

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16790

研究課題名(和文)加齢卵克服のための新たな戦略：小胞体ストレス制御の生殖補助医療への応用

研究課題名(英文)Application of the regulation of endoplasmic reticulum stress to assisted reproductive technology

研究代表者

竹原 功 (Takehara, Isao)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80642496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴って卵の質が低下することが言われている。本研究により、加齢卵は小胞体ストレスに強く暴露されていることがわかった。一方で小胞体ストレスを制御するSalubrialという薬剤を使用することにより、加齢卵の細胞死を抑制することで胚の発育状況を改善させることができた。この結果を応用することで、小胞体ストレスをターゲットとした卵の質を改善する新しい治療法に利用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

高齢女性の不妊治療の治療成績を改善させる治療は全く確立していないのが現状である。今回我々は、小胞体ストレス応答という生体内においてタンパク質の品質を維持する機構が過剰にはたらいってしまうことが卵の加齢による質の低下に関与していることを初めて明らかとした。さらに小胞体ストレス制御薬を使用することで治療成績が改善することをマウスを用いて証明した。この成果により、小胞体ストレス制御が難治性の高齢不妊の治療法に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The age-associated decline in female fertility is largely attributable to a decrease in oocyte quality caused by ovarian aging. In the present study, endoplasmic reticulum stress was strongly associated with aging of post-ovulatory aged mouse oocytes. Salubrial, an inhibitor of the ER stress-related PERK pathway, significantly improved embryo development of aged mouse oocytes through suppression of blastomeres' apoptosis. Based on our findings, we propose targeting, ER stress regulation as a new therapeutic strategy to improve oocyte quality.

研究分野：生殖医学

キーワード：小胞体ストレス 加齢卵 胚盤胞 胚発育 妊娠率

1. 研究開始当初の背景

2015年、日本の生殖補助医療対象者のピーク年齢は40歳であり、治療周期が年々、高齢化していた。高齢女性では妊娠率と生産率の低下、流産率の上昇がみられ、治療成績が著しく低下するが、若い女性のドナー卵を使用した場合には年齢による影響は認められなかった(ART_2011_National_Summary_Report, USA)。このことから高齢女性の治療成績の低下は加齢による卵子自体の質低下が要因と考えられていた。しかし現在、加齢による卵の質低下を改善する治療は全くなく、高齢女性の治療成績の改善は喫緊の課題であった。

これまで、我々は加齢卵の質の低下には酸化ストレスが関与していることを明らかとし報告していた。一方、様々な加齢関連疾患に小胞体ストレスが関与していることが数多く報告されており、加齢卵の質の低下に関与しているのではないかと考えられた。また、酸化ストレスが小胞体ストレスを惹起することも報告されており、これらのことから加齢卵の質の低下には小胞体ストレスが関与しているのではないかと考えられた。さらに、他の疾患同様、小胞体ストレスを標的とした治療によって加齢卵の胚発育が改善するのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 加齢マウスモデルを用いて、加齢による卵の質の低下に小胞体ストレスが関与しているかを明らかにする。

(2) 加齢卵に小胞体ストレス制御薬を使用して、胚発育が改善するかを検討し、その胚をマウスに移植し、治療成績を改善させることが可能かを検討する。

3. 研究の方法

排卵後加齢卵モデルとして、過排卵処理したマウスに human chorionic gonadotropin (hCG) を投与してから 14 時間または 20 時間おいて採卵して得た卵子をそれぞれ新鮮卵、加齢卵と定義した。

(1) 新鮮卵・加齢卵・新鮮卵に小胞体ストレス誘導薬を処理したものを準備し、それぞれの胚発育状況、Western blotting による小胞体ストレスマーカーの発現強度を比較した。さらにそれぞれを胚盤胞まで発育させ、免疫染色により死細胞率を比較した。

(2) 小胞体ストレス制御薬として、salubrinal という物質を使用した。salubrinal は小胞体ストレス応答のうち、PERK 経路において eIF2 の脱リン酸化を抑制する作用があり、小胞体ストレスを制御する薬剤である。加齢卵と salubrinal 処理した加齢卵を用いて、それぞれの胚発育と Western blotting による小胞体ストレスマーカーの発現強度を比較した。またそれぞれを胚盤胞まで発育させ、免疫染色により死細胞率を比較した。さらに、それぞれの胚盤胞を偽妊娠マウスに胚移植し、妊娠率、生産率が改善するかを検討した。

