

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293363

研究課題名(和文) 卵に対する細胞毒性因子の同定と対処法の開発

研究課題名(英文) Identification of cytotoxic factors for eggs and development of neutralizing drugs

研究代表者

宮戸 健二 (MIYADO, Kenji)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・室長

研究者番号：60324844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究から、ホスファチジルエタノールアミン(PE)の特定の分子種が配偶子融合の調節因子として働くことを明らかになった。さらに、PEは卵に対して非常に強い細胞毒性作用があり、CD9の膜貫通領域に相当するペプチドに中和効果があることを示した。抗リン脂質抗体症候群は自己免疫疾患の1つとされ、血栓症や妊娠合併症以外にも、心臓弁の異常による弁膜症、四肢にみられる網状皮斑、血小板減少、腎障害、神経症状が認められることがあり、これらの症例も含めると患者数は、わが国で20万人に達する。本研究の成果は、不育症例で高頻度に認められる抗リン脂質抗体症候群の発症メカニズムと治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Since CD9 is involved in sperm-egg fusion, this protein may organize membrane architectures. Immunoelectron microscopic analysis revealed that CD9 is incorporated into microexosomes. Since microexosomes have no overt lipid bilayers and seem to be small units, less than 5 nm in diameter, they are structurally different from exosomes. Furthermore, Cd9-deficient eggs could not fuse with sperm, but in the presence of wild-type eggs, 70% of the Cd9-deficient eggs fused with the sperm. Notably, the microexosomes rendered sperm fusion competent with Cd9-deficient eggs, which means that microexosomes, but not the egg microvilli, are essential for sperm-egg fusion. In addition, microexosomes are observed inside the uterus. Taken together, these results indicate that there are two forms of tetraspanin, namely the intercellular transportation-related forms and membrane fusion-related forms.

研究分野：生殖生理学、細胞生物学、脂質生物学

キーワード：卵 受精 膜融合 リン脂質 CD9 マイクロエクソソーム エクソソーム 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

正常な卵形成ばかりでなく、卵の機能維持も次世代が誕生するためには必要不可欠である。そのため、卵に起因するすべての異常は不妊を引き起こし、少子化の傾向を増大させ、最終的には国家の存続にかかわる問題になる。そこで、卵機能異常を引き起こす「原因物質の特定」から「機能低下メカニズムの解明」を行い、さらに「診断法から治療法」を早急に確立する必要がある。様々な細胞毒性物質が存在するが、体を構成する多くの細胞種を障害する物質は、そもそも体内には蓄積されず、体外に排出されるか、死に至ってしまう。そこで特定の細胞にだけ作用する物質、例えば、「卵機能維持に必須な物質が、何らかの原因で細胞毒性物質に変化する」可能性が考えられる。

受精過程に働く様々なタンパク質がこれまで同定されており、卵側の因子として膜融合に関わるタンパク質は研究代表者の宮戸らによって発見された CD9 (Miyado K *et al.*, *Science*, 2000; Miyado K *et al.*, *PNAS*, 2008; Ohnami N *et al.*, *Biol Open*, 2012; Kawano N *et al.*, *Sci Rep*, 2014) と、精子側では IZUMO1 の 2 つのタンパク質が知られている (Inoue N *et al.*, *Nature*, 2005)。最近、IZUMO1 の卵側受容体として JUNO が同定された (Bianchi E *et al.*, *Nature*, 2014)。さらに、受精後の卵活性化には Phospholipase C ζ (PLC ζ) に加えてクエン酸合成酵素の 2 つ精子由来因子 (精子ファクター) を介したカルシウム波の誘起 (カルシウムオシレーション) が重要な役割を果たしていることが最近の我々の研究から明らかになりつつある。クエン酸合成酵素は、ミトコンドリア内のクエン酸回路の最初の酵素であり、クエン酸合成酵素の変異または機能低下は、解糖系の活性化による尿酸産生を亢進させることで、尿酸毒性による細胞の機能停止を引き起こす。このように、通常は卵形成や機能維持に必須な物質が、何らかの原因で細胞毒性物質に変化、または細胞毒性物質の産生に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

