

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09224

研究課題名（和文）加齢による精子・卵子の妊孕能低下とミトコンドリア品質管理システムの関連

研究課題名（英文）Mitochondria quality control in aged sperm and egg

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内にはミトコンドリアの品質を管理するメカニズム（MQC）が存在する。本研究では、MQCを司るタンパクの一つであるMieapが、精子や卵子の機能に及ぼす影響を解析した。加齢やMQC機能低下の影響をより強く受けるのは、卵子でなく精子であった。細胞内の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。MQC機能が低下した精子は、体外受精環境で胚に酸化ストレスを誘導し、胚発育を抑制する可能性が推測された。一方で、本研究では、加齢に伴う妊孕能低下と、MQCシステムの関連を見出すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞におけるミトコンドリア品質管理（MQC）システムは精子と卵子で異なり、特に精子ではMieapタンパクが重要な役割を担うことが明らかになった。MQC機能が低い精子は、体外受精の胚発育に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。「生殖細胞の質とミトコンドリア機能」のコンセプトを体外受精に応用する場合、ターゲットは卵子でなく精子になると思われる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial quality control (MQC) is critical in controlling the quality of mitochondrial function and maintaining cellular health. We investigated the role of Mieap, one of the proteins that control MQC, on sperm and egg functions. Mieap-knockout induced sperm oxidative stress and markedly reduced sperm function. Mieap-knockout sperm induced embryonic growth arrest during in vitro fertilization. These results indicate that MQC is essential for sperm function and embryonic development. Unfortunately, we could not prove the association between the MQC impairment and aged-related fertility decline in sperm/egg.

研究分野：生殖医学

キーワード：不妊治療 体外受精 ミトコンドリア 精子 卵子 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

本邦では生殖補助医療 (ART) を希望する 40 歳以上の高齢カップルが増加しているにも関わらず、その妊娠・生産率は低迷したままである。すなわち現在の ART は技術的な限界を迎えており、高齢不妊カップルに対する本質的な治療戦略が欠如していると言わざるを得ない。このような状況を打破すべく注目されているのが、「生殖細胞の質とミトコンドリア機能」である。体細胞では加齢によりミトコンドリア機能が低下すると、細胞内に酸化ストレスが蓄積しアポトーシスが誘導されるが、生殖細胞でも同様なメカニズムが作動する可能性がある。精子はミトコンドリアで産生される ATP を原資に前進運動するが、加齢に伴いミトコンドリア機能が低下すると、精子機能も低下すると推測されている。加齢卵子では、核における染色体不分離や異数性異常と、細胞質におけるミトコンドリア機能の低下が、独立して進行する可能性も推測されている。

ミトコンドリアには、自らの機能低下を防ぎ、健全性と機能を維持する仕組みとして、ミトコンドリア品質管理システム (MQC) が存在する。体細胞の MQC メカニズムには、(1) fission & fusion (分裂と融合)、mitophagy (ミトコンドリア特異的オートファジー)、ubiquitin-proteasome 系 (ユビキチン標識 プロテアソーム分解) が知られている。しかしながら、これら (1) ~ (3) の MQC メカニズムが生殖細胞で機能することを証明した報告は皆無であり、精子・卵子では何か別の MQC メカニズムが発動する可能性が推測されていた。

2. 研究の目的

本研究では、新規の MQC メカニズム mitochondrial-eating protein (Mieap) に着目した。Mieap は不良なミトコンドリアを貪食・除去することで、細胞内ミトコンドリアの健全性を維持している。

そこで、「加齢に伴う精子や卵子の妊娠能低下は、ミトコンドリア機能やその品質管理システムと関連するか？」をテーマに、Mieap が精子や卵子の機能や胚発育にどう影響するかを解析することで、生殖細胞におけるミトコンドリア品質管理システムの役割を検討した。

3. 研究の方法

実験には、若年群 (~20 週齢) および加齢群 (40~50 週齢: ヒトの 35~45 歳に相当) の野生型マウス (Wild type, WT) と、Mieap のノックアウトマウス (Mieap-KO) を用いた。それぞれの雄マウス (♂) から精巣や精子、雌マウス (♀) から卵巣や卵子、体外受精胚における MQC システムやミトコンドリア機能、酸化ストレスを評価し、それらが実際の妊娠能とどのように関連するか解析した。

