

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10663

研究課題名(和文) 生殖細胞の質をメンテナンスする：ミトコンドリア品質管理の観点より

研究課題名(英文) Maintenance of germ cell quality via mitochondrial quality control

研究代表者

折坂 誠 (ORISAKA, Makoto)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：80324143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア品質管理システムは、主に精子で重要な役割を担うことが証明された。加齢に伴うミトコンドリア品質管理システムの破綻が、精子で酸化ストレスを誘導し、精子の質を低下させる可能性が推測された。また、そのようにミトコンドリア機能が低下した精子は、卵子と受精後に胚で酸化ストレスを誘導することも明らかになった。一方で、加齢に伴う卵子の質低下に、ミトコンドリア品質管理システムは関与しなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrates that mitochondrial quality control system plays an important role to maintain sperm quality. The failure of the mitochondrial quality control system with aging seems to induce oxidative stress in sperm, resulting poor sperm quality and poor embryo quality. On the contrary, the mitochondrial quality control system is not involved in poor oocyte quality with aging.

研究分野：生殖医学

キーワード：精子 卵子 ミトコンドリア 酸化ストレス 加齢

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは細胞内のエネルギー (ATP) 産生を司る細胞内小器官であり、ミトコンドリアの機能低下は、体細胞のみならず生殖細胞の活性低下に直結する可能性がある。例えば、卵子の加齢変化は核と細胞質においてそれぞれ独立して進行するが、特に卵細胞質の質低下は、加齢に伴うミトコンドリア機能の低下に起因する可能性が推測されている。また、精子は中片部内のミトコンドリアで産生される ATP を原資に前進運動を行うため、ミトコンドリア機能の低下した精子では運動性が著しく減弱することも容易に理解できる。

(2) 細胞質内のミトコンドリアには品質管理システム (mitochondrial quality control; MQC) が存在し、ミトコンドリアの健全性と機能を維持するために重要な役割を担っている。この MQC システムは近年がん領域で特に注目を集めているが、生殖領域における MQC システムの機能や役割は明らかでない。

(3) そこで当該研究者は「加齢などの理由で卵子や精子の質がいったん低下しても、生殖細胞内のミトコンドリア機能を品質管理 (修復・保全) することで細胞質の機能を改善できれば、生殖補助医療 (ART) における胚発生能や妊娠・生産率向上につながるのではないか」と想起し、本研究を立案した

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、生殖細胞の機能を維持するためにミトコンドリア品質管理 MQC が担う役割と、加齢が MQC システムに悪影響を及ぼし卵子や精子の質を低下させる可能性について、ミトコンドリア関連遺伝子改変マウスや加齢マウスモデルを用いて検討することである。

(2) 具体的には、癌抑制遺伝子 p53 誘導性のタンパクである Mitochondria-eating protein (Mieap) が、不良なミトコンドリアを貪食・除去することで細胞質内のミトコンドリアの健全性を維持していることに着目し、生殖細胞における MQC システムの役割と、MQC システムの破綻が及ぼす悪影響を、Mieap ノックアウト (Mieap-KO) マウスと野生型 (WT) マウスの、生殖成績を比較検討することで解明を試みた。

(3) また、加齢に伴い精子や卵子の質が低下する理由について、加齢に伴う細胞内ミトコ

ンドリア機能の低下との関連が推測されている。そこで加齢と生殖細胞におけるミトコンドリア機能の変化について、若年 WT (young WT; Y-WT) マウスと加齢 WT (aged WT; A-WT) マウスの、生殖成績を比較検討することで解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 生殖細胞におけるミトコンドリア品質管理 MQC システムの役割

MQC システムで中心的な役割を担うタンパク Mieap に着目し、Mieap-KO マウスを作成した。Mieap-KO マウスの精巣と精子、Mieap-KO マウスの卵巣と卵子について、形態学的評価を行い、WT マウスと比較検討した。

Mieap-KO マウスと Mieap-KO マウスを継続交配にかけ、体内受精による妊娠能を評価し、WT マウスの継続交配の結果と比較検討した。

Mieap-KO マウスの精子 (Mieap-KO 精子) あるいは WT マウスの精子 (WT 精子) および Mieap-KO マウスの卵子 (Mieap-KO 卵子) あるいは WT マウスの卵子 (WT 卵子) を組み合わせ、体外受精を行い、胚発生率を評価した。胚盤胞に到達した場合は、偽妊娠マウスへ子宮内移植し、着床率・生産率を評価した。

(2) 加齢に伴う生殖細胞の機能変化

加齢 WT (A-WT) マウスの精巣と精子、A-WT マウスの卵巣と卵子について、形態学的評価を行い、若年 WT (Y-WT) マウスと比較検討した。

A-WT マウスの精子 (A-WT 精子) あるいは Y-WT マウスの精子 (Y-WT 精子) および A-WT マウスの卵子 (A-WT 卵子) あるいは Y-WT マウスの卵子 (Y-WT 卵子) を組み合わせ、体外受精を行い、胚発生率を評価した。胚盤胞に到達した場合は、偽妊娠マウスへ子宮内移植し、着床率・生産率を評価した。

(3) MQC システム破綻や加齢が、胚のミトコンドリア酸化ストレスを誘導する可能性

Mieap-KO 精子が、受精後に胚で酸化ストレスを誘導する可能性を検討した。具体的には、Mieap-KO 精子と WT 卵子の体外受精で得られた 2 細胞胚における、ミトコンドリアの酸化ストレスレベルを評価した。

精子の加齢が、受精後に胚で酸化ストレスを誘導する可能性を検討した。具体的には、加齢 WT (A-WT) 精子と WT 卵子の体外受精で得られた 2 細胞胚における、ミトコンドリアの酸化ストレスレベルを評価した。

4. 研究成果

(1) 生殖細胞におけるミトコンドリア品質管理 MQC システムの役割

Mieap-KO 精子は、WT 精子と比較して、運動率が低く奇形率は高かった。Mieap-KO 卵巣と WT 卵巣の卵胞数は同等で、卵巣刺激で得られた卵子数も、WT 卵子と Mieap-KO 卵子で同等だった。

Mieap-KO マウス を継続交配して得られた産仔数は、WT マウス を継続交配した結果と同等だった。

Mieap-KO 精子あるいは WT 精子、および Mieap-KO 卵子あるいは WT 卵子を、組み合わせて体外受精を行った結果は、以下の通りである。

受精率は、WT 精子 + WT 卵子 (76.8% [413/538]) や WT 精子 + Mieap-KO 卵子 (83.7% [144/172]) と比較して、Mieap-KO 精子 + WT 卵子 (41.5% [174/419]) と Mieap-KO 精子 + Mieap-KO 卵子 (29.9% [53/177]) で有意に低かった。

2 細胞胚から 4 細胞胚への到達率は、WT 精子 + WT 卵子 (94.9% [392/413]) や WT 精子 + Mieap-KO 卵子 (96.5% [139/144]) と比較して、Mieap-KO 精子 + WT 卵子 (55.2% [96/174]) と Mieap-KO 精子 + Mieap-KO 卵子 (66.0% [33/53]) で有意に低かった。

胚盤胞移植後の生産率は、WT 精子 + WT 卵子 (17.8% [21/118])、WT 精子 + Mieap-KO 卵子 (18.8% [15/80])、Mieap-KO 精子 + WT 卵子 (23.5% [4/17])、Mieap-KO 精子 + Mieap-KO 卵子 (20.0% [5/25]) と同等だった。

(2) 加齢に伴う生殖細胞の機能変化

A-WT 精子は、Y-WT 精子と比較して、運動率が低く奇形率は高かった。A-WT 卵巣は Y-WT 卵巣と比べて、卵胞数が減少しており、卵巣刺激で得られた卵子数も少なかった。

A-WT 精子あるいは Y-WT 精子、および A-WT 卵子あるいは Y-WT 卵子を、組み合わせて体外受精を行った結果は、以下の通りである。

受精率は、Y-WT 精子 + Y-WT 卵子 (76.8% [413/538]) や Y-WT 精子 + A-WT 卵子 (72.9%

[62/85]) と比較して、A-WT 精子 + Y-WT 卵子 (33.6% [44/131]) と A-WT 精子 + A-WT 卵子 (43.0% [52/121]) で有意に低かった。

2 細胞胚から 4 細胞胚への到達率は、Y-WT 精子 + Y-WT 卵子 (94.9% [392/413])、Y-WT 精子 + A-WT 卵子 (93.5% [58/62])、A-WT 精子 + Y-WT 卵子 (97.7% [43/44])、A-WT 精子 + A-WT 卵子 (98.1% [51/52]) と同等だった。

胚盤胞移植後の生産率は、Y-WT 精子 + Y-WT 卵子 (17.8% [21/118]) や Y-WT 精子 + A-WT 卵子 (20.9% [9/43])、A-WT 精子 + Y-WT 卵子 (8.0% [2/25]) と比較して、A-WT 精子 + A-WT 卵子 (4.8% [2/42]) で有意に低かった。

(3) MQC システム破綻や加齢が、胚のミトコンドリア酸化ストレスを誘導する可能性

2 細胞胚におけるミトコンドリアの酸化ストレスレベルは、Y-WT 精子 + Y-WT 卵子と Mieap-KO 精子 + Y-WT 卵子で同等だった。一方で、Mieap-KO 精子 + A-WT 卵子の 2 細胞胚では、Y-WT 精子 + A-WT 卵子と比較して、ミトコンドリア酸化ストレスレベルが上昇していた。

2 細胞胚におけるミトコンドリアの酸化ストレスレベルは、Y-WT 精子 + Y-WT 卵子と A-WT 精子 + Y-WT 卵子で同等だった。一方で、A-WT 精子 + A-WT 卵子の 2 細胞胚では、Y-WT 精子 + A-WT 卵子と比較して、ミトコンドリア酸化ストレスレベルが上昇していた。

以上の結果より、ミトコンドリア品質管理を司る Mieap は、精子の形態や運動能を保つために必須であることが明らかになった。Mieap-KO 精子を用いた体外受精で、多くの 2 細胞胚が発育停止し、ミトコンドリアの酸化ストレスが上昇していた事実は、Mieap 発現の減弱した精子が胚で酸化ストレスを誘導する可能性を示唆した。一方で、Mieap は卵子の質や胚盤胞の着床に影響しなかった。

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 5 件)

1. Hattori K, Orisaka M, et al. Luteinizing hormone facilitates antral follicular maturation and survival via thecal paracrine signaling in cattle. *Endocrinology*. 159(6):2337-2347. 2018. DOI:10.1210/en.2018-00123

2. Tsuyoshi H, Wong VKW, Han Y, Orisaka M, et

al. Saikosaponin-d, a calcium mobilizing agent, sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by facilitating mitochondrial fission and G2/M arrest. *Oncotarget*.8(59):99825-99840. 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.21076

3. 折坂 誠, 白藤 文, 玉村 千代. 卵胞発育と卵子・顆粒膜細胞・莢膜細胞の相互応答. *臨床婦人科産科*. 70(12):1104-8. 2016.

4. Kong B, Tsuyoshi H, Orisaka M, et al. Mitochondrial dynamics regulating chemoresistance in gynecological cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 1350:1-16. 2015.
DOI:10.1111/nyas.12883.

5. 折坂 誠. 卵胞発育における卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間のクロストーク. シンポジウム 1 (生殖) 卵巣のダイナミックな変化の神秘に迫る - 臨床へのフィードバックを目指して -. *日本産科婦人科学会雑誌*. 67(10):2141-51. 2015.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Orisaka M. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during ovarian follicle growth. The 1th Taiwan-Japan-Korea Joint Conference of OBS/GYN. 2017.3. Taiwan. (International Symposium)

2. Orisaka M. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during early follicular growth. The 8th Japan-Korea ART Conference. 2016.9.3. Yokohama.

3. Orisaka M. Oocyte-Granulosa-Theca Cell Interactions during Early Follicular Growth. BIT's 4th Annual World Congress of Diabetes BIT's 5th Annual World Congress of Endobolism. 2015.11. Taiwan.

4. Orisaka M, et al. Protective effect of dienogest on chemotherapy-induced reduced fertility in female rats. IFFS/JSRM International Meeting 2015. 2015.04. Yokohama.

5. 折坂 誠. 卵胞細胞における卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間のクロストーク. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2015.04. 横浜市. 卵巣のダイナミックな変化の神秘に迫る - 臨床へのフィードバックを目指して - (シンポジウム)

〔図書〕(計 2 件)

1. 折坂 誠, 福田 真, 吉田 好雄. 2. 不妊症の検査・診断 女性因子 卵胞発育モニタリングの実施法. 大道正英, 藤原浩, 亀井良政 (編): 知りたい最新情報がすぐわかる! 不妊・不育症診療パーフェクトガイド. 医学書院. 62-5. 2016.

2. 折坂 誠, 福田 真, 吉田 好雄. 【2. 不妊症の検査・診断】卵胞発育モニタリングで卵胞が見えない場合、どのように対処すればよいですか? *臨床婦人科産科*. 70(4):124-6. 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

折坂 誠 (ORISAKA, Makoto)
福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師
研究者番号: 80324143

(2) 研究分担者

荒川 博文 (ARAKAWA, Hirofumi)
独立行政法人国立がん研究センター
腫瘍生物学分野・分野長
研究者番号: 70313088

(3) 連携研究者

中村 康之 (NAKAMURA Yasuyuki)
独立行政法人国立がん研究センター
腫瘍生物学分野・主任研究員

研究者番号：90569063