

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32206

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06258・19K21351

研究課題名(和文) 高齢不妊の革新的治療法開発のための胚の老化誘導因子CXCL5の解明と妊娠率の改善

研究課題名(英文) Identification of the role of CXCL5 for embryo aging for development of the innovative clinical treatment to advanced aging infertility patients

研究代表者

川越 雄太 (Kawagoe, Yuta)

国際医療福祉大学・医学部・研究員

研究者番号：10609077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、高齢不妊患者の老化した着床前期胚では炎症性の分泌因子であるCXCL5の発現が上昇し、胚自らが分泌するCXCL5により質の低下が引き起こされ、その結果着床率が低下することを確認した。また、マウス胚を用いた動物実験により、高齢マウス胚のCXCL5を胚の培養中に中和抗体を用いて抑制することで、胚の細胞増殖が促進され着床率の改善効果が認められた。CXCL5の抑制は胚の発生には影響せず、CXCL5抑制高齢マウス胚の遺伝子発現は若齢マウス胚の発現にある程度類似していくことが確認された。また、CXCL5抑制胚由来の産仔に異常は見られなかったことから、安全に臨床応用ができると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、着床前期胚の老化を誘導している新規因子の一つとしてCXCL5が見出された。また、胚の培養中にCXCL5シグナル経路を抑制することにより、高齢マウス胚の着床率が改善することを確認した。本研究を臨床応用することにより、これまで効果的な治療方法が確立されていなかった高齢不妊患者の新規治療法となり、より多くの不妊患者を救うことが可能になると考えられる。また、効果的な治療を行えることで治療費の削減にもつながる。本研究成果は、今後の晩婚化社会において非常に有用な技術となることが予想される。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that the expression levels of CXCL5, an inflammatory factor, was increased in the aging preimplantation embryos of middle-aged infertile patients. In addition, CXCL5 secreted from the embryos caused of decrease the implantation rate due to the decline of embryo quality.

From the result of animal experiments, suppression of CXCL5 with neutralizing antibody during embryo culture promoted cell proliferation and improved implantation rates. CXCL5 suppression did not affect embryonic development. On the other hand, the gene expression profile of CXCL5-suppressed aging mouse embryos was close to that of young mouse embryos. In addition, there are no abnormalities in offspring derived from the CXCL5-suppressed embryos. It suggested that CXCL5 suppression of aging embryos can be safely applied in clinical treatment.

研究分野：生殖医学

キーワード：高齢赴任 胚発生 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の最も多い不妊原因は高齢不妊であり、晩婚化の傾向が著しい現代の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。高齢不妊の主たる原因は卵子、着床前期胚の質の低下である。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。しかし、未だ効果的な治療方法は確立されておらず、高齢患者が自らの卵子で妊娠することは非常に困難である。

高齢不妊患者の治療として最も臨床成績が良い方法は、提供卵子を用いた体外受精胚移植であるが、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。高齢不妊患者の自らの卵子での妊娠性を向上させるためには、老化によって低下した胚の質を改善する必要がある。これまでの発想は多くのものが、胚を攻撃する外的因子から胚を守るというものであったが、その効果は満足いくものではなかった。そこで、胚自ら産生する内在性の因子が胚の老化を促進する可能性に着目した。ヒト胚の網羅的遺伝子発現解析により抽出したCXCL5が胚の老化を誘導する可能性があると考え、CXCL5シグナルを抑制することで高齢不妊患者の胚の質を改善する新たな治療法を開発できると考え、本研究を行った。

2. 研究の目的

現在、胚の質を診断する方法として形態学的な評価法が普及しているが、良好胚と診断された場合でも高齢患者の胚の妊娠率は低い。その原因として染色体異数性が指摘されているが、ヒトと比べて染色体異数性の割合が低いマウスにおいても、形態的に良好な高齢個体胚の妊娠率は低く、他の要因の関与が考えられる。胚の染色体異数性を治療することは困難であるため、染色体異数性以外の胚の質を低下させる要因を同定し、それを改善することで、高齢患者が自らの卵子で妊娠が可能となる方法を開発できると期待される。

