ(Sigma)を含むHTF 培地中に導入し、卵丘細胞を除去した。ACE2 阻害剤処理区では精子前培養培地ならびにHTF 培地に1.0  $\mu$ M となるよう ACE2 阻害剤(DX600)を添加した。前培養精子を100精子/ $\mu$ l となるよう卵丘細胞除去未受精卵に添加し、1.5時間培養した。さらに、ガラスキャピラリーで卵子を洗浄し、2%ホルマリンで固定した。精子-卵透明帯結合数は、卵子の透明帯に結合している精子数をカウントして算出した。

#### 5) 精子-卵細胞質融合能の評価

精子-卵透明帯結合能と同様に卵丘細胞を除き、卵丘細胞除去未受精卵を酸性タイロイド液中に移し卵子透明帯を除去した。その後、前培養精子を50精子/ $\mu$ l となるよう透明帯除去未受精卵に添加し、7時間培養した。培養後、ガラスキャピラリーを用い卵子を洗浄し、2%ホルマリンで固定した。精子-卵細胞融合数は、卵子中に雌雄の核の有無を観察して算出した。

#### 6) 精子透明帯通過能の評価

CD9 ノックアウト雌マウスに過排卵処理を施し、卵管膨大部より未受精卵を採取した。上記と同様に前培養した精子を、150 sperm/ $\mu$ l になるように添加し、37°Cで5時間培養後、ガラスキャピラリーで卵子を洗浄し、2%ホルマリンで固定後、ヘキスト染色により困卵腔内精子

数をカウントした。

#### (倫理面への配慮)

動物実験を行なう際には、動物実験計画書を国立国際医療研究センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療研究センターにおける動物実験に関わる指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を講じた。

### C. 研究結果

#### 1. hACE2 トランスジェニックマウスにおける受精能評価

hACE2トランスジェニック(Tg)マウスの精子先体膜では、ACE2が強く発現していた。精子の受精能を評価するために体外受精を行ったところ、C57BL/6Nマウスでは93.6 $\pm$ 3.2%であったのに対し、Tgマウスでは、59.2 $\pm$ 9.3%と有意に体外受精率が低下していた。さらに精子-卵透明帯結合能を検討したところ、C57BL/6Nマウスでは6.4 $\pm$ 4.5であったのに対し、Tgマウスでは0.3 $\pm$ 0.5と、有意に精子-卵透明帯結合能が低下していた。しかし、精子-卵細胞質融合能は、野生型と比べ差はみられなかった。精子-卵細胞質融合能に差が見られなかったことから、Tgマウスの体外受精率低下は、精子-卵透明帯結合の低下が原因であると考えられた。

次に、Tgマウスの体外受精率および精子-卵透明帯結合能の低下が、ACE2 特異的なものである事を確認する為に、ACE2の特異的阻害剤であるDX600を用い同様の解析を行った。Tgマウスの未添加群では68.4 $\pm$ 10.6%と低受精率を示したが、DX600添加群では89.1 $\pm$ 6.8%とコントロール系統と同等まで受精率が回復した。さらに精子-卵透明帯結合能についても、未添加区で0.7 $\pm$ 0.8で

あったが、DX600 添加群では  $13.0 \pm 7.8$  と卵透明帯結合精子数が著しく上昇し、コントロールと同等まで回復した。以上の結果から、Tg マウスの体外受精率および精子-卵透明帯結合能の低下は、ACE2 阻害剤処理により正常とほぼ同等まで回復させることができ、ACE2 特異的であることが示された。

さらに、低受精率である C57BL/6N 系統凍結精子の体外受精において、その受精率が無添加群では 38.0% に対して、DX600 添加群では 52.1% と著しく改善した。

## 2. ACE2 ノックアウトマウス精子の受精能評価

ACE2 トランスジェニックマウス精子は著しい卵透明帯結合能低下を示し、正常マウス精子に ACE2 阻害剤を添加すると、卵透明帯結合能が亢進することから、ACE2 の機能阻害が受精を促進する可能性が示された。そこで、ACE2 ノックアウトマウス精子を用いて、先体反応における機能を解析した。精子を HTF 培地中で培養すると、時間と共に CBB で染色される先体膜が脱落した精子（先体反応）が増加する。培養後、120 分および 240 分では、コントロール C57BL/6N マウス精子で  $24.8 \pm 1.8\%$  および  $40.8 \pm 7.4\%$  の精子の先体が脱落していたのに対し、ACE2 ノックアウトマウス精子ではそれぞれ  $49.9 \pm 2.3\%$  および  $63.9 \pm 6.3\%$  であった。さらにこの精子先体反応の亢進は ACE2 阻害剤 (DX600) を添加することで、ACE2 ノックアウトマウス精子とほぼ同じレベルにまで、先体反応を亢進した。

次に精子の卵透明帯結合能を検討した。C57BL/6N マウス精子の精子-卵透明帯結合数は  $6.1 \pm 3.4$  であったのに対し、ACE2 ノックアウトマウス精子では  $18.7 \pm 9.1$  と 3 倍以上であり、精子-卵透明帯結合能が著しく上昇していた。ACE2 ノックアウトマウスの産仔数、体外受精率および卵細胞質融合率は C57BL/6N マウ

スとほぼ同等であった。次に、ACE2 ノックアウトマウス精子の卵透明帯通過能を検討した。CD9 ノックアウトマウス卵子は、卵子細胞質の融合不全により精子が細胞質に融合できず、卵胞内に留まる事が知られている。そのため、透明帯を通過した精子は、卵胞内に留まるため、卵胞内の精子をカウントすることにより、精子の卵透明帯通過能を評価することができる。定法に従い、CD9 ノックアウトマウスの未受精卵に、C57BL/6N および ACE2 ノックアウトマウス精子を添加し、精子透明帯通過率ならびに卵胞内に存在する精子数をカウントした。その結果、精子が透明帯を通過している受精卵は C57BL/6N で  $72.4 \pm 21.2\%$ 、ACE2 ノックアウトマウスでは  $89.2 \pm 8.4\%$  と、ACE2 ノックアウトマウス精子の通過率が高い傾向にあった。さらに透明帯通過精子数は C57BL/6N で  $6.3 \pm 7.9$  個、ACE2 ノックアウトマウス精子で  $10.4 \pm 9.5$  個と卵胞内に存在する精子が有意 ( $P < 0.001$ ) に増加していた。ACE2 ノックアウトマウスは、C57BL/6N 精子と同様に、精子頭部の形態は正常であった。

## 3. 精子前培養培地におけるアンギオテンシン II の定量

ACE2 の基質であるアンギオテンシン II の濃度を定量化するため、ACE2 ノックアウトマウス精子ならびに C57BL/6 系統マウス精子の精子前培養培地の上清を Angiotensin II EIA kit で解析した。1000 万精子上清中のアンギオテンシン II 濃度は、ACE2 ノックアウトマウス精子上清で  $0.32 \pm 0.075 \text{ ng/ml}$ 、C57BL/6 系統マウス精子上清で  $0.10 \pm 0.041 \text{ ng/ml}$  と ACE2 ノックアウトマウス精子で有意 ( $P < 0.01$ ) に上昇していた。

## 4. アンギオテンシン II による先体反応促進効果

アンギオテンシン II は、精子頭部にある AT1 受容体を介して精子の cAMP 濃度