

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861517

研究課題名(和文) 加齢に伴うコンドロイチン硫酸鎖の減少が妊孕性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Reduction of Chondroitin sulfate chains with aging is involved in fertility in mouse preimplantation embryos

研究代表者

佐藤 伴 (Sato, Ban)

神戸薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：90443126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高齢の不妊患者の生殖補助医療後の胚では、多核割球が高頻度に形成され妊孕性低下の原因となっている。多核割球の形成機序を解明するために以下の二つの研究に着目した。コンドロイチン硫酸(CS)鎖の欠損胚では多核割球が形成される。加齢に伴うCS鎖の減少が、加齢疾患の原因となっている。本研究では、以上の二つを基盤とし融合することで、加齢によるCS鎖の減少が多核割球形成の原因となっているという仮説を提唱し、検証した。これまでに、加齢に伴って卵巣内のCS鎖総量が減少すること、CS鎖の減少が割球間の脱離に影響を及ぼしている可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Multi nucleated blastomeres (MNB) have been widely reported in in vitro cultured embryos derived from in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The rate of chromosomal abnormalities increases as maternal age, resulting in a dramatically increased incidence of birth defects. Although the presence of MNB is considered abnormal and is possibly related various problem, the underlying mechanism of occurrence of MNB is poorly understood. To investigate the mechanism of MNB formation, we focused on two independent research topics. (1) The frequency of multinucleated blastomeres increases in chondroitin sulfate (CS) knockout embryos. (2) Several Age-related diseases cause by which the expression level of CS diminished with age. We hypothesized that formation of MNB is caused by reduction of CS chains with aging. In this study, we revealed that CS chains are involved in abscission at the telophase in mouse preimplantation embryos.

研究分野：生殖糖鎖生物学

キーワード：着床前胚 生殖医学 加齢胚 コンドロイチン硫酸 多核割球

1. 研究開始当初の背景

高齢の不妊患者の生殖補助医療(ART) (IVF (人工授精) 及び ICSI (卵細胞質精子注入法)) によって得られた着床前胚では、多核割球(MNB; Multi Nuclear Blastomere)が高頻度に形成され、流産率が高くなり、妊娠率が低下することが明らかとなっている (Staessen et, al., Human Reproduction, 13, 1625-1631, 1998, Egil et, al., J. Mamm. Ova. Res. 28, 118-125, 2011)。MNB がどのように形成されるかは、不適切な培養条件、低酸素状態の維持、遺伝的バックグラウンドなど様々な要因が考えられているが、不明な点が多く、回避策も確立されていない。そのため、MNB の形成機序を解明することは、不妊患者の軽減に貢献し、妊娠出産率の向上につながると思われる。本申請では、MNB 形成機序の解明のために、以下二つの事象に着目した。

1) マウスや線虫では、プロテオグリカン (PG) 上のコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖が欠損した GlcAT-1 ノックアウト(KO)胚や、着床前胚の CS 鎖分解酵素 (CSase) による消化によって MNB が形成され致死となることが所属研究室で明らかとなっている (Mizuguchi et, al. Nature, 423, 443-448, 2003, Izumikawa et, al. J. Biol. Chem., 285, 12190-12196, 2010)。さらに、骨格筋の分化過程においても CS 鎖の減少が多核化・融合に重要であるということが、最近明らかになっている (Mikami et, al. J. Biol. Chem. 287, 38531-38542, 2012)。このように、CS 鎖の減少そのものが、生体内において多核化を誘導する機構の一つとして提唱されている。

2) さらに、一般に知られるように、CS 鎖は加齢に伴って減少する。加齢に伴う CS 鎖の減少は、加齢疾患である変形性関節症や、退行変性である皮膚の老化などの主要な原因だと考えられている。実際に、加齢に伴ってヒトの軟骨や皮膚組織中の CS 鎖の鎖長が短くなり、その総量も減少していることが報告されている (Plaas et, al., J. Biol. Chem., 272, 20603-20610., 1997, Carrino et, al., Glycobiology, 21, 257-268., 2011)。生殖細胞において加齢に伴って CS 鎖の減少を示した報告は存在しないが、全身で加齢に伴い CS 鎖が減少している可能性が想定される。

