

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659107
 研究課題名（和文）加齢卵子の質的改善と人工授精後の正常発生を可能にする基盤技術の開発
 研究課題名（英文）Qualitative improvement of aged eggs and development of technologies supporting ART at later ages
 研究代表者
 栗原 裕基（KURIHARA HIROKI）
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20221947

研究成果の概要（和文）：女性のライフスタイルの変化などによる晩産化により、生殖補助医療の対象年齢層も高まってきている。加齢卵子の質的低下に酸化ストレスやミトコンドリア機能低下の関与が指摘されているが、本研究ではその機序として、ミトコンドリアに局在する NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 Sirt3 の発現レベル低下が関与し、Sirt3 導入が受精後の発生率を改善させる可能性を示した。さらに、コンディショナル Sirt3 過剰発現マウスを作成し、卵子特異的 Cre 発現マウスを用いて卵子特異的 Sirt3 発現マウスの樹立を行い、その解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：Changes in women's life styles have lead to the tendency of late childbearing, requiring ART at later ages. However, oxidative stress and decreased mitochondrial function are supposed to cause the deterioration of eggs with increasing age. In this study, we found that mitochondrial NAD⁺-dependent deacetylase Sirt3 may be involved in mechanisms underlying the deterioration and introduction of Sirt3 may improve the post-fertilization development. Furthermore, we established transgenic mice conditionally expressing Sirt3 in specific cell types including oocytes and eggs, whose phenotype is being analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生殖医学、老化、卵子、体外受精、ミトコンドリア、サーチュイン遺伝子

1. 研究開始当初の背景

女性のライフスタイルの変化などによる晩産化は、近年の我が国や欧米諸国などにおける少子化の大きな要因である。晩産化により生涯出産数が少なくなるのみならず、年齢とともに正常出産率が低下することも一般によく知られており、不妊症に対する治療として我が国で定着してきた体外授精をはじめとする生殖補助医療（ART）も、高い年齢層への需要がより高まっていくと考えられるが、ART の成功率も母体の年齢とともに低下する。こうした加齢に伴う妊娠成立や正常出

産率の低下、さらにはトリソミーなどの染色体異数性発生率増加の原因として、活性酸素種（ROS）やミトコンドリア機能低下などによる卵子の質的低下が指摘されているが、その分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。

当研究室ではこれまで、初期胚発生に関し、（１）初期胚における DNA メチル化の維持機構、（２）細胞内の代謝状態の変化や細胞外環境変化に起因する酸化ストレス応答機構、を課題として研究に取り組んできた。（１）では初期胚においてこれまで不明であった

着床前胚での維持メチル化酵素が1型 DNA メチル基転位酵素の体細胞型アイソフォーム (Dnmt1s) であることを見だし、着床前胚特異的な核-細胞質間移行の存在を明らかにした (Kurihara Y et al., Dev Biol, 2008)。(2) では、長寿遺伝子として知られる NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素 Sirtuin のうち、ミトコンドリアに局在する Sirt3 が、体外受精・培養に伴う酸化ストレスに対して防御的に機能し、初期胚発生の進行に寄与していることを RNAi やノックアウトマウス胚を用いた実験を通して示した。即ち、Sirt3 機能欠損受精卵が好氣的環境下に曝されると、機能が低下したミトコンドリアから過剰な ROS が産生され、その結果 p53 シグナル経路が誘導されて初期胚発生が停止することを初めて明らかにした (Kawamura Y et al., J Clin Invest, 2010)。Sirt3 は諸臓器で、加齢や糖尿病などで発現が低下することが報告されており、加齢に伴う卵子のミトコンドリア機能低下にも関与していることが予想される。本申請では、これらの成果と知見を背景に、卵子が加齢に伴って質的低下をきたすメカニズムを探り、さらにその改善により正常な妊娠成立と出産を可能にする新技術開発への道筋を開拓しようと考えた。

2. 研究の目的

加齢に伴う妊娠成立や正常出産率の低下、さらにはトリソミーなどの染色体異数性発生率増加の原因として、活性酸素種 (ROS) やミトコンドリア機能低下などによる卵子の質的低下が指摘されているが、その分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究において、我々は加齢に伴う卵子の質的低下に Sirt3 が関与しているかどうかを解析するとともに、Sirt3 mRNA の顕微注入によって加齢卵子の質が改善し、受精後の胚発生が改善するかどうかを検討する。さらに、卵の表現型を解析することにより、Sirt3 を標的とした加齢卵子に対する生殖補助医療の基盤技術開発の可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 加齢卵子における遺伝子発現の解析

10 週齢と 50 週齢の雌マウスから未受精卵を採取し、RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により Sirt3 mRNA とタンパクのレベルを比較した。さらに、Sirt3 欠損マウスにおける体外受精率、体外胚発生率などについても比較した。

(2) 加齢卵子を用いた mRNA 注入実験

加齢雌マウスから採取した卵子に *in vitro* で合成した Sirt3 mRNA を体外受精前に顕微注入し、その後の受精率や胚盤胞形成率、細胞内 ROS レベルを対照群と比較し、Sirt3 が卵子や胚の機能低下要因となっているか、

