

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16819

研究課題名(和文)NMNおよびNRを用いた、妊孕能のアンチエイジング

研究課題名(英文)Anti-aging of fertility using NMN and NR

研究代表者

岡本 直樹 (Okamoto, Naoki)

国際医療福祉大学・医学部・研究員

研究者番号：80714360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：NMNを長期投与した高齢マウスを用いて体外受精および胚移植試験を実施した結果、着床率および産仔獲得率に改善の傾向が得られた。しかしながら、統計学的な有意差は得られなかった。加えて、NMNを長期投与した高齢マウスの各臓器(肝臓、子宮、皮膚、卵巣)を用いた、組織学的解析と遺伝子発現解析(sirtuin family, p16)を実施したが、これらの解析で対照群と比較して特徴的な変化は確認できなかった。結果的に、当初より期待していた成果を得るには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、不妊患者の高齢化を背景として、エイジングによる妊孕性低下への対策は生殖医療において急務である。本研究では長寿遺伝子として有名なsirtuinの活性化因子であるNMNが、エイジングによる妊孕性低下に対し有効であるかを解析した。しかし、本研究で得られた結果からは、エイジングによる妊孕性低下に対するNMNの有効性は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：As a result of in vitro fertilization and embryo transfer study using long-term NMN-treatment aged mice, there was a tendency for improvement in implantation rate and offspring acquisition rate. However, no statistically significant difference was obtained. In addition, histological analysis and gene expression analysis (sirtuin family, p16) were performed using each organ (liver, uterus, skin, ovary) of aged mice to which NMN was administered for a long time. No characteristic changes could be confirmed compared to the group. As a result, the expected results were not achieved from the beginning.

研究分野：生殖医療

キーワード：エイジング 妊孕性 NMN

1. 研究開始当初の背景

近年、女性の晩婚化、初産年齢の高齢化に伴い高齢不妊患者が急増している。高齢不妊の主たる原因は卵子の質の低下である。その分子機構として DNA 修復分子の機能低下による DNA ダメージ、活性酸素種蓄積による酸化ストレス、ミトコンドリアの機能低下・異常、染色体異数性などの関与が考えられている。これまで、高齢不妊患者が自らの卵子での妊娠を可能とするため、DHEA の投与や卵子の質を改善する可能性のある抗酸化剤（メラトニン）の投与など様々な研究がなされてきたが、未だ有効性が確立された方法はなく、若年女性の提供卵子を用いた体外受精胚移植が行われてきている。提供卵子による治療は、倫理的問題に加え、完全非自己の妊娠による免疫学的な妊娠合併症の増加が報告されており、本邦での実施は学会の指針で禁じられている。

Nicotinamide mononucleotide (NMN) 及び Nicotinamide riboside (NR) は、糖や脂質の代謝を活性化し、老化による酸化ストレスや DNA ダメージから細胞を保護する Sirtuin や PARP などを活性化する NAD⁺ の中間代謝産物の抗老化物質である。NMN、NR の投与によりマウス生体内の NAD⁺ 量増加や Sirtuin の活性化が確認されている。さらに、代謝異常やミトコンドリア機能の改善などが複数の臓器で報告されている。一方これまでの臨床試験では、安全性と体内動態を調べるために健常男性に NR を投与し、血中 NAD⁺ 量が増加することが確認されているのみで、それ以外の人体への効果は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、抗老化物質である NMN および NR が高齢不妊患者の妊孕能の改善に効果があるかに迫る。

2. 研究の目的

本研究では、動物試験を用いて NMN、NR による老化卵子の質の改善と子宮への影響を明らかにし、高齢不妊患者への臨床応用を目指す。

本研究結果から、NMN、NR 摂取による妊孕能の改善が可能となれば、これまで提供卵子による体外受精胚移植以外に有効な治療法がなかった高齢不妊患者の治療成績向上に大きく寄与すると考えられる。また、少子化対策のみならず、医療費削減が期待できるなど社会的にも非常に意義が高いと考えられる。高齢女性の妊孕能改善を目標に、高齢マウスを用いて、NMN および NR による老化卵子の質の改善を明らかにし、安全性を検証しつつ分子基盤を解明する。また、NMN、NR の子宮への影響についても検証し、自然妊娠、人工授精治療下での NMN、NR の有用性を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

