

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09296

研究課題名(和文)オートファジーの細胞質恒常性維持機能を利用した卵子・胚の細胞質品質改善方法の開発

研究課題名(英文) Development of quality improvement methods in oocytes and embryos by autophagy regulators

研究代表者

山本 篤 (YAMAMOTO, ATSUSHI)

獨協医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00468349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスではオートファジーが受精後に必須であり、母性たんぱく質の分解に関与していると考えられていると同時に、卵子細胞質中に蓄積した不要たんぱく質などの除去にも関与し、胚発生の正常化に寄与している可能性が考えられている。一方ヒト胚ではオートファジーの存在も知られていない為研究を行った。今回の研究では不妊治療後に胚を廃棄する意志があり研究応用の許諾が得られた余剰廃棄胚を利用して、定性的にオートファジーの検出を行い、その存在を確認することができた。定量的な確認、臨床的な検証は行えなかった。なお、ヒト胚を使用するにあたり院内の倫理審査委員会・日本産科婦人科学会の承認を得たうえで実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスでは受精後にオートファジーが活発に誘導されるが、オートファジーが機能しないと発生が停止する。しかしその役割は不明である。一般細胞ではオートファジーは細胞内の栄養供給の他、細胞品質の維持を行う事から胚発生でも同様の働きがあり発生の正常化に寄与する事が考えられる。マウスよりも長寿命のヒト胚ではより品質維持への関与が想定されるがオートファジーの存在も不明である。そこで院内倫理審査委員会・日本産科婦人科学会の承認後、不妊治療後に胚廃棄意志があり研究許諾が得られたヒト胚を利用し顕微鏡下にオートファジーの存在を確認した。今後新たな不妊治療の標的としてオートファジー制御による影響を調査する予定である。

研究成果の概要(英文)：Autophagy after fertilization is essential for mouse preimplantation development. Its function is thought to be the degradation of maternal proteins and the maintenance of cytoplasm homeostasis in oocytes and embryos. And autophagy is thought to contribute the adjustment of normal embryo development in mice. Still autophagy had not been detected in human embryos. In this research, we detected autophagy protein LC3 in human embryos by fluorescence microscope after we obtained permissions to use human embryos from both infertility patients, research ethics committee in hospital and the Japan Society of Obstetrics and Gynecology.

研究分野：生殖医療

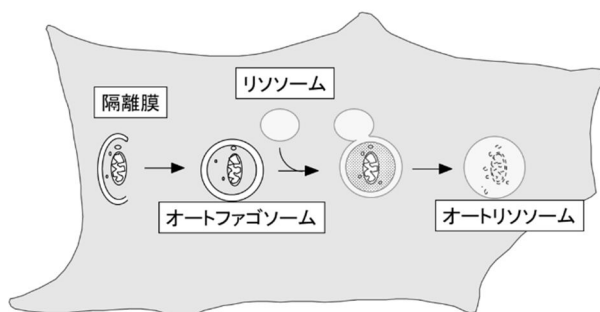
キーワード：オートファジー 生殖 胚発生

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では 2012 年に平均初産年齢が 30 歳を超えるなどの晩婚化に伴い、不妊症患者は増加の一途をたどっている。不妊症治療の現場では、Assisted Reproductive Technology(ART)と呼ばれる採卵や体外受精といった高度な技術を要する生殖補助医療が用いられるが、その治療回数は世界中で日本が群を抜いて多く、日本は生殖補助医療の分野で先導的な役割を果たしている。

女性側の不妊症患者に高齢女性が多く、卵の“老化”が不妊原因である、として、加齢に伴う卵の品質低下が近年盛んにマスメディアに取り上げられている。科学的には、卵子の質の低下とは“遺伝子”レベルでの老化と“細胞質”レベルでの老化があるが、我々が着目しているのは「卵子・胚の細胞質の老化」についてである。しかし、その品質低下に至る分子メカニズムの多くは現時点で不明である。

細胞内タンパク質分解メカニズム  
オートファジー・リソソーム系



一般的に細胞質成分の品質管理といえば、酵母などの単細胞生物からヒトなどの高次生物に至るまで、左図のようなオートファジー・リソソーム系が中心的な働きを担い、不用タンパク質の分解や細胞内小器官のリモデリング(分解から再合成を行うこと)を行っている。たんぱく質を分解することは生き物にとって重要であり、オートファジーはごみにあたる余分なたんぱく質を分解すること

で細胞質の掃除を行い、正常なたんぱく質がそろそろよう整理整頓を行うという、細胞の“品質管理”も行っている。

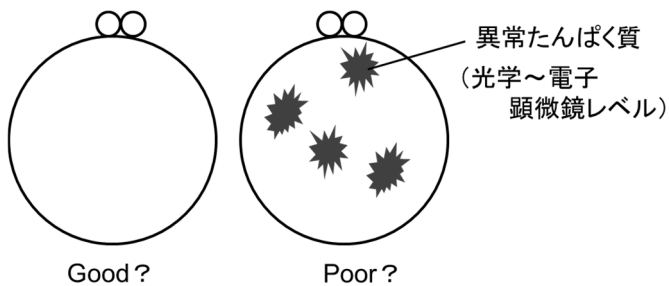
簡単にオートファジーの仕組みについて説明すると、細胞質内の分解したいたんぱく質を隔離膜で取り囲み、オートファゴソームと呼ばれる袋を作る段階と、そこに様々な消化酵素をたくさん含んだリソソームが融合するという、実際にたんぱく質がアミノ酸レベルまで分解される段階からなる。この仕組みに関して、2016 年に大隅良典博士がノーベル医学生理学賞を単独受賞となった。

この仕組みが破綻するとヒトでも、リソソーム病やあるタイプのパーキンソン病などのように変性たんぱく質がたまり様々な症状をきたす神経変性疾患を発症することが近年明らかになっている。(マウス: Hara T, Mizushima N, et al. Nature 2006, ヒト: Saitsu H, Mizushima N, et al. Nat Genet. 2013)

また卵子は生まれた時から原始卵胞という状態で存在し、分裂をして増えることはなくずっと眠った状態にある。しかし、初経以降に月経のたびに一部が排卵に向けて発育する。この時発育する卵胞は年齢分の年月を経た状態であり、発育する卵子の中では年齢に応じて一種の“老化”が起きていることが想定され、少しずつ細胞質内に“あか”のような老廃物がたまっていることが想定される。老廃物の分解が正常に行われないと変性疾患を発症するという事例を考えると、卵子細胞質の加齢に伴う影響は不妊症とも関連が強いのではないかと考えられる。

実際に、マウスの受精卵を用いてオートファジーが機能できなくすると、卵子を作った“母”由来の細胞質タンパク質の分解が進まず、受精後 4-8 細胞期に胚の発生が停止することが確かめられている。(Tsukamoto S, Mizushima N, et al. Science 2008) また同様に、塚本智史博

士とのマウス胚を用いた先行研究より、オートファジー・リソソーム系の主たる分解者であるリソソーム機能の活性は受精直後にとても高い状態に変化すること、リソソームそのものの機能を阻害するとやはり胚の 4-8 細胞期で発生が停止すると共に、細胞内にリポフスチン様の異常なタンパク質が蓄積することを報告した。(Tsukamoto S, Yamamoto A, et al. J Reprod Dev 2013)



なお、ヒト卵子において異常なタンパク質としてしばしば目撃されるリポフスチン顆粒の蓄積所見は、若年者と比し高齢女性の卵で多く認められる所見の一つと言われており、卵細胞質の品質低下を疑うべき一つの指標となっている。

マウス研究で判明した受精後の生理的な反応や機構はヒトでもほぼ同様と想定されるが、ヒト胚ではオートファジーの存在をはじめ、胚発生中のオートファジーに関する知見は未だない状態であった。

## 2. 研究の目的

マウスの寿命(3年ほど)に比べるとヒトの寿命は圧倒的に長く、老化に伴う卵細胞質の品質維持にオートファジーが関与している可能性は非常に高いと予測されるため、提供されたヒト卵子・胚におけるオートファジーの存在、誘導状況を定性的に確認したい。

また、マウス胚を用いて、より少ない個数でのオートファジー活性化状態を判定できる定量的な実験手法を確立したい。その後、同手法を用いてヒト胚でのオートファジー活性を定量的に判断し、薬剤による活性制御の変化の評価法を確立し、臨床応用に結び付けたい。

## 3. 研究の方法

院内倫理審査、日本産科婦人科学会の審査により研究の許可を得る。不妊治療後に胚の廃棄の申し入れがあった夫婦から研究利用への意志を確認し、夫婦二人から署名を得る。

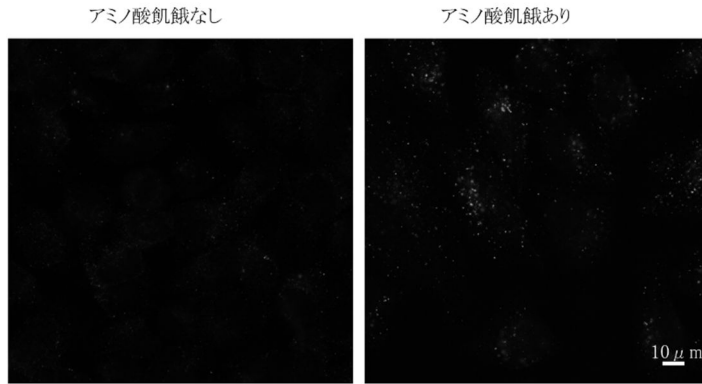
ヒト卵子・胚を融解し胚の生存を確認したのち、直ちにPFAで固定を行う。その後オートファゴソーム膜に存在するタンパク質LC3の免疫染色を行い、卵子・胚中のオートファジー発現状況を蛍光顕微鏡下に確認する。同時にLC3ドット数を蛍光顕微鏡下にカウントし、誘導状況の評価として用いる。

また、以前に100個のマウス胚中のオートファジー関連タンパク質の増減をウェスタンブロット法を用いて定量的に評価する方法を確立しているが、更に用いる胚数をより少ない10から50個で定量的に判別できる方法を、数種類の抗原抗体反応賦活化剤、検出感度増強試薬を用いて確立する。

## 4. 研究成果

(1) 予備実験としてHeLa細胞をアミノ酸飢餓培地で培養し、LC3抗体で免疫染色を行った。

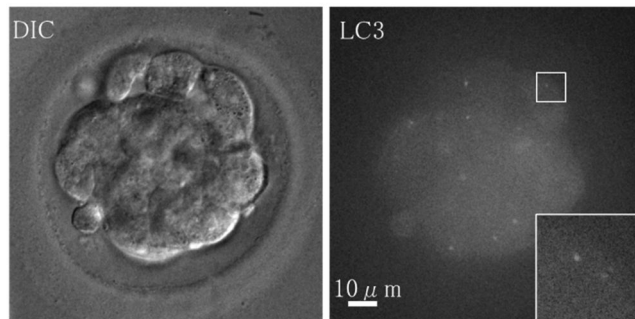
Hela細胞をアミノ酸飢餓2時間処理をするとLC3が増加する



Hela細胞  
1<sup>st</sup>:LC3  
2<sup>nd</sup>:Alexa

アミノ酸のある通常培地でも数個の LC3 ドットは確認されたが、アミノ酸飢餓培地では著明な LC3 ドット数の増加、ドットサイズの増大を認めた。

(2) 譲渡されたヒト胚を融解した。20分培養したのち、PFAで固定し、透過処理を行った後 LC3 で免疫染色した。譲渡された胚は全て桑実胚期のものであったが、全



ヒト桑実胚  
1<sup>st</sup>:LC3  
2<sup>nd</sup>:Alexa

てにおいて LC3 のドットを確認でき、ヒト胚においても受精後にオートファジーが起きていることが証明された。なお、過去に検証したマウスでの同時期の検出状況とほぼ同じ程度のドット数が確認された。

(3) 少量の胚でオートファジー関連タンパク質の検出を定量的に行う事ができるよう、より高感度に検出できる免疫反応賦活化剤・検出試薬を購入して比較検証を行った。受精後 12 時間経過のマウス胚、Hela 細胞破碎後の上清、マウスを 24 時間飢餓状態に置いて回収した心筋細胞と平滑筋細胞の破碎後上清を用いて検討を行ったが、アプライする全タンパク量 5 μg 以下では LC3 タンパク質は検出できなかった。

内標準たんぱく質として用いた Tublin たんぱく質、アクチンたんぱく質のバンドは、マウス卵 50 個でもアプライタンパク量 10 μg と同レベルで検出できたが、LC3 タンパク質は検出できず、適切な系を確立することはできなかった。(データ未掲載)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	岡田 弘  (OKADA HIROSHI)  (00177057)	獨協医科大学・医学部・特任教授    (32203)	

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