4. 研究成果

(1) 加齢卵は小胞体ストレス誘導卵と同様に、新鮮卵に比較して有意に受精率が低下し、その後の胚発育が悪化した。また、胚盤胞における死細胞率を比較すると、加齢卵では小胞体ストレ

ス誘導卵と同様に、新鮮卵に比較して有意に死細胞率が上昇しており、小胞体ストレス応答によりアポトーシスに誘導されていたことが示唆された。また、加齢卵では小胞体ストレスマーカーである GRP78 の発現が有意に強かった (図 1)。これらのことより加齢卵は小胞体ストレスに暴露されており、卵の質が低下している可能性が示唆された。

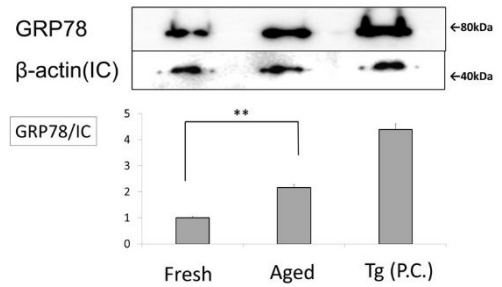
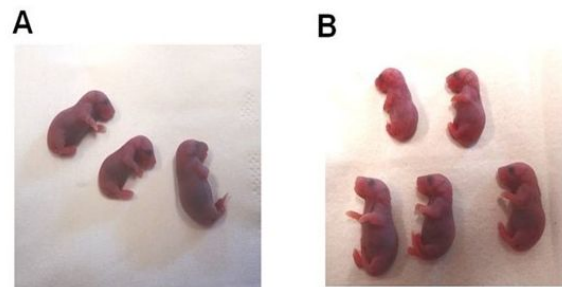


図 1. 新鮮卵、加齢卵における GRP78 の発現の比較 Fresh:新鮮卵, Aged:加齢卵

(2) 加齢卵に salubrinal 処理をしたところ、発育不良胚の指標となる fragmentation を発現した胚は有意

に減少し、胚発育においては 4 細胞以降の胚の到達率が有意に改善した。また胚盤胞まで到達した加齢卵と salubrinal 処理した加齢卵を比較したところ、salubrinal 処理した加齢卵では死細胞率が有意に減少しており、小胞体ストレス応答が抑制されたことによりアポトーシスに誘導された細胞が減少したことが示唆された。さらに、加齢卵に salubrinal 処理してから 4 時間経過すると小胞体ストレスマーカーである GRP78 の発現が減弱し、PERK 経路のリン酸化 eIF2 の発現が増強していた。このことから salubrinal はたしかに PERK 経路の下流において eIF2 の脱リン酸化を抑制して小胞体ストレスを制御することで胚発育を改善させたことが示唆された。

また、加齢卵および salubrinal 処理した加齢卵からそれぞれ得られた胚盤胞を偽妊娠マウスに胚移植したところ、salubrinal 処理した加齢卵の群で妊娠率が有意に上昇し、生産率は統計学的な差は得られなかったものの改善傾向がみられた。両群で産仔の体重に差が無く、特記すべき外表奇形を認めなかった。



C

	Maternal mouse	Transferred embryos	Pregnancy	Live births	Birth weight (g)
Control group	Mouse 1	8	1	1	1.30
	Mouse 2	8	3	3	1.33 ± 0.24
	Total	16	4 (25%)	4 (25%)	1.24 ± 0.19
Sal treated group	Mouse 3	8	6	5	1.19 ± 0.16
	Mouse 4	8	4	2	1.38 ± 0.22
	Total	16	10 (63%)*	7 (44%)	1.33 ± 0.20

図 2. Salubrinal 処理した卵の胚盤胞移植後の産仔

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takehara Isao, Igarashi Hideki, Kawagoe Jun, Matsuo Koki, Takahashi Kyoko, Nishi Michi, Nagase Satoru	4. 巻 26
2. 論文標題 Impact of endoplasmic reticulum stress on oocyte aging mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 567 ~ 575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molehr/gaaa040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Isao Takehara
2. 発表標題 The regulation of ER stress improved the development of aged oocyte
3. 学会等名 第75回米国生殖医学会議（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Isao Takehara
2. 発表標題 The regulation of endoplasmic reticulum stress improved the development of aged oocytes
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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