これまで高齢患者の胚の質を改善するため、抗炎症、抗酸化作用を示すサプリメントなどの摂取や培養液への添加などが試みられてきたが、未だ確立された方法はない。我々は全く新しい発想で、若年・高齢患者由来胚における発現遺伝子の網羅的比較解析により、胚の老化を誘導する内在性の因子の同定を試み、そのシグナルを抑制することで胚質の改善を目指してきた。そこで本研究では、同定された胚の老化を誘導する内在性の候補因子のうちCXCL5に着目し、そのシグナル抑制による胚の質の改善効果を明らかにし、高齢不妊患者への新たな治療法の確立を目標に研究を行った。

3. 研究の方法

(1)CXCL5刺激による若齢マウス胚の妊娠率低下のメカニズムの解明

CXCL5による妊娠率の低下の原因を解明するために、*in vitro*試験にてCXCL5刺激による着床不全の誘起を確認した。3-6週齢の若齢マウス由来の受精卵をCXCL5添加培養液で培養した。96時間後に拡張期胚盤胞を3%FBS添加培養液に移し替え、経時的に胚のディッシュへの接着と、伸展したトロホブラストの細胞数および面積を測定し、着床能の評価を行った。同時に老化マーカー遺伝子(Real-time RT-qPCR)の測定を行った。

(2)高齢マウス胚のCXCL5シグナル抑制による胚の質と妊娠率の改善

マウスモデルを用いてCXCL5シグナル抑制による胚の質と妊娠率の改善効果を調査した。さらに本法の有用性を確認するため、CXCL5シグナル抑制による高齢マウス胚の遺伝子発現プロファイルの変化を調べた。43-53週齢の高齢マウス由来の受精卵を種々の濃度のCXCL5中和抗体を添加した培養液で96時間培養し、胚盤胞到達率と老化マーカー遺伝子の発現量を測定した。また、得られた胚盤胞を若齢偽妊娠マウスの子宮内に移植して19日目に帝王切開をし、着床率、産仔獲得率を調べた。さらに良好な改善効果を得るため、CXCL5のレセプターであるCXCR2を抑制する低分子化合物を用いて、それらの単独効果または中和抗体との相乗効果を調べるために同様の実験を行った。

また、CXCL5シグナル抑制が高齢マウス胚の遺伝子発現プロファイルをどの程度若齢マウスに近づけることができるかを評価するために、若齢マウス胚、高齢マウス胚、CXCL5シグナルを抑制した高齢マウス胚の3群間の遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に比較した。

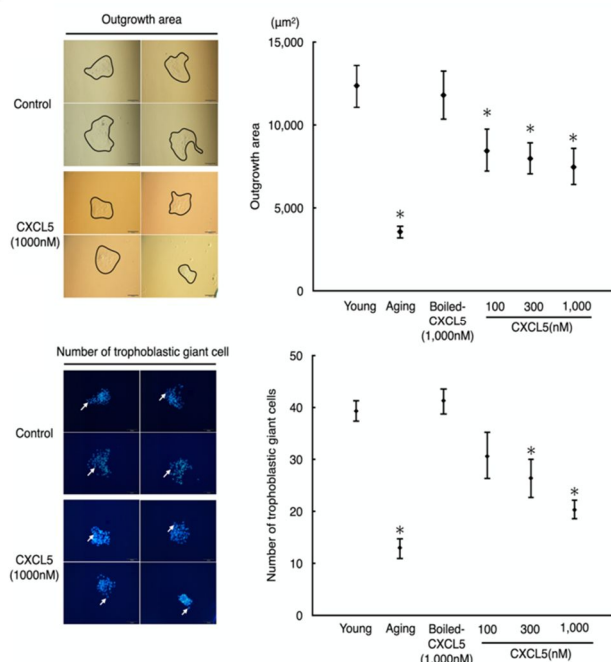
4. 研究成果

本研究により、老化に伴う卵子・胚の質低下を促進する遺伝子としてCXCL5を見出し、高齢マウス胚でそのシグナルを抑制することにより、胚質改善効果があることを初めて見出した。また、その結果、高齢マウス胚の着床率および産仔獲得数が改善した。

