

令和元年6月11日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07783

研究課題名(和文) 加齢に伴う妊娠機構破綻の分子機序：インフラマソーム機構の関与の可能性

研究課題名(英文) Molecular mechanism of pregnancy failure with aging: possible role of inflammasome

研究代表者

白砂 孔明 (SHIRASUNA, Koumei)

東京農業大学・農学部・准教授

研究者番号：20552780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、加齢に伴い卵管・子宮機能の低下や過剰な炎症状態が引き起こされることで、妊娠率の低下につながるのではないかと仮説を立て、ウシをモデルとして検証した。次世代シーケンサーの解析から、老齢由来の卵管細胞は若齢由来の卵管細胞に比べて炎症関連遺伝子群(IL-1、S100Aなど)の発現が高かった。老化誘導候補因子は卵管細胞の炎症や受精・胚発生の異常を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う過剰な老化因子の蓄積が子宮・卵管細胞の慢性炎症を引き起こした。また、老化誘導候補因子が細胞の機能異常や発生異常を引き起こすことが分かった。以上から、妊娠に重要な卵管・子宮は加齢に伴い機能異常が起きることが判明し、その機序の一端を明らかにできたことから、これらの成果が老化制御法や治療法の開発に繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that the decrease in pregnancy rate might be caused by the fall of the oviduct and uterine function and the excessive inflammatory state with aging, and the cow was verified as a model. From analysis of next-generation sequencers, old-derived oviduct cells had higher expression of inflammation-related gene groups (IL-1, S100A, etc.) than younger-derived oviduct cells. Aging induction candidate factors has been shown to induce inflammation of oviduct cells and abnormalities of fertilization and embryogenesis.

研究分野：生殖生理学

キーワード：加齢 妊娠 卵管 子宮 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の社会情勢やライフスタイルの変化に伴い、30代後半で挙児を希望する女性が増加し、出産年齢の高齢化が進んでいる。高齢妊娠では妊娠高血圧腎症・早産などのリスクが高まる。母体の加齢で卵子数が減少するだけでなく、卵子内の活性酸素種 (ROS) の蓄積・ミトコンドリアの機能異常・異常受精の増加など複合的原因で卵子の質が低下し、加齢に伴い妊孕性が急激に低下する深刻な状況になる。研究者らは、妊娠成立には卵子の質的改善に加えて母体環境の整備が重要であり、母体加齢によってその環境が破綻している可能性を考えている。

妊娠は“半異物”である胎児を許容する自然免疫寛容と考えられ、母体の免疫系と炎症が関与する。正常な妊娠状態では炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスが適切に制御され、子宮内ではマクロファージ・NK細胞が集積して着床促進に働く。一方、老化個体では炎症性サイトカイン産生や免疫細胞が活性化され、老化に關与する Advanced glycation end-products (AGE: 糖化最終生成物) などが蓄積し、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の罹患率が増加することが良く理解されている。以上から、母体加齢により妊娠免疫応答や子宮環境の破綻が起き、加齢に伴う妊孕性低下や妊娠機能異常が惹起されると考えた。

2. 研究の目的

加齢に伴う過剰な老化因子の蓄積が子宮・卵管細胞の慢性炎症を引き起こし、妊娠機能が破綻すると仮説を立てた。本研究では、妊娠に重要な卵管・子宮細胞における炎症惹起機序と制御法を検証する。加齢に伴う妊娠機能破綻における炎症機構の役割を解明し、治療法開発への展望を得る。

3. 研究の方法

卵管や子宮は、卵子および精子の輸送、卵子と精子の受精の場、受精卵の初期発生、着床および胎児形成の場として妊娠に有用な“器官”である。本研究では、加齢に伴い卵管・子宮機能の低下や過剰な炎症状態が引き起こされることで、妊娠率の低下につながるのではないかと仮説を立て、ウシをモデルとして検証した。屠畜場由来の若齢 (50 か月齢未満) および老齢 (120 か月齢以上) ウシ由来の卵管および子宮細胞を使用し、次世代シーケンサーを用いて老化に伴う遺伝子発現群の変化を網羅的に解析した。また、候補老化因子の炎症誘導機構を検証した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーの解析から、老齢由来の卵管細胞は若齢由来の卵管細胞に比べてコラーゲン合成遺伝子群の発現が低く、炎症関連遺伝子群 (IL-1、TNF、MMP-9、EDN1 など) の発現が高かった。また、若齢ウシ由来の卵管細胞と比較して老齢ウシ由来の卵管細胞は、絨毛の運動率・細胞増殖率が低下し、炎症性サイトカイン産生・活性酸素量 (ROS)・細胞硬化の指標である F-actin 量が増加した。以上から、老齢由来の卵管細胞は細胞運動・増殖機能が低下することに加え、炎症状態に陥りやすいことが考えられた。

(2) 炎症誘導物質として遊離脂肪酸の一種であるパルミチン酸による影響を検討した。パルミチン酸を卵管細胞に添加すると、アポトーシス誘導因子である Caspase-3 遺伝子発現の増加およびその活性化が誘導された結果、細胞死が増加した。また、パルミチン酸は

