

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 年～2010 年

課題番号：19390431

研究課題名（和文） 不妊病態に関わる膜融合因子の研究と生殖医療への応用

研究課題名（英文） Functional analysis of fusogenic factors related to infertility and its clinical application

研究代表者

宮戸 健二 (MIYADO KENJI)

独立行政法人 国立成育医療研究センター ・ 生殖・細胞医療研究部 ・ 室長

研究者番号：60324844

研究成果の概要（和文）：

本研究では、精子と卵子の膜融合のメカニズムに関する研究をおこなった。今までの研究から CD9 と呼ばれる膜タンパク質が卵側因子として必須であることを報告してきたが、本研究から、CD9 は卵子から放出される分泌小胞、エキソソーム（exosome）、の構成因子として機能しており、CD9 が欠損するとエキソソームが放出できなくなること、さらに、エキソソームには精子が融合能力を獲得する際に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Membrane fusion is an essential step in the encounter of two nuclei from sperm and egg in fertilization. Here, we showed that sperm-egg fusion is mediated by vesicles containing CD9 that are released from the egg and interact with sperm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

卵子の生殖能力を温存する方法としては、悪性腫瘍治療にともなう化学療法や放射線治療によって引き起こされる卵巣不全、卵細胞の機能障害に対して、卵巣や卵子の凍結保存による妊孕性温存法の開発を含めた様々な検討が現在行われている。しかし、卵細胞は大きさや細胞周期が体細胞とは大きく異なることから、卵細胞の機能を完全に保存した状態での有効な凍結方法や、精子と融合す

る受精能力をもった卵子（成熟した卵細胞）の機能回復を図るための培養方法は未だに確立されていない。そのため、加齢によってヒト卵子の生殖能力が低下することが知られているが、対処方法が存在しないのが現状である。

凍結保存による問題点としては、凍結融解および卵巣移植による環境変化によって卵子の有する受精能力および受精後の細胞分裂や細胞分化によって個体を形成するため

の発生能力が損傷を受ける可能性が考えられる。卵子の受精能力および発生能力を制御する分子メカニズムに関する科学的知見が不足している現状では、卵子機能の回復に関する分子レベルの指標が存在しないため、卵子の損傷度を診断することができない。

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実験から、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明らかにしてきた (Miyado *et al. Science*, 2000)。CD9 は、細胞接着分子や膜結合型細胞増殖因子などと細胞膜で複合体を形成し、細胞接着を介した細胞増殖を制御すると考えられている膜タンパク質である。本研究では CD9 が関わる膜融合機構を蛍光タンパク質との融合タンパク質を卵特異的に発現させることによって生きた卵子での CD9 の局在解析を通じて、受精を制御する分子メカニズムの解明をめざした研究を行った。マウス卵子とヒト卵子の受精は同様の分子メカニズムによって制御されていると考えられていることから、マウス卵子から得られる結果はヒト卵子にも応用可能であると考えられる。

2. 研究の目的

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、十分に検証することが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も合わせて研究開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 生きた状態での受精の観察

CD9 を免疫染色した結果から、時間経過にともなって未受精卵子での CD9 の局在が大きく変化することがわかってきた。そこで、受精のイメージング系をマウス卵子を用いて構築することにより、受精前後での細胞膜の動態を経時的に観察した。特定のタンパク質に蛍光タンパク質を融合させることにより、卵子側を視覚化する研究はいままで例がない。検出には、共焦点レーザー顕微鏡およびライカ蛍光イメージングシステムを用い、3次元画像として再構築する。この系を立ち上げることにより、時間的空間的なタンパク質の挙動変化を、受精に関連させて経時的に追跡することができる。現在の蛍光顕微鏡で使

用するフィルターの種類および蛍光タンパク質の種類から考えると、10種類のタンパク質の挙動を生きた卵子を使って観察することが可能である。

(2) トランスジェニックマウスの作製

CD9 の細胞内領域に EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) を融合させたタンパク質を発現するトランスジェニックマウス (Tgマウス) を作製した。作製に際しては卵子特異的に発現させる系統と全身に発現する系統の作製を試みたものの、結果として卵子特異的に発現させる系統のみが樹立できた。その雌マウスから排卵された卵子を用いて、生きた卵子での CD9 の動態を観察した。プロモーターには、卵子特異的マウス ZP3 プロモーターを用いた。さらに、Tgマウスと CD9 欠損マウスを交配させることにより、EGFP-CD9 融合タンパク質が正常に機能するかどうか、融合異常を回復できるかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