急速なライフスタイルの変化は晩婚・晩産化をもたらし、出生率を急速に低下させることで、我が国に超少子化状態を作り出している。これにともない生殖補助医療による診療件数が増加し、出生児が日本全体の出生児数の 3.1% (2011 年の治療にて 32,426 人が出生、日本産科婦人科学会報告) を超え、毎年上昇傾向にある。そこで、社会状況に起因するライフスタイルの変化に対応して、生殖補助医療の質を向上させる必要がある。実現のためには、高齢化にともなう妊孕性低下のメカニズム解明と適切な治療システムの構築をめざした、遺伝子・タンパク質・低分子物質の各レベルで病態、病因解明を行い、エビデンスに基づいた的確な治療システムを築く

ことが必要である。世界的にも、35 歳以上の不妊症夫婦に対しては現在の生殖補助医療では限界があること考えられているものの、わが国では 35 歳以上で挙児を希望する夫婦の割合が多いのが現状である。そこで、配偶子の機能低下が原因と考えられる不妊症をさらに解析し、配偶子の機能を維持・回復させることをめざした新しい診断・治療法を開発する必要がある。

加齢や環境変化にともなって配偶子の機能が低下することが知見として蓄積されている一方、配偶子の機能低下につながる原因物質の特定にはいたっていない。本研究では、各種疾患モデル動物を用いた研究から、従来の研究では到達できなかった配偶子機能を低下させる原因物質の特定をめざす。さらに、配偶子の機能低下は、加齢や環境変化といった後天的な原因ばかりでなく、配偶子の形成過程に起因する可能性も考えられる。そこで、配偶子形成についても疾患モデル動物を用いた解析を行い、可能性の是非を検証することで、新しい知見が得られると考えている。

3. 研究の方法

(1) 配偶子機能異常に関する遺伝子改変 (完全欠損および条件付き欠損) マウスを用いた検討

本研究に用いた遺伝子改変マウスは以下の 8 系統である。

- CD9 欠損マウス¹⁾
- SVS2 欠損マウス²⁾
- β -catenin floxed/floxed マウス
- CSL 欠損マウス
- Jmjd6 欠損マウス
- PLC ζ floxed/floxed マウス
- Tetra [CD3 ϵ , MHC class I (D and K) 遺伝子座、 β 2-microglobulin] 欠損マウス
- Ubb 欠損マウス

配偶子における条件付き遺伝子欠損マウスを、以下の 2 系統のトランスジェニックマウス (Tg) との交配によって作製した。

- ZP3 cre-recombinase Tg マウス
- Protamin cre-recombinase Tg マウス

(2) 配偶子機能の体外受精、体内受精による検討

体外受精については常法に従って受精培地 (TYH 培地) を用いて行い、極体放出および精子と融合した卵の割合を調べた¹⁾。融合精子核の検出には DAPI を用いた。

体内受精については通常の交配の他、精子と精漿成分をシリンジに入れ、マウスの腔栓としてシリコンを用いることで代用した²⁾。

(3) 卵エクソソームの構成成分の解析

CD9 を主成分とする卵エクソソームの脂質成分について薄層クロマトグラフィーおよび質量分析装置を用いて解析を行った。

<倫理面への配慮>

国立成育医療研究センターにおいては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている。実験動物を用いる研究については、動物実験指針に準拠して研究を実施した(承認番号2003-002,2005-003)。ヒト精漿タンパク質の使用について倫理委員会から承認された(女性の生理機能に影響を与える男性由来タンパク質および脂質の探索と作用機序の解明 宮戸健二 受付番号 821)。

4. 研究成果

(1) 配偶子機能異常の原因究明と診断法および治療法の検討

我々の体を構成する組織や臓器は、異なる性質を持った多種類の細胞から構成されている。それらの細胞間では、サイトカイン、ケモカインといった分泌性タンパク質と受容体によるシグナル伝達を介してコミュニケーションが行われていると考えられてきた。一方、最近の研究から、エクソソーム(exosome)と呼ばれる細胞外小胞によっても、細胞間での物質輸送を介したコミュニケーションが行われていることが明らかになってきた。

エクソソームは、様々なタイプの細胞から分泌される直径 50nm~150nm 程度の細胞外小胞である。エクソソームは様々な細胞から分泌されるが、その特徴は産生細胞により異なる。生体では唾液、血液、尿、羊水、悪性腹水等の体液中で観察され、培養細胞からも分泌される。エクソソームには様々なタンパク質や脂質、RNA が含まれており、標的となる細胞に運搬されることによって、その細胞に機能的変化や生理的变化を引き起こす。例えば、感染性病原体や腫瘍に対する免疫応答、細胞や組織の修復、神経伝達といった正常な役割から、病原性タンパク質の運搬にも加担することが報告されている。

最新の研究では、エクソソームに含まれるマイクロ RNA のサブセットが、これらを分泌する腫瘍細胞種によって異なることが明らかになっている。そのため、エクソソームに封入されている RNA 分子は、RNA 分解酵素による分解から保護されるため、体液や細胞培養液から効率的に回収することができる。そのため、エクソソームに含まれるマイクロ RNA は、癌を含む様々な疾患のバイオマーカーとして注目されている。

細胞は、普段はそれほど多くのエクソソームを分泌していないが、外界の温度、栄養状態、酸素供給状態の変化といった細胞周囲の環境変化やストレスが加わると、細胞の生理的状态に変化が起こり、エクソソームの分泌量や質そのものが変わることがわかってき

た。

エクソソームは内包されるタンパク質や核酸をエクソソームの取り込み細胞へと送達することで、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなり、癌の転移や免疫応答など種々の生体内イベントにおけるエクソソームの関与が注目されている。また、それとともに、その産生細胞に由来する特徴を有するエクソソームが、疾患診断のためのバイオマーカーとして期待されている。さらに、エクソソームをドラッグデリバリーシステム(DDS)として利用する試みも検討されている。

エクソソームは、血液などの体液に乗って輸送されるが、特定のエクソソームが到達しやすい臓器・組織があることもわかってきており、輸送様式には何らかの特異性があると考えられている。例えば、がん細胞は転移先の細胞へ到達しやすい輸送様式を持っていることが示されており、その一因としてエクソソームの膜に局在するタンパク質による特異性の決定が考えられる。

一方、我々の研究から、通常のエクソソームとは異なる構造をもった膜構造体(マイクロエクソソーム)が卵および子宮内膜から分泌されることが明らかになった。マイクロエクソソームの役割について、配偶子融合、子宮内膜の再生を中心にして解析を行った。

細胞障害性物質としては様々な物質が同定されている。我々は、受精のメカニズムの分子レベルでの解析を通じて、タンパク質だけでなく、脂質やカルシウムもまた重要な因子であることを明らかにしてきた。そうした受精を調節する物質の中にも細胞毒性因子が潜んでおり、何らかのメカニズムの破綻によって細胞毒性物質への変化する可能性があることを示すことができた。最近の我々の研究から、CD9、エクソソーム、さらにホスファチジルエタノールアミン(PE)の特定の分子種が配偶子融合の調節因子として働くことを明らかになった。PEにたどり着いたことで、膜融合機構の解明および膜融合の人工的な制御へ道を開いただけでなく、卵への主要な細胞毒性物質としてPEに着目する手がかりとなった。これまでの研究から、PEの特定の分子種に膜融合促進活性があることがわかった。PEは卵に対して非常に強い細胞毒性作用があり、PE毒性に対して、CD9の膜貫通領域に相当するペプチドに中和効果があることを示した。

抗リン脂質抗体症候群は自己免疫疾患の1つとされ、血中に抗リン脂質抗体(抗PE抗体も含まれる)とよばれる自己抗体が存在することで、さまざまな部位の血栓症から習慣流産などの妊娠合併症をきたす疾患であ

る。抗リン脂質抗体症候群は若年で脳梗塞や流産をくりかえす疾患の主要因の一つであり、習慣流産の他にも妊娠合併症として、子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群が挙げられる。血栓症や妊娠合併症以外にも、心臓弁の異常による弁膜症、四肢にみられる網状皮斑、血小板減少、腎障害、神経症状が認められることがあり、これらの症例も含めると抗リン脂質抗体症候群の患者数は、わが国で20万人に達する。また、まれに多臓器の血栓症による臓器障害をきたし、急激な経過をとる致死率が高い劇症型抗リン脂質抗体症候群に至る症例もある。本研究の成果は、不育症例で高頻度に認められる抗PE抗体による抗リン脂質抗体症候群の発症メカニズムと治療法の開発につながる可能性がある。

さらに、卵だけでなく顆粒膜細胞への細胞毒性物質の探索を行うため、不妊患者由来の顆粒膜細胞と、顆粒膜細胞由来腫瘍細胞株KGN細胞を用いて検討を行った。その結果、不妊症患者由来の顆粒膜細胞ではオートファジー関連タンパク質LC3の発現増強とゲノムDNAの断片化が連動して起こっていることがわかった。さらに、KGN細胞を用いた検討から、糖類（主にグルコース）が顆粒膜細胞のリソソーム数の激増を誘導する可能性が出てきた。

(2) 生殖および受精制御因子の神経系における役割の解明（生殖系と神経系の協調機構）

受精に関わるタンパク質は神経系や免疫系の調節因子としても働くという知見が、今までのわれわれの研究から徐々に得られてきた。生殖系の制御には様々な局面で神経系が関わっていることから、その逆の制御機構として、生殖関連因子による神経系の機能制御機構が存在する可能性が考えられる。現に、配偶子融合を制御するCD9欠損マウスでは、ミエリン鞘が巻き戻され、ドーパミン系の神経回路に異常を示すことがわかっている。

クエン酸合成酵素（CS）は、ミトコンドリアの解糖系の律速段階の酵素である。一方、両生類では受精後の卵活性化因子として働くことが報告されている。マウス精子でもCSは発現しており、ブタCSタンパク質およびマウスCS mRNAをマウス卵子にインジェクションすることで、受精後のカルシウム波の規則的な誘導（カルシウムオシレーション）に極めて類似したカルシウム上昇が起こることがわかった。マウスにはCSと相同で精巣において顕著に発現が認められるCS-like（CSL）遺伝子が存在していることから、CSL遺伝子欠損マウスを作製して解析を行った。その結果、生殖における表現型としては、精巣が野生型に比べて小さく、雄が繁殖行動を

行うまでに時間がかかることから発達障害の可能性が考えられた。しかしながら、産仔数は野生型と同等であった。ただし予想に反して、毛色は野生型C57BL/6マウスの黒色とは異なり、雌雄共にグレーであった。さらに、LacZ染色によってCSLの発現部位を調べたところ、毛根の他に小脳で顕著な発現が認められた。

解析の結果、CSL欠損マウスではメラノサイトが成熟していないことと、精子の先体反応が起こりにくいことが明らかになった。どちらも細胞の成熟ということでは共通していた。メラノサイトと精子の成熟過程にCSLを介した共通のメカニズムが関わっている可能性がある。

(3) 精子ファクターによる卵活性化機構の解明

受精後の卵活性化因子（精子ファクター）の本命としてホスホリパーゼCzeta（PLCzeta）が知られているものの、遺伝子改変マウス解析は報告されていない。そこで、PLCzeta遺伝子を精巣で特異的に破壊したマウスを作製し、解析を行った。今までの結果として、ヘテロ欠損雄マウスがすでに完全不妊であったものの、相同組換えを起こしているはずのターゲティングベクターの位置が部分的に予想とは異なっており、PLCzetaの変異体ができている可能性と、全く異なる遺伝子が破壊されている可能性が考えられた。ベクターの挿入領域を次世代シーケンサーによって解析した結果、ドミナントネガティブ型のPLCzetaが発現している可能性が高くなった。そこで、変異型PLCzetaのクローニングを行った。この変異型PLCzetaはPLCファミリーの活性を広く阻害する可能性が高い。

またこれまでの解析から、雄性不妊の原因として、精子形成過程の後期で異常になっており、精子の代わりに円形細胞が精巣上体に蓄積することがわかった。ヘテロ欠損マウスでは円形精子に混ざって、極少数の精子が形成されたが、この精子は生体内でも生体外でも受精能をもたなかった。さらに、ホモ欠損マウスでは、精巣上体に蓄積する細胞はすべて円形細胞となった。

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）

- 〔雑誌論文〕(計22件) 主要論文を記載
1. Miyado K (責任著者), Kang W, Yamatoya K, Hanai M, Nakamura A, Mori T, Miyado M, Kawano N. Exosomes versus microexosomes: Shared components but distinct functions.