以上のことから、加齢に伴う CS 鎖の減少が着床前期における MNB 形成の原因となって妊孕性の低下に関与することが推察され、CS 鎖欠損 (GlcAT-1 KO) 胚は MNB 形成再現モデルになると着想した。本申請では、MNB 形成再現モデルとしての卵特異的 GlcAT-1KO 胚、及び、申請者がこれまでに行ってきたライブイメージングを基軸とすることで、MNB 形成機序の解明及び治療法の探索を目指す (Sato et, al., BMC Dev. Biol, 11, 22, 2011)。

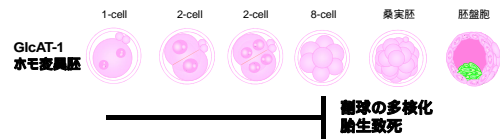


図 1, CS 鎖の生合成と GlcAT-1 KO マウス胚

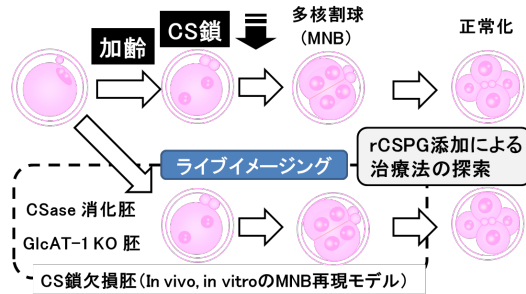


図 2, 本研究課題の概要

2. 研究の目的

高齢の不妊患者の生殖補助医療後の胚では、多核割球が高頻度に形成され妊孕性低下の原因となっている。しかし、その形成機序には不明な点が多く、また回避策として有効な手段も確立されていない。多核割球の形成機序を解明するために以下の二つの研究に着目した。コンドロイチン硫酸 (CS) 鎖の欠損胚では多核割球が形成され、さらに生体内においても骨格筋の分化過程で CS 鎖の減少が多核化・融合の過程に重要である。加齢に伴う CS 鎖の減少が、加齢疾患の原因となっている。本申請では、以上の二つの研究を基盤とし融合することで、加齢による CS 鎖の減少が多核割球形成の原因となり妊孕性低下の一因となっているという仮説を提唱し、検証した。

3. 研究の方法

加齢に伴う CS 鎖の減少が妊孕性に及ぼす影響を解析するために以下の実験を行った

加齢に伴う卵細胞の CS 鎖総量及び CS 鎖生合成酵素遺伝子群発現量の変動を明らかにする。

卵細胞における CS 鎖量の減少を明らかにする

卵巣組織内には多くの細胞系列が混在しているため、真の意味で卵細胞そのものの CS 鎖の減少を示す必要があるが、生化学的解析に耐える量を揃えることは困難を極める。そのため、卵細胞における加齢に伴う CS 鎖量の変動を調べるために、卵巣切片を作製し、抗 CS 鎖抗体を用いた蛍光免疫染色法を用いる。これによって蛍光量を定量化し、卵細胞及び卵巣組織内の他の細胞系列の加齢に伴う CS 鎖量の変動を明らかにする。

MNB 再現モデル GlcAT-1 KO 胚を用いた MNB 形成機序の解明

MNB 形成機序の解明のためには、細胞分裂のいずれの段階（核の分配、分裂溝の進行、中央体の形成、細胞間の脱離）に異常を呈しているか明らかとする必要がある。卵割過程を詳細に観察するために核及び紡錘体を蛍光タンパク質によって可視化し、ライブイメージングする。受精卵は 2 細胞期までは転写活性がないことから、mRNA をマイクロインジェクション法で 1 細胞期胚に導入し可視化を試みる。核の可視化のために H2B-mRFP 融合タンパク質及び紡錘体の可視化のために α -tubulin-EGFP 融合タンパク質をそれぞれ発現する mRNA を *in vitro* で合成し、1 細胞期胚にインジェクションを行う（現有設備を使用）。インジェクションを行った胚は、インキュベーター型共焦点顕微鏡（現有設備）でライブイメージングする。ライブイメージングには、所属する研究室が所有する、GlcAT-1 KO マウス胚だけでなくコンドロイチナーゼ（CSase）消化胚についても検討を行った。さらに、細胞周期によって CS の分布が変化することを想定し、CS 及び複数の CSPG に対する抗体を用い、細胞周期のステージが異なるマウス着床前胚の免疫染色を行った。