1) NMN での試験では、ICR マウスを使用した。このマウスの妊孕能が減少し始める 25 週齢から試験を開始し、妊孕能が喪失する 50 週齢前の 47 週齢で解析を実施した。NMN は経口摂取で抗老化作用を示すことが報告されているため、本試験では NMN 含有および非含有の飲み水を経口摂取させる。NMN の摂取期間は 22 週間、摂取量は抗老化作用を示した既報の濃度を参考に実施した予備検討を元に、100 mg/kg に設定した。22 週間の摂取期間を終了した 47 週齢の時点で性周期を観察。排卵の指標となる発情前期が観察できたマウスから順に体外受精・胚移植の試験を実施した。同じタイミングで各種組織サンプル（肝臓、子宮、皮膚、卵巢）を回収し、組織学解析

および分子学解析に使用した。

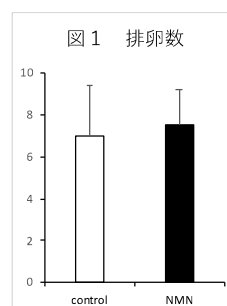
2) 体外受精は発情前期のタイミングで hCG を投与し、約 16 時間後に卵管を摘出し卵管膨大部より卵子卵丘細胞複合体を回収した。そこに 8-12 週齢の雄 ICR マウス精巣上体より採取した精子を用いて培養液内(TYH medium)にて媒精を実施した。約 6 時間後、受精が確認できた胚を別の培養液(KSOM)に移し 72 時間培養した。上記の過程で排卵数および受精率、胚盤胞到達率を記録した。

3) 胚移植は培養した胚を仮親の子宮に移植し、19 日後に帝王切開にて子宮を摘出。胎仔および着床痕跡を確認することで着床率および生仔獲得率を記録した。仮親は卵子のドナーとなるマウスの hCG 投与と同じタイミングで、精管結紮された雄マウスと交配させ、偽妊娠状態として用いた。

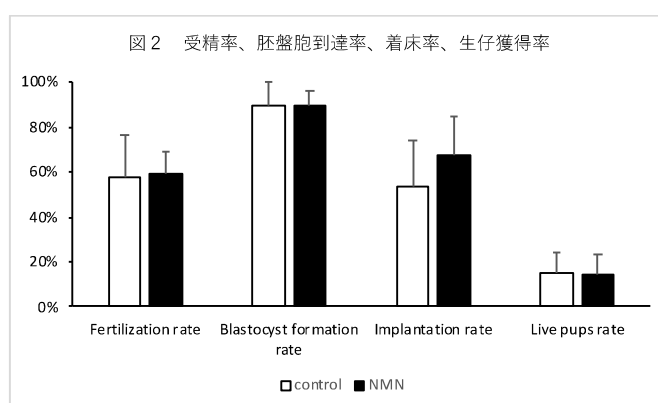
4) 組織学解析は各種組織サンプルを用いて組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。組織切片は光学顕微鏡下で観察した。分子学解析は卵巢組織より mRNA を抽出し、sirtuin および p16 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて定量した。

4. 研究成果

1) 本研究の結果としては、エイジングによるマウスの妊孕性低下に対し、NMN 継続投与の有効性は確認できず期待していた成果は得られなかった。妊孕性への影響については体外受精および胚移植にて得られた排卵数(図1) 受精率、胚盤胞到達率、着床率、生仔獲得率(図2)において、NMN 投与群と対照群でいずれも統計的有意な差はなかった。同様に組織学では肝臓および子宮、皮膚、卵巢において対照群と比較して特徴的な変化は観察されなかった。また、卵巢における sirtuin family 遺伝子および、p16 遺伝子の発現も、NMN 投与群と対照群でいずれも統計的有意な差はなかった。



本研究ではエイジングによるマウス妊孕性低下に対する NMN 摂取は有効な効果が確認できなかったが、遺伝子発現の変化も見られなかったことから、NMN が効果的に摂取されているか疑問が残る。本研究で用いた実験デザインは既にその他のサプリメントを用いた検討で実践済みであり、それなりに有用な結果が得られている手法である。異なるのは投与方法に飲水を用いたという 1



点のみであった。NMN の性質上、調製から使用までの期間が短い飲水を選択したが、あくまで自由摂取にしていた。長期間の研究であるため現実的ではないが、ゾンデを用いた経口投与に変更する必要があるかもしれない。また、今回の研究期間内に予定していた NR の解析は、成果を報告するに至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡本直樹
2. 発表標題 サプリメントを用いた卵子の質向上への挑戦
3. 学会等名 日本生殖医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki okamoto
2. 発表標題 Ant-aging treatment in reproductive medicine: modification of life style and trial of supplemental diet.
3. 学会等名 8th International Conference on NUTRITION, FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------