そこで、CXCL5シグナルによる胚質低下がどのような機序により着床能の低下に影響しているかを、若齢マウス胚にCXCL5を作用させ、老化を誘導してその解明を試みた。CXCL5を作用させた若齢マウス胚では、老化マーカーとされている代表的な遺伝子のうち、3つの遺伝子(p21、PAI-1、IL-6)の発現が増加することを確認した。また、胚盤胞への発生率への影響は見られなかったが、着床率はCXCL5の濃度依存的に低下した。したがって、高齢マウス胚ではCXCL5シグナルの活性化によって老化に伴う胚質低下が誘導され、その結果着床率が低下していると考えられた。さらに、着床の機構にどのような影響が現れるかを解明するために、*in vitro*試験にて着床率

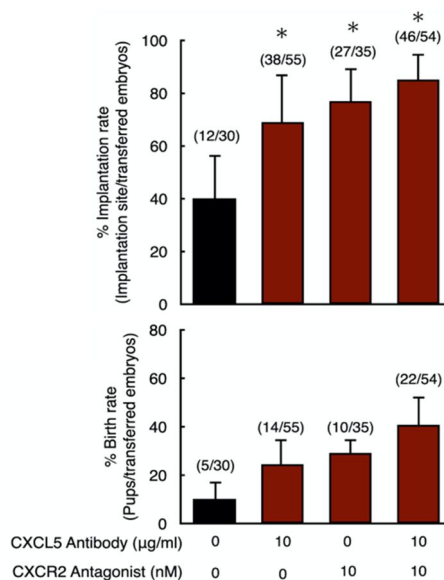
低下の原因を探った。CXCL5 を作用させた胚を細胞培養用のチャンパー付きスライドガラス上に静置し 3%FBS 添加培養液で追加培養し、スライドガラスへの接着率を観察したところ、若齢マウス胚と CXCL5 を作用させた若齢マウス胚で差は認められなかった。しかし、接着した後のトロホプラストの伸展面積は CXCL5 を作用させた胚で有意に縮小した(図 1)。また、*in vitro* 試験で着床能の指標となる Trophoblastic giant cell の細胞数を比較したところ、CXCL5 を作用させた胚では細胞数の有意な減少が見られた(図 1)。老化による CXCL5 の発現増加が、トロホプラストの細胞増殖抑制と、老化マーカーの1つである PAI-1 の発現上昇を引き起こして、子宮内膜に接着はするが、胚が内膜に浸潤する際に分泌する MMP タンパク質の活性を抑制し、接着後の子宮内膜筋層への浸潤および、浸潤後の細胞増殖を抑制するため、妊娠率が低下することが推察された。

(図 1)



本研究では培養中に胚から分泌される CXCL5 を中和抗体あるいはレセプターである CXCR2 を抑制する程分子化合物を用いて、CXCL5 シグナルを抑制して胚の質の改善を試みた。受精直後の高齢マウス胚の培養中に CXCL5 中和抗体単独および CXCR2 抑制低分子化合物単独添加のどちらにおいても着床率の改善効果が認められた。また、中和抗体と低分子化合物を混合添加した場合には、さらなる抑制効果が観察された(図 2)。さらに、それに伴って移植胚数に対する産仔獲得率も改善したため、総産仔数は増加した(図 2)。さらに、CXCL5 シグナルを抑制した高齢マウス胚の遺伝子発現プロファイルが若齢マウス胚の遺伝子発現に類似していくことも確認した。本研究の結果は卵子・胚の老化に伴う質の低下を誘導している新規内因性因子の同定と、それを胚の培養中に抑制することによる質の改善、またそれに伴う着床率の改善効果を認めた世界で初めての研究であり、高齢を原因とした不妊症患者に対する革新的な治療法となる可能性を秘めている。しかし、本研究はマウスを用いた動物実験の結果であり、ヒトへの臨床応用をする上で、本研究で行ったシグナル抑制法の安全性のさらなる検討を行う必要がある。本シグナル抑制法のヒト胚に対する安全性が認められれば、これまでは効果的な治療法が確立されていなかった高齢不妊症患者に対する革新的な治療法となることが考えられる。昨今の晩婚化に伴う高齢不妊症患者の増加に対する治療法として、社会的意義も十分に大きいものと考えられる。

(図 2)



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〕

-

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