Sirt3 mRNA の導入による胚発生の改善の可能性があるかについて検討した。

(3) コンディショナル Sirt3 高発現マウスの作成

chicken β -actin プロモーターに loxP-stop-loxP-Sirt3 cDNA-T2A-EGFP をタンデムにつないだ遺伝子コンストラクトを作成し、これを Rosa26 遺伝子座に組み込んだプラスミドをマウス ES 細胞に導入することによって Cre 依存的に Sirt3 と EGFP を発現するマウスを作成した。Cre 発現マウスとして、Nkx2.5-Cre マウス (心筋細胞で発現)、Zp3-Cre マウス (卵細胞で発現) を用い、これらを上記マウスと交配することにより、組織特異的 Sirt3 発現マウスを得た。

4. 研究成果

卵子の加齢に伴う変化にミトコンドリアに局在する NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素である Sirt3 が関与することを示すため、Sirt3 発現の加齢に伴う変動とともに、mRNA 顕微注入による Sirt3 の過剰発現が卵子の加齢変化に対してどのような効果をもたらすかを解析し、以下の結果を得た。

(1) 加齢マウス (50 週齢) の卵巣では若齢マウス (10 週齢) の卵巣に比べて Sirt3 mRNA およびタンパクレベルの低下が認められ、加齢マウスから排卵された卵子でも若齢マウスの卵子に比べて Sirt3 mRNA の低下が認められた。Sirt3 欠損マウス由来の卵子では、同じ週齢の野生型マウス由来卵子に比べ、受精後発生率の低下や ROS の産生亢進を示し、Sirt3 レベルの低下が初期胚発生に影響を与えると考えられた。

(2) Sirt3 mRNA の卵子への顕微注入により、過酸化水素処理による卵子の受精後の胚発生率低下が著明に改善した。

(3) 加齢マウス (50 週齢) からの卵子は体外受精後の胚発生率が有意に低下することを確認した後、Sirt3 mRNA の顕微注入による効果を解析し、その発生率が改善する傾向があることを見出した。これが有意な改善効果を示すものであるかどうか、現在引き続き検討を重ねている。

(4) Sirt3 過剰発現の効果とその機序をさらに明らかにするため、Cre-loxP 依存性のコンディショナル Sirt3 過剰発現マウスを作成した。Nkx2.5-Cre マウスとの交配により心臓での過剰発現を確認後、Zp3-Cre との交配による卵子特異的高発現マウスを作成し、卵子における Sirt3 および EGFP の過剰発現を確認した。現在、その卵子の表現型解析を継続中である。

(5) 以上の結果から、Sirt3 が胚発生においてストレス応答性を改善させる因子として働く可能性が考えられ、高齢女性の生殖補助医療において Sirt3 を標的とした老化卵子の

人工受精率改善法の開発が期待された。

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)

[原著論文] (計9件)

(1) Kushiyama A, Sakoda H, Oue N, Okubo M, Nakatsu Y, Ono H, Fukushima T, Kamata H, Nishimura F, Kikuchi T, Fujishiro M, Nishiyama K, Aburatani H, Kushiyama S, Iizuka M, Taki N, Encinas J, Sentani K, Ogonuki N, Ogura A, Kawazu S, Yasui W, Higashi Y, Kurihara H, Katagiri H, Asano T. Resistin-like molecule β is abundantly expressed in foam cells and is involved in atherosclerosis development, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 査読有、113、2013、301546、doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301546

(2) Yamanishi Y, Takahashi M, Izawa K, Isobe M, Ito S, Tsuchiya A, Maehara A, Kaitani A, Uchida T, Togami K, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Kajikawa M, Kurihara H, Kitamura T, Kitaura J. A soluble form of LMIR5/CD300b amplifies lipopolysaccharide-induced lethal inflammation in sepsis. Journal of Immunology, 査読有、189、2012、1773-1779、doi: 10.4049/jimmunol.1201139.

(3) Kushiyama A, Okubo H, Sakoda H, Kikuchi T, Fujishiro M, Sato H, Kushiyama S, Iwashita M, Nishimura F, Fukushima T, Nakatsu Y, Kamata H, Kawazu S, Higashi Y, Kurihara H, Asano T. Xanthine oxidoreductase is involved in macrophage foam cell formation and atherosclerosis development. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 査読有、32、2012、291-298、doi: 10.1161/ATVBAHA.111.234559

(4) Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. Nature Medicine, 査読有、18、2012、1531-1538、doi: 10.1038/nm.2932

(5) Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J, Guo Y, Okubo H, Kushiyama A, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura

F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Role of Pin1 protein in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. The Journal of Biological Chemistry, 査読有、287、2012、44526-44535、doi: 10.1074/jbc.M112.397133.

(6) Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Maeda K, Asai R, Seya D, Minoux M, Rijli FM, Nishiyama K, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signaling. Nature Communications, 査読有、3、2012、1267、doi:10.1038/ncomms2258.