4. 研究成果

加齢に伴う卵細胞の CS 鎖総量及び CS 鎖合成酵素遺伝子群発現量の変動を明らかにする。

マウス卵巣では、加齢に伴って CS 鎖総量が減少することが明らかとなった。実験開始当初、卵細胞の CS 総量を免疫蛍光染色によって明らかにしようと考えていたが、蛍光強度による比較は定量的に評価することは困難であった。そこで、少量の卵細胞または着床前胚から直接 CS 二糖を抽出し、CS 総量を比較する系の構築を試みた。構築した CS 解析方法を用いることで、加齢胚と若齢胚の CS 総量を比較することが可能になると考えられた。さらに、加齢マウス卵巣における硫酸化グリコサミノグリカン鎖合成関連遺伝子群の遺伝子発現解析を行ったところ、加齢によって大きく変化する遺伝子としてグリコサミノグリカン鎖の結合領域の生合成に関与する遺伝子で発現量が顕著に減少していることを明らかにしている。今後、加齢卵においても発現量が減少しているか検討する。

MNB 再現モデル GlcAT-1 KO 胚を用いた MNB 形成機序の解明

マイクロインジェクション法によって mRNA (α -tubulin-EGFP, mRFP-H2B) を着床前胚に導入することで、紡錘体及び核を可視

化し、その後の卵割過程のライブイメージングを行った。その結果、一度分裂した CS 欠損胚は細胞分裂の最終段階である割球間の脱離に失敗し、細胞間架橋を分裂後にも保持していた。同じ胚に対し、ライブイメージングを続けると細胞同士が融合し、多核割球を形成した。同様に、CSase 消化胚においても割球間の細胞間架橋の維持及び割球の融合が観察された。以上のことから、CS の減少によって多核割球が形成される原因は割球間の脱離が正常に進行しない可能性が示唆された。さらに、CS 鎖が細胞分裂終期に形成される中央体に限局して存在することを免疫蛍光染色によって明らかにした。中央体に局在する分子は、細胞間の脱離において重要な役割を担っていることが報告されている。以上のことから CS 鎖が、脱離の進行する中央体に分布したことは、CSPG の中央体への分布が細胞分裂終期に重要な役割を担っている可能性が考えられた。また、マウス着床前胚の遺伝子発現を RNA Seq によって網羅的に調べたデータベースを参考に、遺伝子発現量の高いプロテオグリカンを絞り込んだ。着床前期に発現量が高いプロテオグリカンは、当初の予想よりも遙かに少なかった。そこで、複数の CSPG について細胞分裂終期における局在を明らかとするために免疫染色を行ったところ、特定の CSPG が CS と同様に細胞間架橋の中央帯に分布することも明らかにした。このことから、CSPG が中央体において割球が脱離をする際に、何らかの役割を担っていると考えられた。以上の結果をふまえ、候補となった CSPG を発現する mRNA を CS 鎖欠損胚に導入し、現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1) Izumikawa T, Sato B, Mikami T, Tamura J, Igarashi M, Kitagawa H. (2015) GlcUA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl(2-O-phosphate) Is the Preferred Substrate for Chondroitin N-Acetylgalactosaminyltransferase-1.

J. Biol. Chem., vol.290, 5438-5448 doi: 10.1074/jbc.M114.603266

査読有り

2) Koike, T., Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014) Identification of phosphatase that dephosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans *J. Biol. Chem.*, vol.289, 6695-6708 doi: 10.1074/jbc.M113.520536

査読有り

3) Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014) Chondroitin sulfate is indispensable for pluripotency and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Sci. Rep.* 4, 3701; doi: 10.1038/srep03701

査読有り

4) 佐藤伴

若手の最新研究コーナー

「加齢に伴うコンドロイチン硫酸鎖の減少が妊孕性に及ぼす影響」

産科と婦人科 Vol.82 No.3 315-317 2015

査読無し

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 佐藤伴、泉川 友美、北川 裕之

「コンドロイチン硫酸はマウス ES 細胞の分化に必須である」

第 33 回日本糖質学会年会 ワークショップ

「ES/iPS 細胞と糖鎖」名古屋 2014 8 月
招待講演

2) 佐藤伴、泉川 友美、北川 裕之

「マウス胚性幹細胞におけるコンドロイチン硫酸の機能解析」

第 86 回日本生化学会 名古屋 2013 9 月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 伴 (SATO BAN)

神戸薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：90443126

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし