

令和元年5月10日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11080

研究課題名(和文) ミトコンドリア品質管理を基盤とした加齢による卵の質の低下に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for the deterioration of egg quality by aging based on mitochondrial quality control

研究代表者

高橋 俊文 (Takahashi, Toshifumi)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：20302292

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)：排卵後加齢卵は新鮮卵と比べ、TFAMの発現量は変化がなかったがミトコンドリアとの共局在が喪失していた。また、排卵後加齢卵は新鮮卵と比べ、オートファジーおよびマイトファジーの活性化が亢進していると考えられた。一方、母体加齢卵では、ミトコンドリア異常形態を呈する卵の出現が確認されたが、TFAMの量的・空間的な変化を確認できなかった。また、排卵後加齢で見られたオートファジーおよびマイトファジーの活性化は母体加齢卵では認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性の加齢による妊孕力低下の原因として、卵の加齢による卵の質の低下が重要である。本研究では、ミトコンドリアの品質管理に着目し卵の質の低下のメカニズムを検討した。本研究では、卵の加齢とオートファジーによる選択的ミトコンドリア分解機構(マイトファジー)の変化を解析し、“卵の質の低下”に対する新しい予防・治療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：Compared with fresh oocytes, post-ovulatory aged oocytes had no change in the expression level of TFAM, but colocalization with TFAM and mitochondria was lost. Also, activation of autophagy and mitophagy might be activated in post-ovulatory aged oocytes compared to those in fresh oocytes. On the other hand, in maternal aged oocytes, the appearance of oocytes exhibiting an abnormal mitochondrial form was confirmed, but quantitative and spatial changes in TFAM could not be approved. Besides, activation of autophagy and mitophagy observed in the post-ovulatory aged oocytes was not found in maternal aged oocytes.

研究分野：生殖生理

キーワード：卵の加齢 ミトコンドリア マイトファジー LC3 Parkin 加齢マウス

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

1. 研究開始当初の背景

女性は35歳以降になると妊娠率が低下し流産率が増加する。これは、加齢による“卵の質の低下”が原因であるが、その分子機構は未だ解明されていない。母体の加齢により、卵のミトコンドリアの形態学的変化、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリアDNA (mtDNA) のコピー数の低下や突然変異の増加などが報告されており、ミトコンドリア機能低下によるATP産生低下が、加齢による“卵の質の低下”の主要な原因と考えられている (Miao et al. Hum Reprod update 2009)。

ミトコンドリアは細胞内最大の活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) の発生源であり、絶えず強い酸化ストレスに曝露されている。このような酸化ストレスに対してミトコンドリア機能を維持するメカニズムとして、抗酸化酵素・物質による ROS 消去機構、mtDNA の量的・機能的維持機構、機能低下 (不良) ミトコンドリアの除去機構が存在する。不良ミトコンドリアが蓄積すると、ROS の産生が増大し、mtDNA のみならず核ゲノムの DNA を損傷する。

ミトコンドリア転写因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) は、mtDNA を取り囲むように存在し酸化ストレスから mtDNA を保護する働きがあり、mtDNA の量的・機能的維持に重要である (Kanki et al. Mol Cell Biol 2004)。近年、不良ミトコンドリアの除去機構として、オートファジーによる選択的ミトコンドリア分解機構である「マイトファジー」が注目されている (Jiang and Mizushima. Cell Res 2014)。TFAM やマイトファジーは、「ミトコンドリアの品質管理」を行い、老化、心不全、がん、パーキンソン病など様々な疾患と関連することが明らかとなった。現在の所、加齢による“卵の質の低下”と「ミトコンドリアの品質管理」に焦点を当てた研究は存在しない。

2. 研究の目的

女性の加齢による妊孕力低下の原因として、卵の加齢による“卵の質の低下”が重要である。“卵の質の低下”は、ミトコンドリア機能低下による ATP 産生低下が一因である。本研究では、「ミトコンドリアの品質管理」に着目し“卵の質の低下”のメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

排卵後加齢卵での研究成果を元に、母体の加齢による卵の加齢について、1) 加齢卵におけるミトコンドリア品質管理機構の変化を検討する。2) 加齢卵における「マイトファジー制御機構の活性化」が“卵の質”を改善可能か検討する。