4. 研究成果

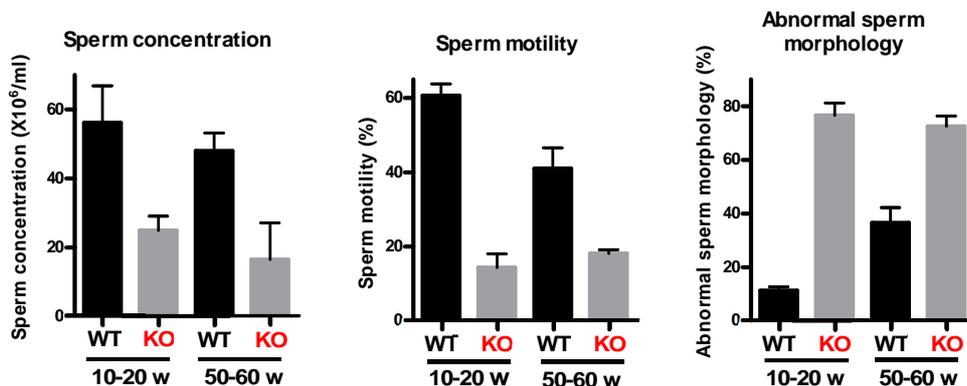
(1) Mieap は *in vivo* の妊娠能や卵巣機能に関与しない

♂♀のカップルを継続的に交配させると、WT マウスと Mieap-KO マウスの産仔数に差を認めなかった。すなわち Mieap は *in vivo* の妊娠能に影響しないと考えられた。

♀を過排卵刺激すると、♀WT マウスと♀Mieap-KO マウスの排卵数には、差を認めなかった。卵巣組織でも、♀WT マウスと♀Mieap-KO マウスの卵胞数や黄体数に差を認めなかった。すなわち Mieap は卵胞発育~排卵を含め卵巣機能に影響しないと考えられた。

(2) Mieap は精子の運動性と形態に重要な役割を担う

♂Mieap-KO マウスの精子は、♂WT マウスの精子と比較して、運動率が低く、奇形率は高かった。すなわち Mieap は精子機能に極めて重要と考えられた。



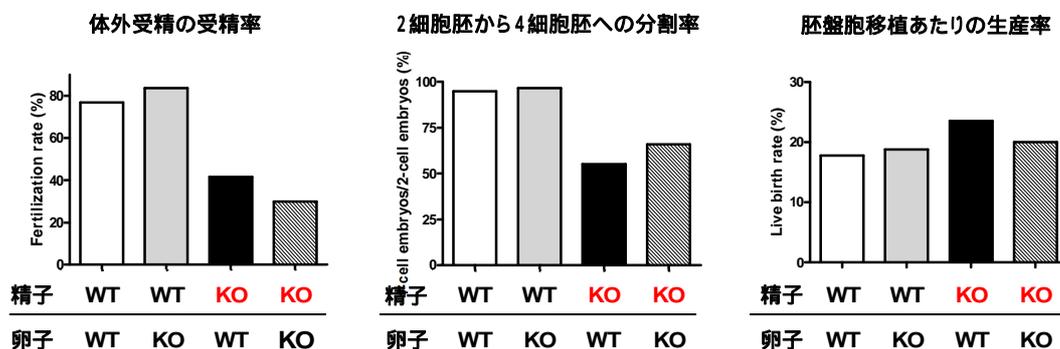
♂WT マウスおよび♂Mieap-KO マウスより精子を、♀WT マウスおよび♀Mieap-KO マウスより卵子を回収して、体外受精を行った。♂Mieap-KO 精子×♀WT 卵子で体外受精を行うと、♂WT 精子×♀WT 卵子と比較して、受精率が低かった。一方で、♂WT 精子×♀Mieap-KO 卵子で体外受精を行ったときの受精率は、♂WT 精子×♀WT 卵子と同等であった。すなわち精子で Mieap 発現が抑制されると体外受精の受精率は低下するが、卵子で Mieap 発現が抑制されても受精率は変化なかった。やはり Mieap は、精子機能に必須だが、卵子機能に影響しないと考えられた。

(3) ♂Mieap-KO 精子の機能低下は、精子ミトコンドリアの酸化ストレスに関連する

♂Mieap-KO 精子の奇形（形態異常）は、精巣でなく、精巣上体レベルで生じていた。Mieap は（ミトコンドリアが豊富に局在する）♂WT 精子の中片部に発現するが、♂Mieap-KO 精子では中片部に酸化ストレスが誘導されていた。すなわち Mieap の発現が低下すると、精子は過剰な酸化ストレス状態に陥ると考えられた。