(7) Kushiyama A, Okubo H, Sakoda H, Kikuchi T, Fujishiro M, Sato H, Kushiyama S, Iwashita M, Nishimura F, Fukushima T, Nakatsu Y, Kamata H, Kawazu S, Higashi Y, Kurihara H, Asano T. Xanthine Oxidoreductase Is Involved in Macrophage Foam Cell Formation and atherosclerosis development. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 査読有、32、2012、291-298、doi: 10.1161/ATVBAHA.111.234559

(8) Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Identification and developmental analysis of endothelin receptor type-A expressing cells in the mouse kidney. Gene Expr Patterns, 査読有、11、2011、371-377、doi: 10.1016/j.gep.2011.04.001

(9) Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Koichi Nishiyama, Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial movement. Development, 査読有、138、2011、4763-4776、doi: 10.1242/dev.068023

[和文総説] (計1件)

(1) 河村悠美子, 栗原裕基 「初期胚における脱アセチル化酵素を介したミトコンドリア機能調節の意義」 Journal of Mammalian Ova Research, 査読無、29、161-169 (2012).

[学会発表] (計54件、国際学会のみ抜粋)

(1) Yumiko Kawamura "MicroRNA 199/214 cluster is required for normal growth and skeletal development in mice." Cell Synposia, Functional RNAs 2012年12月4日 Sitges (Spain)

(2) Yukiko Kurihara "Involvement of

non-coding RNA Evf2 in the endothelin signaling in branchial arch development.” Cell Symposia, Functional RNAs 2012年12月3日 Sitges (Spain)

(3) Yuichiro Arima “The novel contribution of preotic neural crest cells in the coronary artery development.” AHA scientific session 2012 2012年11月15日 Los Angeles (USA)

(4) Yumiko Kawamura “A defensive role of Sirt3 against oxidative stress and aging in preimplantation embryos.” the 25th Annual Mouse Molecular Genetics Conference 2012年10月3日 Pacific Grove, California (USA)

(5) Koichi Nishiyama “Cell-based mechanism behind angiogenic morphogenesis: analysis using both experimental and computational approaches.” 7th International Kloster Seeon Meeting ‘Angiogenesis’: Molecular Mechanisms and Functional Interactions 2012年9月15日 KLOSTER SEEON (Germany)

(6) Koichi Nishiyama “Analysis of cell-based mechanisms involved in angiogenic morphogenesis by biological and computational approaches.” 17th International Vascular Biology Meeting 2012 2012年6月9日 Rhein-Main-Hallen Wiesbaden (Germany)

(7) Rieko Asai “Mouse-chick chimeric transplantation reveals the regional contribution of the cell population arising from the inflow tract to cardiac chamber formation.” Weinstein Cardiovascular Development Conference 2012 2012年5月3日 Chicago (USA)

(8) Yuichiro Arima “The neural crest contributes to coronary artery smooth muscle formation through endothelin signaling.” Weinstein Cardiovascular Development Conference 2012 2012年5月3日 Chicago (USA)

(9) Yukiko Kurihara “Involvement of non-coding RNA: Evf2 in the Endothelin signaling in branchial arch development” Keystone Symposia Conference Non-Coding RNAs 2012年4月2日 Snowbird Cliff lodge (USA)

(10) Taro Kitazawa “Hox gene function and possible crosstalk with Dlx genes in craniofacial morphogenesis” Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2012年3月19日・20日 Four Points by Sheraton Los Angeles (USA)

(11) Yumiko Kawamura “Protective role of Sirt3 against p53-dependent developmental arrest induced by oxidative stress in preimplantation embryos” Keystone Symposia “Sirtuins in metabolism, aging and disease” 2012年2月13日 Granlibakken Resort, Tahoe City, California (USA)

(12) Koichi Nishiyama “Collective

endothelial cell movement in angiogenic morphogenesis” American Heart Association Scientific Session 2011年11月15日 Orlando Convention Center (USA)

(13) Yuichiro Arima “Coronary artery anomalies in Endothelin-1 and Endothelin A receptor knockout mice” American Heart Association Scientific Session 2011年11月15日 Orlando Convention Center (USA)

(14) Rieko Asai “The first heart field subdomain defined by endothelin receptor type-A expression contributes to conduction system development” ESC Working Group on Developmental Anatomy and Pathology 2011年9月24日 Liblice Casstle (Czech)

(15) Rieko Asai “Endothelin receptor type-A expression defines a distinct subdomain within the heart field and contributes to chamber myocardium ” Weinstein Cardiovascular Development Conference 2011 2011年5月6日 Hilton Cincinnati (USA)

(16) Ki-Sung Kim “Endothelin-1/Endothelin type-A receptor signaling regulates pharyngeal arch artery development through Dlx5/6-independent pathway” 2011 Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research joint meeting 2011年5月1日 Denver Convention Center (USA)

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ <http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・栗原 裕基 (KURIHARA HIROKI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20221947

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

・栗原 由紀子 (KURIHARA YUKIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80345040

・内島 泰信 (UCHIJIMA YASUNOBU)
東京大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：90272426

・河村 悠美子 (KAWAMURA YUMIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：70599779