1. 排卵後加齢卵における「ミトコンドリア品質管理機構」について検討を行う。

- 1) TFAM の量的・機能的変化を検討する。
 - 2) マイトファジーの検出とマイトファジー制御機構の抑制・活性化について検討する。
- ### 2. 母体の加齢による加齢卵 (母体加齢卵) の「ミトコンドリア品質管理機構」の検討を行う。
- 1) TFAM の量的・機能的変化を検討する。
 - 2) マイトファジーの検出とマイトファジー制御機構の抑制・活性化について検討する。
- ### 3. マイトファジー活性化薬による、母体の加齢による“卵の質の低下”の改善が可能か検討する。

4. 研究成果

1. 排卵後加齢卵における「ミトコンドリア品質管理機構」に関する検討

1) 排卵後加齢による TFAM の発現量および発現分布の変化

排卵後加齢卵 (hCG 投与後 20 時間目の卵) と新鮮卵 (hCG 投与後 14 時間目の卵) における、

TFAM の発現量および発現分布を Western blotting 法および免疫蛍光染色法にて検討した。免疫蛍光染色は、ミトコンドリアとの共局在について二重蛍光染色を行い検討した。排卵後加齢卵と新鮮卵における TFAM のタンパク発現量に変化は認めなかった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ミトコンドリアと TFAM の共局在を検討したところ、排卵後加齢卵は新鮮卵と比べミトコンドリアの共局在が低下していた。

2) 排卵後加齢卵におけるミトファジーの検出

オートファジーの分子マーカーである LC3 とミトファジーの分子マーカーである Parkin の発現を免疫蛍光染色にて検討した。排卵後加齢卵では新鮮卵と比べ LC3 陽性数 (LC3 発現ドット数) が増加していた。また、同様に排卵後加齢卵では新鮮卵と比べ Parkin の発現が多い傾向が認められた。

3) 卵におけるミトコンドリア脱共役剤におけるミトファジーの活性化の検討

ミトコンドリア脱共役剤である CCCP によりオートファジーおよびミトファジーが活性化するか、新鮮卵を用いて検討した。オートファジーおよびミトファジーの検出は LC3 および Parkin の発現を免疫蛍光染色法にて行った。CCCP 投与した新鮮卵はコントロール卵と比べ、LC3 および Parkin の発現が増加傾向を示した。

2. 母体の加齢による加齢卵 (母体加齢卵) の「ミトコンドリア品質管理機構」の検討

1) 母体加齢による TFAM の発現量および発現分布の変化

母体加齢卵は、妊娠 52 週以上のマウスから採取した卵とした。若年 6 - 8 週齢マウスから採取した卵をコントロールとした。母体加齢卵は排卵数が少なく Western blotting 法による蛋白発現量の検討が出来なかった。免疫蛍光染色法を行いミトコンドリアとの共局在を検討したところ、ミトコンドリアの凝集などの形態異常が母体加齢卵で多く認められたが、TFAM との共局在の有無を検討するには不十分な結果であった。

2) 母体加齢によるミトファジーの検出

母体加齢卵を用いて、オートファジーとミトファジーの検出を免疫蛍光染色法にて行った。母体加齢マウスの排卵後 14 時間目の卵における LC3 と Parkin の発現は、若年マウス (コントロール) 卵と比べ有意な差が認められなかった。

< 結果のまとめ >

排卵後加齢卵は新鮮卵と比べ、TFAM の発現量は変化がなかったがミトコンドリアとの共局在が喪失していた。また、排卵後加齢卵は新鮮卵と比べ、オートファジーおよびミトファジーの活性化が亢進していると考えられた。一方、母体加齢卵では、ミトコンドリア異常形態を呈する卵の出現が確認されたが、TFAM の量的・空間的な変化を確認できなかった。また、排卵後加齢で見られたオートファジーおよびミトファジーの活性化は母体加齢卵では認められなかった。

< 結論 >

排卵後加齢卵における胚発育悪化の原因として、ミトコンドリアの急速な機能低下による細胞質内でのエネルギー不足が一因である可能性が示唆された。しかしながら、母体加齢では同様の現象を認めなかったことから、異なる機序による胚発育悪化が起きている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Takehara I, Takahashi T, Ota K, Ohta N, Mizunuma H, Nagase S. Trichorionic triamniotic triplets after single embryo transfer: A case series and literature review. IJWHR in press

2. Takahashi T, Hasegawa A, Igarashi H, Amita M, Matsukawa J, Takehara I, Suzuki S, Nagase S. Prognostic factors for patients undergoing vitrified-warmed human embryo transfer cycles: a retrospective cohort study. *Hum Fertil (Camb)*. 2017 20(2):140-146.
3. Matsumura S, Ohta T, Yamanouchi K, Liu Z, Sudo T, Kojimahara T, Seino M, Narumi M, Tsutsumi S, Takahashi T, Takahashi K, Kurachi H, Nagase S. Activation of estrogen receptor alpha by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2017 18(9):730-739.
4. Amita M, Takahashi T, Igarashi H, Nagase S. Clomiphene citrate down-regulates estrogen receptor- α through the ubiquitin-proteasome pathway in a human endometrial cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;428:142-7.
5. Kurosawa H, Utsunomiya H, Shiga N, Takahashi A, Ihara M, Ishibashi M, Nishimoto M, Watanabe Z, Abe H, Kumagai J, Terada Y, Igarashi H, Takahashi T, Fukui A, Suganuma R, Tachibana M, Yaegashi N. Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption. *Hum Reprod*. 2016;31(10):2321-2330.
6. Igarashi H, Takahashi T, Abe H, Nakano H, Nakajima O, Nagase S. Poor embryo development in post-ovulatory in vivo-aged mouse oocytes is associated with mitochondrial dysfunction, but mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation. *Hum Reprod*. 2016;31(10):2331-2338.

〔学会発表〕(計 19 件)

【国内学会】

1. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 網田光善, 松川 淳, 鈴木聡子, 竹原 功, 永瀬 智: 調節卵巣刺激周期における empty follicle に対する予測因子の検討. 第 20 回日本生殖内分泌学会, 神戸; 2016 年 1 月
2. Kurosawa H, Ytsunomiya H, Shiga N, Watanabe Z, Tachibana M, Terada Y, Kumagai J, Igarashi H, Takahashi T, Fukui A, Suganuma R, Yaegashi N: A trial to predict blastocyst formation by the respiratory activity of human embryos. 第 68 回日本産科婦人科学会, 東京; 2016 年 4 月
3. 鈴木聡子, 高橋俊文, 竹原 功, 松川 淳, 網田光善, 五十嵐秀樹, 永瀬 智: ART 治療における採卵不成功周期の予測因子—日本産科婦人科学会 ART オンライン登録データを用いた後方視的検討—. 第 68 回日本産科婦人科学会, 東京; 2016 年 4 月
4. 高橋俊文, 寺田幸広, 五十嵐英樹, 永瀬 智, 福井敦史, 水沼英樹, 熊谷 仁, 本田達也, 杉山 徹, 渡邊 善, 志賀尚美, 八重樫伸生, 鈴木 聡, 藤森敬也(東北生殖医療研究会): 卵巣チョコレート嚢胞保存手術後の再発に関するリスク因子の検討. 第 68 回日本産科婦人科学会, 東京; 2016 年 4 月
5. 五十嵐秀樹, 高橋俊文, 阿部宏之, 中野 博, 中島 修, 永瀬 智: マウス排卵後加齢卵への体細胞ミトコンドリア移植が卵の酸素消費量と胚発生に及ぼす影響. 第 57 回日本卵子学会, 新潟; 2016 年 5 月
6. 黒澤大樹, 阿部宏之, 寺田幸弘, 熊谷 仁, 永瀬 智, 高橋俊文, 菅沼亮太, 宇都宮裕貴, 八重樫伸生: チップセンサーを用いた新たな受精卵呼吸測定装置の開発・臨床応用を目指して. 第 34 回日本受精着床学会, 軽井沢; 2016 年 9 月
7. 松川 淳, 高橋俊文, 竹原 功, 鈴木聡子, 松尾幸城, 川越 淳, 五十嵐秀樹, 永瀬 智: 人工授精治療は何回が妥当か - 累積妊娠率からみた検討 -. 第 61 回日本生殖医学会, 横浜;

2016年11月

8. 竹原 功, 高橋俊文, 鈴木聡子, 松川 淳, 松尾幸城, 川越 淳, 五十嵐秀樹, 永瀬 智: 単一胚移植後に生じる性別の異なる双胎妊娠 - 頻度と発生に関連する因子 - . 第61回日本生殖医学会, 横浜; 2016年11月
9. 鈴木聡子, 高橋俊文, 竹原 功, 松川 淳, 松尾幸城, 川越 淳, 五十嵐秀樹, 永瀬 智: ART治療における採卵不成功周期の予測因子 - 日本産科婦人科学会 ART オンライン登録データを用いた後方視的検討 - . 第61回日本生殖医学会, 横浜; 2016年11月
10. 菅沼亮太, 鈴木 聡, 奥津美穂, 大原美希, 小宮ひろみ, 高橋俊文, 水沼英樹, 柳田 薫, 藤森敬也: 高度乏精子無力症症例に対する精巣精子を用いた卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の有用性に関する検討. 第61回日本生殖医学会, 横浜; 2016年11月
11. 高橋俊文, 大原美希, 鈴木聡, 山口明子, 菅沼亮太, 小宮ひろみ, 藤森敬也, 水沼英樹: 原発性無月経を呈した多嚢胞性卵巣症候群の3例. 第21回日本生殖内分泌学会, 大阪; 2017年1月
12. 高橋俊文, 鈴木聡, 菅沼亮太, 小宮ひろみ, 藤森敬也, 水沼英樹: 原発無月経を呈した多嚢胞性卵巣症候群の3例. 第69回日本産科婦人科学会, 広島, 2017年4月
13. 高橋俊文, 大原美希, 鈴木聡, 山口明子, 菅沼亮太, 小宮ひろみ, 藤森敬也, 水沼英樹: 原発性無月経を呈した多嚢胞性卵巣症候群の臨床的特徴について. 第62回日本生殖医学会, 下関; 2017年11月
14. 高橋俊文, 菅沼亮太, 小宮ひろみ, 藤森敬也, 水沼英樹: 原発性無月経を呈した多嚢胞性卵巣症候群4症例. 第91回日本内分泌学会, 宮崎; 2018年4月
15. Takahashi T, Suganuma R, Fujimori K, Mizunuma H. Incidence and predictive factors for complete fertilization failure in in vitro fertilization treatment cycles: a retrospective cohort study using assisted reproductive technology registry of Japan. 第70回日本産科婦人科学会, 仙台; 2018年5月
16. 高橋俊文, 菅沼亮太, 太田邦明, 藤森敬也, 水沼英樹: 体外受精治療周期における完全受精障害の頻度とリスク因子の検討 - ART登録を用いた後ろ向きコホート研究 - . 第63回日本生殖医学会, 旭川; 2018年9月

【国際学会】

17. Amita M, Takahashi T, Saito H: Ubiquitin-proteasome pathway is involved in the decrease of estrogen receptor- α by clomiphene citrate in human endometrial cells. ASRM 2016 Scientific Congress & Expo, Salt Lake City, USA; 15-19 Oct 2016
18. Igarashi H, Takahashi T, Abe H, Nakano H, Nakajima O, Nagase S, Kyoto K: Mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation of postovulatory in vivo-aged mouse oocytes. The 7th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction, Kuala Lumpur, Malaysia, 30 March-2 April 2017
19. Suzuki D, Suzuki S, Soeda S, Endo Y, Kojima M, Nomura S, Takahashi T, Mizunuma, Fujimori K. Three cases of total laparoscopic hysterectomy due to late-onset complications of uterine artery embolization. 18th Annual Congress of the Asia Pacific Association for Gynecologic Endoscopy and Minimally Invasive Therapy, Okayama, Japan, 7-9 Sept 2017

〔図書〕(計3件)

1. 高橋俊文(分担執筆). 甲状腺機能検査. 不妊・不育症診療指針 柴原浩章編. 中外医学社(東京) 2016, 98-100.
2. 高橋俊文(分担執筆). 生殖医療の必修知識 2017. 日本生殖医学会編. 日本生殖医学会 2017.
3. 高橋俊文(分担執筆). 新不妊ケア ABC. 鈴木秋悦, 久保春海編. 医歯薬出版株式会社(東京) 2019, 63-68.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 菅沼亮太

ローマ字氏名: Suganuma Ryota

所属研究機関名: 福島県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 30528211

(2)研究協力者: なし