

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16805

研究課題名（和文）加齢卵の小胞体ストレスターゲティング治療の確立

研究課題名（英文）The establishment of endoplasmic reticulum stress targeting treatment of aged oocytes

研究代表者

竹原 功 (Takehara, Isao)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80642496

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）：加齢に伴い卵子は質が低下し、妊娠成績が悪化するが有効な治療方法がないのが現状である。本研究ではこうした質の低下について、卵子の細胞内でミトコンドリアと小胞体の両者が相互に影響を及ぼしていることを初めて示した。さらに、受精前の加齢卵に小胞体またはミトコンドリアの機能改善薬を使用したところ、いずれの治療薬を使用した場合も、その後の受精卵の発育成績が改善した。ただし両者の相乗作用を示すには至らず、今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では年々不妊治療を受ける女性の年齢が上昇しているが、加齢に伴う卵子の質低下に対する有効な治療方法はない。これまで試みた小胞体やミトコンドリアを標的とした研究では、治療成績の改善は部分的であった。本研究では、受精前の治療薬使用により小胞体とミトコンドリアのいずれを標的とした場合も治療成績が改善した。今後両者を組み合わせることで、加齢に伴う卵子の質低下に対する治療開発の足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：With aging, the quality of oocytes declines and pregnancy outcomes deteriorate, but there is currently no effective treatment. In this study, it was shown for the first time that both mitochondria and endoplasmic reticulum in the oocyte interact with each other to cause this deterioration in quality. Furthermore, when either endoplasmic reticulum or mitochondrial function-improving drugs were used on aged oocytes prior to fertilization, the subsequent developmental outcome of embryos improved with either treatment. However, a synergistic effect between the two was not demonstrated, and this remains an issue for the future.

研究分野：生殖医学

キーワード：小胞体ストレス ミトコンドリア 加齢卵 胚発育

1. 研究開始当初の背景

女性の加齢に伴う卵子の質の低下は、受精率や妊娠率の低下、胚発育の悪化、流産率の上昇といった治療成績の悪化を招き、難治性である。これまで我々は、こうした加齢に伴う卵子の質の低下について、酸化ストレスが影響[1]し、それに伴いミトコンドリア機能が低下[2]し、小胞体ストレス応答が過剰となっている[3]ことを明らかとしてきた。そこで、こうした細胞内小器官を標的とした治療についてマウスを用いて研究したところ、体細胞ミトコンドリア自家移植ではミトコンドリア機能は改善したが胚発育は改善しなかった[4]。小胞体ストレス制御薬を使用したところ、小胞体ストレスは減弱し胚発育も改善したが、生産率の改善までは認めなかった[3]。以上のようにそれぞれ単独で標的とした場合には治療効果は不十分であった。

近年、ミトコンドリアと小胞体の間には Mitochondria-associated ER membrane (MAM) などの密接な関連が着目されており、これらは相互に影響していることが示唆される。加齢に伴う卵子における質の低下についても MAM が関連している可能性があり、小胞体とミトコンドリアをそれぞれ単独で標的とするのではなく、相互の影響を考慮した治療が有効ではないかと考えられた。

2. 研究の目的

卵の加齢における小胞体ストレスとミトコンドリア機能の関係を明らかにする。さらに、小胞体ストレス制御およびミトコンドリア機能の改善が加齢卵の質を改善することを明らかにし、最終的に小胞体ストレスターゲティング治療の生殖補助医療への臨床応用をめざす。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレスへの暴露がミトコンドリア機能に影響するか、ミトコンドリア機能障害が小胞体ストレス応答へ影響するかについて検討する。小胞体ストレスの誘導には thapsigargin を用い、ミトコンドリア機能障害には CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) を用いて、免疫染色により卵子の機能を評価する。

(2) 小胞体ストレス制御薬の投与はミトコンドリア機能に影響するか、ミトコンドリア機能改善薬の投与は小胞体ストレス応答へ影響するかについて検討する。小胞体ストレス制御薬として salubrinal を用い、ミトコンドリア機能改善薬としては 5-ALA (5-aminolevulinic acid) を用い、免疫染色により卵子の機能を評価する。各薬剤を投与する加齢卵として排卵後加齢卵を用いる。

(3) 小胞体ストレス制御薬およびミトコンドリア機能改善薬を投与し、胚発育が改善するか検討する。上述した salubrinal および 5-ALA を受精前の加齢卵に投与し、その後の胚発生を観察する。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスへの暴露がミトコンドリア機能に影響するか。

新鮮卵 (Fresh) に対して小胞体ストレス誘導薬として Tapsigargin (Tg) あるいはミトコンドリア機能障害誘導薬として CCCP を投与し、ミトコンドリア機能 (図 1 左: MitoSOX で評価) または小胞体ストレス応答 (図 1 右: GRP78 で評価) について免疫染色で評価した。Tg 投与により GRP78 の発現は増強し (図 1 右中央)、MitoSOX の発現も増強した (図 1 左中央)。

CCCP の投与も同様に、MitoSOX の発現が増強した (図 1 左下) のみならず、GRP78 の発現も増強した (図 1 右下)。これらのことから、小胞体ストレス誘導およびミトコンドリア機能障害の誘導はそれぞれ小胞体ストレス、ミトコンドリア機能の両者に影響を与えていることが示唆された。

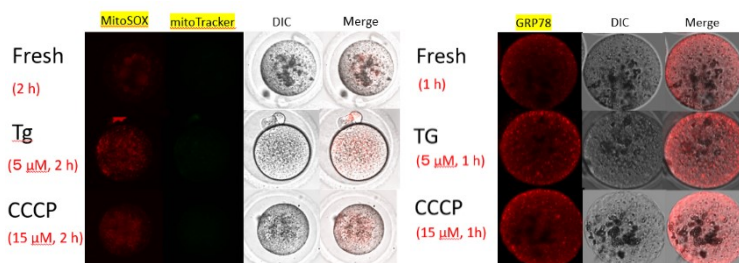


図 1. 小胞体ストレス、ミトコンドリア機能障害を誘導した際のミトコンドリア機能 (左) と小胞体ストレス応答 (右) の評価

(2) 小胞体ストレス制御薬の投与はミトコンドリア機能に影響するか、ミトコンドリア機能改善薬の投与は小胞体ストレス応答へ影響するか。

(排卵後) 加齢卵は卵子の質の低下に伴い、過剰な小胞体ストレス応答とミトコンドリア機能障害がそれぞれおきている(2)(3)。この加齢卵 (Aged) に対して、小胞体ストレス制御薬として Salubrinal、またはミトコンドリア機能改善薬として 5-ALA を投与し、加齢卵の質が改善するか免疫染色で検討した。Salubrinal を投与すると GRP78 の発現は有意に減少した(図2右)が、mitoSX

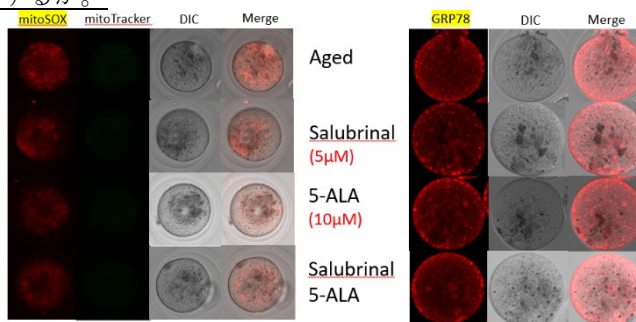


図2. 小胞体ストレス制御薬、ミトコンドリア機能改善薬を投与した際のミトコンドリア機能(左)と小胞体ストレス応答(右)の評価

の発現は減弱傾向にあったものの有意ではなかった(図2左)。同様に 5-ALA の投与では mitoSOX の発現は減弱した(図2左)が、GRP78 の発現は変化しなかった(図2右)。また、Salubrinal と 5-ALA を同時に投与したところ、mitoSX の発現は減弱したものの、5-ALA 単剤投与と比較すると有意な減少を認めなかった(図2左、最下段)。また GRP78 の発現は変化しなかった(図2右、最下段)。小胞体ストレス制御はミトコンドリア機能を部分的に改善させる可能性があるが、未受精卵におけるミトコンドリア機能の改善では小胞体ストレス応答には影響が少ない可能性が考えられた。

(3) 小胞体ストレス制御薬およびミトコンドリア機能改善薬を投与し、胚発育が改善するか。

(排卵後) 加齢卵に対して Salubrinal (Sal) および 5-ALA を受精前に投与し、その後の胚発生率を評価した。2細胞期(2cell)、4-8細胞期(4-8cell)については胚発生に有意差がなかったが、桑実胚および胚盤胞の発生率は、Salubrinal 単剤、5-ALA 単剤ともに発生率が有意に上昇した。一方、Salubrinal と 5-ALA の両者を同時投与した場合も桑実胚と胚盤胞への到達率は上昇したものの、それぞれ単剤投与した群と比較すると到達率に有意差は認められなかった。これらのことから、Salubrinal も 5-ALA も治療成績の改善が期待されるものの、両者を単純に加えるのみでは相乗効果を得ることができないことが示唆された。しかし、本研究の方法では先行研究における結果[4]とは異なり、ミトコンドリア機能を改善させるアプローチによっても胚発生率の改善を認め、その点においては新規性があると考えられる。今後は両者を併用する方法を工夫して成績を改善させられるよう研究を進展させる予定である。

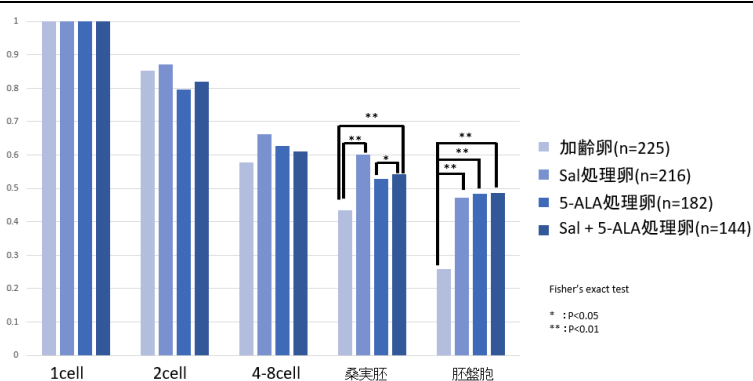


図3. 小胞体ストレス制御薬、ミトコンドリア機能改善薬を投与した際の胚発生率の評価

<引用文献>

[1] Takahashi T et al. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. Mol Reprod Dev. 2003 Oct;66(2): 143-52
 [2] Igarashi H et al. Aged mouse oocytes fail to readjust intracellular adenosine triphosphates at fertilization. Biol Reprod. 2005 May;72(5):1256-61
 [3] Takehara I et al. Impact of endoplasmic reticulum stress on oocyte aging mechanisms. Mol Hum Reprod. 2020 Aug 1;26(8):567-575.
 [4] Igarashi H et al. Poor embryo development in post-ovulatory in vivo-aged mouse oocytes is associated with mitochondrial dysfunction, but mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation. Hum Reprod. 2016 Oct;31(10):2331-8

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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村文洋、竹原功、金子宙夢、中井奈々子、高橋杏子、松川淳、永瀬智
2. 発表標題 加齢卵におけるミトコンドリア、小胞体・ターゲティング治療の検討
3. 学会等名 第59回東北生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumihiro Nakamura, Isao Takehara, Saki Hine, Ai Sato, Nanako Nakai, Jun Matsukawa, Michi Nishi, Satoru Nagase
2. 発表標題 Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Crosstalk in Oocytes
3. 学会等名 第76回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2024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
研究協力者	中村 文洋 (Nakamura Fumihiro)		

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