(4) ♂Mieap-KO 精子は体外受精の胚発育を阻害する

♂Mieap-KO 精子×♀WT 卵子で体外受精を行うと、♂WT 精子×♀WT 卵子と比較して、受精率だけでなく、2細胞胚から4細胞胚への分割率も低下した（2-cell stage block）。一方で、♂Mieap-KO 精子×♀WT 卵子の体外受精胚であっても、いったん胚盤胞に到達してしまえば、子宮内へ移植したときの生産率や児体重、胎盤重量に悪影響を及ぼさなかった。2-cell stage block は胚が酸化ストレスに曝されたときの特異的な現象である。そこで体外受精の培養環境を低酸素条件に、もしくは抗酸化剤を添加したところ、♂Mieap-KO 精子が誘導する胚の 2-cell stage block は抑制された。すなわち♂Mieap-KO 精子が誘導する体外受精胚の発育停止は、胚の酸化ストレスに起因すると考えられた。通常ミトコンドリアは母性遺伝であり、精子由来のミトコンドリアは受精後速やかに排除されると考えられている。しかしながら、♂Mieap-KO 精子が不良ミトコンドリアを卵子内へ持ち込み、受精後も胚を酸化ストレスに曝し続ける可能性が推測された。



(5) 加齢に伴う精子機能の低下は、Mieap 発現レベルと関連しない

♂加齢 WT マウスの精子は、♂若年 WT マウスの精子と比較して、運動率が低く、奇形率は高かった。加齢 WT マウスは、若年 WT マウスと比較して、排卵数が少なかった。♂加齢 WT 精子×若年 WT 卵子で体外受精 胚盤胞移植を行うと、♂若年 WT 精子×若年 WT 卵子と比べて、受精率が低く、着床後も流産率が高く生産率は低かった。♂若年 WT 精子×加齢 WT 卵子で体外受精 胚盤胞移植を行うと、その成績は♂若年 WT 精子×若年 WT 卵子と同等だった。すなわち体外受精 胚盤胞移植に及ぼす加齢の影響は、卵子よりも精子で著明であった。一方で、精子における Mieap の発現レベルは、♂加齢 WT マウスと♂若年 WT マウスで同等だった。卵子における Mieap の発現レベルも、加齢 WT マウスと若年 WT マウスで同等だった。すなわち加齢に伴う精子機能の低下は、Mieap の発現レベルに相関しないと考えられた。

（結語）加齢や MQC 機能低下の影響をより強く受けるのは、卵子でなく精子であった。細胞内の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。MQC 機能が低下した精子は、体外受精環境で胚に酸化ストレスを誘導し、胚発育を抑制する可能性が推測された。一方で、本研究では、加齢に伴う妊孕能低下と、MQC システムの関連を見出すことはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Orisaka Makoto, Miyazaki Yumiko, Shirafuji Aya, Tamamura Chiyo, Tsuyoshi Hideaki, Tsang Benjamin K., Yoshida Yoshio	4. 巻 20
2. 論文標題 The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuyoshi Hideaki, Orisaka Makoto, Fujita Yuko, Asare-Werehene Meshach, Tsang Benjamin K., Yoshida Yoshio	4. 巻 20
2. 論文標題 Prognostic impact of Dynamin related protein 1 (Drp1) in epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-06965-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito Masami, Yoshino Osamu, Ono Yosuke, Yamaki Ushijima Akemi, Tanaka Tomoko, Shima Tomoko, Orisaka Makoto, Iwase Akira, Nakashima Akitoshi, Saito Shigeru	4. 巻 85
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein 2 enhances gonadotropin independent follicular development via sphingosine kinase 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 折坂誠、白藤文	4. 巻 24
2. 論文標題 子宮内膜症と不妊症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本生殖内分泌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 27-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Orisaka M, Nakamura Y, Arakawa H, Yoshida Y
2. 発表標題 Mitochondria-eating protein is essential for sperm function, but not oocyte quality, in in vitro fertilization
3. 学会等名 52nd Annual conference of the Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Orisaka
2. 発表標題 Mitochondria-eating protein is essential for sperm function, but not oocyte quality, in in vitro fertilization
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

1. 発表者名 折坂 誠
2. 発表標題 Mitochondria-eating protein (Mieap) は精子機能に必須だが、卵子の質には影響しない
3. 学会等名 第23回日本生殖内分泌学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 折坂 誠（大須賀 穰、藤井知行 編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 330
3. 書名 生殖生理	

1. 著者名 折坂 誠 (柴原 浩章 編)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 780
3. 書名 不妊症・不育症診療：その伝承とエビデンス	

〔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
---------	---------