- Journal of Plant Research*, in press.
2. Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, Tanaka H, Kondo T, Miyado K, Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, Asahara H. Complementary critical functions of Zfy1 and Zfy2 in mouse spermatogenesis and reproduction. *PLoS Genetics*, 13(1): e1006578 (2017).
 3. Sumiyoshi N, Ishitobi H, Miyaki S, Miyado K, Adachi N, Ochi M. The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models. *Biomed Res*, 37(5): 283-291 (2016).
 4. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(12): 1620-1630 (2016).
 5. Nakamura A, Miyado K (責任著者), Yamatoya K, Kawano N, Umezawa A. Breast milk stimulates growth hormone secretion in infant mice, and phosphorus insufficiency disables this ability and causes dwarfism-like symptoms. *Regenerative Therapy*, 2: 49-56 (2016).
 6. Nakamura A, Miyado K (責任著者), Nasu M, Kono T, Umezawa A. Phosphorus-insufficient maternal milk is associated with ectopic expression of collagen I and female-specific bony changes in infant mouse cartilages. *Regenerative Therapy*. 1: 5-10 (2015).
 7. Ono C, Yoshida M, Kawano N, Miyado K (責任著者), Umezawa A. Staphylococcus epidermidis is involved in a mechanism for female reproduction in mice. *Regenerative Therapy*. 1: 11-17 (2015).
 8. Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Miyado K, Shitara H, Yokota S, Nomura M, Mihara K, Mizushima N, Ishihara N. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr Biol*. 24(20): 2451-8 (2014).
 9. Wakai T, Harada Y, Miyado K, Kono T. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*. 20(11): 1090-100 (2014).
 10. Kawano N, Miyado K (責任著者), Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep*, 4: 4701 (2014).
 11. Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K (責任著者), Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(11): 4145-50 (2014).
- 〔学会発表〕(計 7件)
- 宮戸健二、康宇鎮、齊藤英和、河野菜摘子、卵に対する細胞毒性因子の同定と対処法の開発、ワークショップ3「ライフサイエンスから未来のARTへ」、第34回日本受精着床学会 総会・学術講演会、軽井沢プリンスホテルウエスト、2016年9月16日。
- 河野菜摘子、康宇鎮、吉田薫、吉田学、宮戸健二、精漿タンパク質SVS2欠損マウスから見て来た、精子を殺すメスの免疫機構、ワークショップ「生殖から読み解く哺乳類の生命現象」(オーガナイザー：深見真紀、宮戸健二、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、合同大会、神戸国際会議場、2015年12月1~4日。
- 宮戸健二、卵由来エクソソームによる配偶子融合の制御機構、日本獣医学解剖学会シンポ

ジウム、北里大学獣医学部、2015年9月7～9日

大和屋健二、宮戸健二、河野菜摘子、哺乳類における配偶子融合の分子機構、日本動物学会第86回新潟大会、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、2015年9月17～19日。

宮戸健二、大和屋健二、河野菜摘子、テトラスパニン/エクソソームによる履く融合の制御機構、日本動物学会第86回新潟大会、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、2015年9月17～19日。

Kenji Miyado, Kenji Yamatoya, Natsuko Kawano. Genesis of life: A mechanism of sperm-egg fusion in mammals. シンポジウム”Fusion in Fertilization: Interdisciplinary Collaboration among Plant and Animal Scientists”. 日本植物学会第79回大会、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、2015年9月6～8日。

宮戸健二．受精における副生殖腺の役割、シンポジウム3「受精に関する最近の話題」、日本生殖医学会学術講演会、パシフィコ横浜、2015年4月27～28日。

〔図書〕(計 3件)

井上直和、宮戸健二 精子と卵子の膜融合．受精メカニズム新論争．細胞工学 Vol. 33. No.4, 2014.

Yoshida K, Kawano N, Harada Y, Miyado K. Role of CD9 in sperm-egg fusion and virus-induced cell fusion in mammals. Sexual Reproduction in Animals and Plants, edited by Sawada H, Inoue N, Iwano M, Springer, 2014.

動植物の受精学 – 共通性と多様性 – 澤田均 編，化学同人，2014年

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮戸 健二 (MIYADO, Kenji)
国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・室長
研究者番号：60324844

(2) 研究分担者

河野 菜摘子 (KAWANO, Natsuko)
明治大学・農学部・講師
研究者番号：00451691

(3) 連携研究者

井上 直和 (INOUE, Naokazu)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90125766

(4) 連携研究者

齊藤 英和 (SAITO, Hidekazu)
国立成育医療研究センター・母性医療診断部・医長
研究者番号：90125766

(5) 連携研究者

浜谷 敏生 (HAMATANI, Toshio)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60265882

(6) 連携研究者

宮本 義孝 (MIYAMOTO, Y0shitaka)
国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員
研究者番号：20425705