

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09275

研究課題名(和文) 老化因子p16を標的とした革新的な老化卵子の診断法と質の改善法の開発

研究課題名(英文) Developing innovative methods of diagnosing and improving the quality of aging oocytes by targeting the senescence factor p16.

研究代表者

佐藤 可野 (SATO, YORINIO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00511073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、p16に標的を絞ることで、定量性のある客観的な方法により安価で簡便にリアルタイムに卵子の老化を診断できる方法の開発を目的とした。本研究では(1)マウス卵巣におけるp16の局在を同定し、老化による発現変化について明らかにし、(2)p16の発現量と卵子の質の相関を解析するため、マウスの各卵胞構成細胞でのp16の発現とそれぞれの卵胞から採取した卵子に体外受精を行い、卵子の質を反映する受精率、胚発生率、妊娠率を調べた。さらに(3)ヒトの各卵胞の構成細胞および卵胞液のp16の発現量を測定し、得られた卵子の体外受精後の受精率、胚発生率、妊娠率などの臨床成績との関連を調べることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢不妊の原因である卵巣機能不全は残存卵胞数の減少と細胞老化による卵子の質の低下からなるが、高齢女性に対する有効な不妊治療法はない。さらに現在のところ、卵子の老化の程度を診断し、良好卵子を選別する方法はない。本研究は高齢不妊患者に対する新たな不妊治療の一環として、卵子の老化の程度を診断する基礎的研究である。本研究の結果により、これまで良好卵子を選別することが可能になれば、胚移植の回数を減らすことができる。これは、回数が減少することで患者の身体的・経済的負担を大幅に軽減することが可能になる。本研究成果は高齢不妊患者に対する新たな治療法の開発に向けた基礎的知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：In this study, by targeting p16, we aimed to develop an inexpensive, simple, and real-time method to diagnose oocyte aging in a quantitative and objective manner. In this study, we (1) identified the localization of p16 in mouse ovaries and clarified changes in its expression with aging, and (2) to analyze the correlation between p16 expression and oocyte quality, we examined p16 expression in each follicle component cell in mice and in vitro fertilization of oocytes collected from each follicle to determine fertilization rate, embryonic development rate, and pregnancy rate, which reflect oocyte quality. and pregnancy rates, which reflect the quality of the oocytes. Furthermore, (3) the expression of p16 in the constitutive cells and follicular fluid of each human follicle was measured, and the relationship with clinical outcomes such as fertilization rate, embryonic development rate, and pregnancy rate after IVF of the obtained oocytes could be examined.

研究分野：発生工学、生殖医学、動物繁殖学

キーワード：p16 卵子老化 卵子の質

1. 研究開始当初の背景

本邦の不妊原因の多くは高齢不妊であり、少子高齢化社会において「産みたいのに産めない」患者の急増は大きな社会問題となっている。高齢不妊患者は諸問題を抱えながら治療を続けた後に、多くは妊娠をあきらめることになる。また、卵子提供により妊娠する患者もいるが、倫理的問題や免疫不適合による妊娠合併症の増加、高額な治療費が必要となることから優れた治療法とは言い難い。

高齢不妊の原因である卵巣機能不全は残存卵胞数の減少と細胞老化による卵子の質の低下からなるが、高齢女性に対する有効な不妊治療法はない。我々は残存卵胞数の減少の問題を解決するため、卵胞活性化療法(IVA: in vitro activation)を開発してきた(Kawamura, Sato et al. PNAS 2013)。しかし、細胞老化による卵子の質の低下を改善する方法は未だ確立されておらず、また卵子の老化の程度を診断する方法もない。従って、卵子の老化診断とその質を改善する方法の開発により、高齢女性が自らの卵子で妊娠することが可能となると期待される。

2. 研究の目的

p16 はがん抑制遺伝子としても知られる細胞周期関連因子である。細胞が老化の過程で分裂を繰り返し、テロメア長が短縮して発がんストレスが生じた場合には、p16 が細胞周期を止めてアポトーシスを誘導し癌化を防ぐ自己防御機構としての役割を持つ。正常細胞が分裂寿命に達したり発がんストレスを生じた場合には、p16 の発現が上昇し細胞老化を起こす。p16 の発現は非老化細胞では極めて低いため、細胞老化マーカーとして注目されている。

一方、卵子自身は受精するまで細胞分裂を開始しないが、卵胞を構成する体細胞は盛んに増殖し、卵胞が発育する。卵子は卵胞体細胞から様々な物質を取り込み成熟していくが、老化した卵胞体細胞では増殖能や mRNA・タンパク合成能などが低下し、卵胞発育不全や卵子の質の低下がおこる。しかし、これまで p16 と卵子の老化に関する研究は皆無である。