国立成育医療センター動物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。

4. 研究成果

(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 (図1)。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。

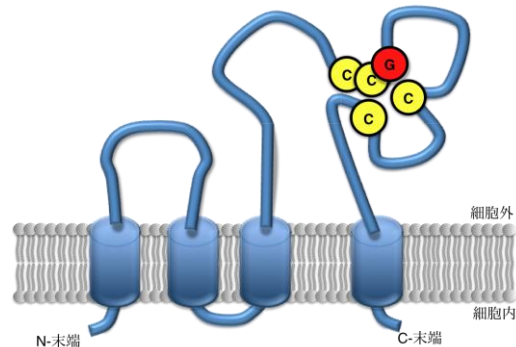


図1 CD9の構造模式図

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下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られず、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。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精子が CD9 欠損卵子に融合することを確認した。以上のことは、卵子から囲卵腔に分泌された 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 を含む構造体が囲卵腔に存在することがわかった (図 2)。その

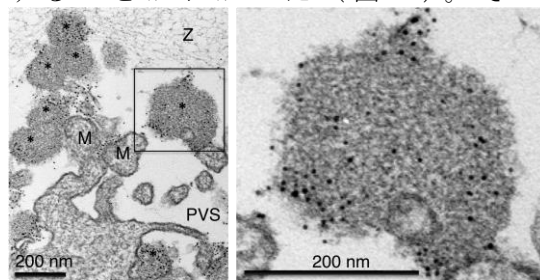


図2 CD9を含む卵子エキソソームの電子顕微鏡像
Z:透明帯、M:微絨毛、PVS:囲卵腔

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。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、機能性の構造物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物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 β 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 β 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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. 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.* 11:22 (2011) (査読あり) .
2. 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)
3. Kawano N., Yoshida K., Harada Y., Onami N., Takezawa Y., Miyado K. Role of CD9 and CD9-containing exosomes in sperm-egg membrane fusion. *J Mamm Ova Res.* 27(4): 191-197 (2010). (査読なし)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(35): 12921-6 (2008) (Miyado K is a corresponding author; Faculty of 1000 Biology 推薦論文) (査読あり)
 13. Takeda Y, He P, Tachibana I, Zhou B, Miyado K, Kaneko H, Suzuki M, Minami S, Iwasaki T, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Yoshida M, Osaki T, Komori T, Mekada E, Kawase I. Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J Biol Chem* 283(38): 26089-97 (2008) (査読あり)
 14. Katagiri Y, Sato B, Miyado K, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Kiyokawa N. Functional significance of stage-specific embryonic antigens in the development of preimplantation embryos. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 20(113): 131-39 (2008) (査読なし)
 15. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*, 26(7): 1695-704 (2008) (査読あり)
 16. Hamatani T, Yamada M, Akutsu H, Kuji N, Mochimaru Y, Takano M, Toyoda M, Miyado K, Umezawa A, Yoshimura Y. What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? *Reproduction*, 135(5):581-92 (2008) (査読あり)
 17. Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Umezawa A, and Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev*, 75(1):150-5 (2008) (Miyado K is a corresponding author) (査読あり)
 18. Ito M, Muraki M, Takahashi Y, Imai M, Tsukui T, Yamakawa N, Nakagawa K, Ohgi S, Horikawa T, Iwasaki W, Iida A, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Miyado K, Kono T, Hosoi Y, Saito H. Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertil Steril*, 90(4):1026-35 (2008) (査読あり)
 19. Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 364 (4):838-43 (2007) (査読あり)
 20. Miyado M, Ogi H, Yamada G, Kitoh J, Jogahara T, Oda S, Sato I, Miyado K, Sunohara M. Sonic hedgehog expression during early tooth development in *Suncus murinus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(2):269-75 (2007) (査読あり)
 21. Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res*, 313(12):2550-62 (2007) (査読あり)
 22. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells*, 25(8):2017-24 (2007) (査読あり)
 23. Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and

- myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell*, 18(5):1586-94 (2007) (査読あり)
24. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*, 100(5):1240-54 (2007) (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. Miyado K: CD9 action in the egg and on the sperm of mice. Cell-Cell Fusion Gordon Research Conference, New London, 2009.7.19
2. 宮戸健二. 受精の膜融合における卵側因子 CD9 とエキソソームの役割. シンポジウム「動植物におけるアロ認証機構」第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10 月 21-24 日, 2009.
3. 河野菜摘子, 宮戸健二. 膜融合を制御するテトラスパニンの役割: 受精からのアプローチ. シンポジウム「テトラスパニンの生化学」第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10 月 21-24 日, 2009.
4. 宮戸健二. 受精の膜融合における卵側因子 CD9 とエキソソームの役割. ワークショップ「動植物におけるアロ認証機構」第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 日, 2009.
5. 河野菜摘子, 宮戸健二. 受精の膜融合における CD9 のユニークで不可欠な挙動. ワークショップ「テトラスパニン研究の新展開」第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 9-12 日, 2009.
6. Ito M, Nagaoka K, Kuroda K, Kawano N, Yoshida K, Harada, Y, Shikano T, Miyado M, Oda S, Toshimori K, Mizukami Y, Murata T, Umezawa A, Miyazaki S, Miyado K. Arrest of spermatogenesis at round spermatids in PLCZ1-deficient mice. Symposium: Sperm formation and differentiation, 11th International Symposium on Spermatology, June 24th-29th, 2010.
7. Kawano N, Araki N, Yoshida K, Yoshida M, Miyado K. The essential role of seminal vesicle secretions on the sperm fertility in the female reproductive tract. 11th International Symposium on Spermatology, June 24th-29th, 2010.
8. Harada Y, Iwao Y, Miyado K. Signal transduction and function of sperm citrate synthase as a sperm factor in vertebrate fertilization. 11th International Symposium on Spermatology, June 24th-29th, 2010.
9. Takezawa Y, Nakamura A, Sakakibara K, Kawano N, Harada Y, Yoshida K, Umezawa A,

Miyado K. Ablation of beta-catenin suppresses membrane localization of E-cadherin and reduces the ability of membrane adhesion with sperm in mouse eggs. 11th International Symposium on Spermatology, June 24th-29th, 2010.

10. 宮戸健二. 哺乳動物における配偶子融合の分子認証機構. シンポジウム「植物から学ぶ受精機構: 動植物共通のアロ認証機構を考える」. 第 81 回日本動物学会大会, 東京, 9 月 24 日, 2010.

[図書] (計 7 件)

1. 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.
2. 宮戸真美, 尾木秀直, 城ヶ原貴通, 織田銃一, 宮戸健二. VI-12 歯胚形成過程における *sShh* 遺伝子の発現. 「スunksの生物学」学会出版センター 2011 年 2 月.
3. 宮戸真美, 尾木秀直, 織田銃一, 宮戸健二. VI-13 スunks雄の外生殖器. 「スunksの生物学」学会出版センター 2011 年 2 月.
4. 宮戸健二. 目で見る生殖に関連したモデル動物 - 受精障害モデル動物 - Hormone Frontier in Gynecology 16: 2-5 (2009).
5. 岡部勝, 宮戸健二 編 「顕微鏡活用なるほど Q&A」 羊土社 (2008).
6. 高橋祐司, 宮戸健二, 齋藤英和. 生殖における酸化ストレスの生理的役割と不妊症疾患. 実験医学 26: 586-590 (2008).
7. 宮戸健二. 受精卵が作られるしくみ: 精子と卵の融合機構の解明. 財団法人 三共生命科学振興財団 研究報告集 23: 144-156 (2007).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞の造腫瘍性試験方法及び腫瘍マーカー

発明者: 宮戸健二, 梅澤明弘

権利者: ヒューマンサイエンス財団

種類:

番号: 特願 2010-215828

出願年月日: 2010.9.27

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

名称: 哺乳動物卵内への細胞外物質の導入促進剤及び導入方法

発明者: 阿久津英憲, 宮戸真美, 宮戸健二

権利者：Japan Science and Technology Agency
種類：
番号：特許第 4448172 号
取得年月日：2010.1.29
国内外の別：国内

名称：Promoter for introducing extracellular
substance into mammalian ovum and
introduction method
発明者：H Akutsu, M Miyado, K Miyado
権利者：Japan Science and Technology Agency
種類：
番号：2006242041
取得年月日：2010.11.11
国内外の別：国外（オーストラリア）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ncchd.go.jp/research.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮戸 健二 (MIYADO KENJI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
生殖・細胞医療研究部・室長
研究者番号：60324844

(2)研究分担者

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
生殖・細胞医療研究部・室長
研究者番号：50347225

(3)連携研究者 該当なし