受容体 TLR4 を介して細胞内の活性酸素を増加し、転写因子 NF- κ B を介して炎症性サイトカイン産生を誘導することが明らかになった。

(3) 次世代シーケンサーを用い、老化に伴う遺伝子発現群の変化を網羅的に解析した結果、S100A タンパク質ファミリーである S100A8 および S100A9 の遺伝子発現が老齢区の卵管上皮細胞で高く発現することが分かった。S100A8 および S100A9 を添加すると、添加濃度依存的に卵管上皮細胞からの IL-8 分泌が有意に増加した。IL-8 分泌の結果と同様に、S100A8 および S100A9 添加によって IL-8 mRNA 発現が増加した。また、老齢区の卵管上皮細胞で発現が高かった IL-1 および IL-1 mRNA 発現についても S100A8 および S100A9 処置によって増加した。細胞間マトリックスの主要因子であるコラーゲンを合成する代表的な遺伝子 COL1A1 mRNA 発現は、S100A8 および S100A9 処置によって有意に低下した。

(4) 加齢ウシ卵管細胞において炎症関連因子 S100A9 が上昇することを見出したことから、機能解析を行った。その結果、S100A9 を処理すると精子生存性が低下する、体外受精には影響しない、初期胚発生中に細胞内小胞体ストレスを増加させることで発生が停止する、卵管上皮細胞の炎症を惹起することなど、様々な影響を及ぼすことが判明した。

(5) 子宮は受精卵の着床、胎盤形成および胎児発生に重要な器官である。屠畜場由来の若齢および老齢ウシ由来の子宮内膜細胞を使用し、次世代シーケンサーを用い、老化に伴う遺伝子発現群の変化を網羅的に解析した。その結果、老齢由来の子宮内膜細胞は若齢由来の細胞に比べてインターフェロンシグナルや炎症関連遺伝子発現が高いことが分かった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

Hori K, Matsuyama S, Nakamura S, Iwata H, Kuwayama T, Miyamoto A, Shirasuna K. Age-related changes in the bovine corpus luteum function and progesterone secretion. *Reproduction in Domestic Animals* 2019; 54: 23-30 査読あり
doi: 10.1111/rda.13303

Shirasuna K, Iwata H. Effect of aging on the female reproductive function. *Contraception and Reproductive Medicine* 2017; 2: 23 査読あり
doi: 10.1186/s40834-017-0050-9

Tanikawa N, Seno K, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Interferon tau regulates cytokine production and cellular function in human trophoblast cell line. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2017; 37: 456-466 査読あり
doi: 10.1089/jir.2017.0057

Ohtsu A, Tanaka H, Seno K, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Palmitic acid stimulates interleukin-8 via the TLR4/NF- κ B/ROS pathway and induces mitochondrial dysfunction in bovine

oviduct epithelial cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 2017; 77 査読あり

doi: 10.1111/aji.12642

Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Age-associated mRNA expression changes in bovine endometrial cells in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2017; 15: 63 査読あり

doi: 10.1186/s12958-017-0284-z

Tanaka H, Ohtsu A, Shiratsuki S, Kawahara-Miki R, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Age-dependent changes in inflammation and extracellular matrix in bovine oviduct epithelial cells during post-ovulatory phase. *Molecular Reproduction and Development* 2016; 83: 815-826 査読あり

doi: 10.1002/mrd.22693

〔学会発表〕(計6件)

中村 悠稀, 市川 遥翔, 水野 佳穂, 岩田 尚孝, 桑山 岳人, 白砂 孔明. 加齢がウシ卵管上皮細胞の細胞老化や加齢性炎症に及ぼす影響. 第110回日本繁殖生物学会. 2018

鬼沢 優里, 江口 空, 舟島 なつみ, 作本 亮介, 坂上 信忠, 岩田 尚孝, 桑山 岳人, 白砂 孔明. ウシ末梢血多核球と単核球におけるIFN γ 応答性と作用の比較検討. 第110回日本繁殖生物学会. 2018

江口 空, 鬼沢 優里, 舟島 なつみ, 宗像 祥久, 作本 亮介, 坂上 信忠, 岩田 尚孝, 桑山 岳人, 白砂 孔明. ウシ脾臓細胞におけるインターフェロンの免疫細胞分化誘導の可能性の検討. 第110回日本繁殖生物学会. 2018

大津 彩華, 田中 葉月, 白築 章吾, 岩田 尚孝, 桑山 岳人, 白砂 孔明. パルミチン酸はウシ卵管上皮細胞の炎症応答を惹起する. 第109回日本繁殖生物学会. 2017

Shirasuna K, Tanaka H, Ohtsu A, Nakamura Y, Kawahara-Miki R, Iwata H, Kuwayama T. Inflammatory-related factors are activated depending on aging in bovine oviduct epithelial cells. 4th *World Congress of Reproductive Biology*. 2017

Hori K, Matsuyama S, Nakamura S, Naito A, Matsushita M, Arihara W, Kawahara H, Iwata H, Kuwayama T, Miyamoto A Shirasuna K. Effect of aging on the corpus luteum function in beef and dairy cows. 4th *World Congress of Reproductive Biology*. 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
HP アドレス

<http://hansyokuken.wix.com/hansyokuken>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩田 尚孝
ローマ字氏名：IWATA, Hisataka
所属研究機関名：東京農業大学
部局名：農学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：50385499

研究分担者氏名：桑山 岳人
ローマ字氏名：KUWAYAMA, Takehito
所属研究機関名：東京農業大学
部局名：農学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：40215124

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。