既存の卵子の質を診断する方法として、受精卵の形態学的な評価法がある。しかし老化卵子では形態学的に良好と診断されても若年良好卵子に比べ妊娠率は遙かに劣るため、形態学的評価は有用ではない。また卵巣体細胞や培養液の包括的なトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析も試みられているが、解析費用が高額でかつ結果の取得まで時間がかかるため、臨床応用は難しい。本研究では、p16 に標的を絞ることで、定量性のある客観的な方法により、安価で簡便にリアルタイムに卵子の老化を診断できる方法を開発する。さらに、これまで老化卵子へのミトコンドリア移植や培養液への成長因子の添加、抗酸化剤などのサプリメントの摂取による卵子の質の改善が試みられてきたが、未だ確立された治療法は存在しない。そこで、本研究では、p16 の発現抑制により卵子の発育を支持する卵巣体細胞の細胞老化の進行を抑えることで、卵子の質の改善を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス卵巣における p16 局在と老化による発現変化

卵巣における p16 の局在を調べるため、50-55 週齢の高齢マウスと 3 週齢幼若マウスの卵巣から胞状卵胞を採取し、卵子、体細胞（卵丘細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞）を単離して、定量的 RT-PCR にて p16 の発現量を比較する。また免疫染色により、原始卵胞から排卵前卵胞に至るまで、各発育段階の卵胞における p16 の発現ならびに局在を決定する。さらにウェスタンブロッティング法を用いてタンパク質発現変化を明らかにする。

我々は予備試験において、老化により卵巣の p16 発現が上昇すること、卵子に p16 は発現していないことを確認している。

(2) マウス卵巣体細胞の p16 の発現量と卵子の質の相関解析

老化による p16 の発現量の増加が卵子の質に及ぼす影響について、各週齢のマウスを用いて卵巣体細胞の p16 の発現量を定量的 RT-PCR にて測定しつつ、卵子の質を反映する受精率、胚発生率、着床率、流産率、妊娠率を調べるため、成熟卵子を採取して体外受精を行う。高齢マウスでは卵胞発育不全によるエストロゲン分泌低下が子宮内膜形成不全をきたし、胚の着床以降に影響を及ぼす可能性があるため、着床率、流産率、妊娠率の評価は、体外受精で得られた胚を若年レシピエントマウスに移植して評価する。これら一連の解析により、卵子の質が低下する卵巣体細胞の p16 発現量の閾値を決定する。RNA レベルでの相関が認められなかった場合には、ELISA を用いて p16 を測定し、卵子の質との相関を調べる。

(3) ヒト卵胞 p16 発現量と卵子の質の相関解析、体外診断医薬品としての臨床応用

体外受精の治療における採卵の際に、個々の卵胞から得られる卵丘細胞、顆粒膜細胞の p16 の発現量を定量的 RT-PCR にて測定し、患者年齢との相関を調べる。さらに、それぞれの卵胞由来の成熟卵子の受精率、胚発生率、着床率、流産率、妊娠率を前方視的に解析し、卵子の質を評価する。着床率、流産率、妊娠率に関して、影響を及ぼす因子をもつ患者は解析から除外する。これらの解析結果からヒトにおける卵子の質が低下する p16 発現量の閾値を決定する。細胞の mRNA 定量で相関が認められなかった際には、卵胞液中のエクソソーム内の p16 を抽出し、ELISA 法を用いて定量して卵子の質との相関を調べる。

4. 研究成果

まず、(1)マウス卵巣における p16 局在と老化による発現変化では、卵巣における p16 の局在を調べるため、50-55 週齢の高齢マウスと 3 週齢幼若マウスの卵巣から胞状卵胞を採取し、卵子、体細胞（卵丘細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞）を単離して、定量的 RT-PCR にて p16 の発現量を比較した。さらに免疫染色により、原始卵胞から排卵前卵胞に至るまで、各発育段階の卵胞における p16 の発現ならびに局在を初めて明らかにした。さらに ELISA 法を用いて若年齢と高年齢の卵巣抽出物における p16 タンパク質発現変化を明らかにした。そして(2)マウス卵巣体細胞の p16 の発現量と卵子の質の相関解析では、老化による p16 の発現量の増加が卵子の質に及ぼす影響について、各週齢のマウスを用いて顆粒膜細胞の p16 の発現量を定量的 RT-PCR にて測定しつつ、卵子の質を反映する受精率、胚発生率、着床率、流産率、妊娠率を調べた。これら一連の解析により、卵子の質が低下する顆粒膜細胞の発現レベルを明らかにした。最後

に、(3)ヒト卵胞 p16 発現量と卵子の質の相関解析、体外診断医薬品としての臨床応用では、体外受精の治療における採卵の際に、個々の卵胞から得られる卵丘細胞、顆粒膜細胞の p16 の発現量を定量的 RT-PCR にて測定し、患者年齢との相関を調べた。さらに、それぞれの卵胞由来の成熟卵子の受精率、胚発生率、着床率、流産率、妊娠率を前方視的に解析し、卵子の質を評価するため、現在では妊娠率の結果を待っている。これまでの解析により、卵丘細胞の受精率と p16 の発現における相関性はないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究で得られた成果は、臨床データを解析したのち論文化する予定である。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河村 和弘 (KAWAMURA KAZUHIRO) (10344756)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関