

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19263

研究課題名（和文）哺乳類メスの繁殖寿命延長に向けた挑戦：生殖システムへのセネッセンスの関与

研究課題名（英文）The study of the effects of cellular senescence on female reproductive tracts

研究代表者

杉浦 幸二（Sugiura, Koji）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：20595623

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：研究により、マウス個体の加齢に伴って、生体内での受精率が低下することが明らかとなった。さらに、この受精率の低下は、卵管における精子輸送または受精能獲得に何らかの異常があるためと考えられた。さらに卵管には、加齢に伴って細胞老化に至った細胞（セネッセンス細胞）が蓄積することが明らかとなった。このセネッセンス細胞の存在が、卵管機能に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物のメスの繁殖能力は、個体の加齢に伴って顕著に低下してしまう。この繁殖能力の低下を防ぐことは、家畜生産や不妊治療分野における重要課題である。本研究の成果はこの繁殖能力低下原因の一つとして卵管機能異常の存在を明らかとした。これはメス繁殖システムの老化研究として、重要な知見である。さらに、この卵管異常の原因として、セネッセンス細胞の蓄積の可能性を見出している。これは、家畜生産の向上技術開発など、多岐にわたる貢献の期待できる知見である。

研究成果の概要（英文）：This study showed that the fertilization rate in vivo decreases with the ageing in mice. Moreover, this decrease in the fertilization rate is likely to be attributed to the deficiency of oviduct in sperm transport or capacitation. In addition, we found that senescent cells are accumulated in oviduct with ageing. Therefore, the cellular senescence may have some deleterious effects on the function of aged oviduct.

研究分野：繁殖遺伝学

キーワード：セネッセンス 卵管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物のメスの繁殖能力は、個体の加齢に伴って顕著に低下してしまう。この繁殖能力の低下を防ぐことは、家畜生産や不妊治療分野における重要課題である。これまでは、卵巣や子宮の機能異常や卵子の質の低下が、その原因であると説明されてきた。しかし、実際は卵巣や子宮機能に顕著な異常の見られない時期(以下、本申請では「前老齢期」と定義する)の動物においても、繁殖能力の低下は始まっているが、そのメカニズムは不明である。

一般に、動物個体の加齢に伴った組織の老化には、「セネッセンス」の関与が知られる。セネッセンスとは、細胞老化とも呼ばれ、細胞の過増殖や DNA 損傷、がん遺伝子の活性化などに応答して、細胞増殖が不可逆的に停止する現象である。最近の研究から、個体の加齢に伴って、セネッセンスに至った細胞(セネッセンス細胞)が組織内に蓄積することで、組織の機能異常・低下が引き起こされることが明らかとなり、これが組織老化の実態であると考えられている。

申請者は、予備実験により前老齢期におけるメス繁殖能力低下の原因が、卵管におけるセネッセンス細胞の蓄積である可能性を見出している。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、本申請では、これまでメスの生殖システムの老化研究において着目されることの少なかった卵管に焦点を当て、動物のメス個体の加齢初期に観察される繁殖能力低下メカニズムとして、個体の加齢に伴った卵管へのセネッセンス細胞の蓄積、さらに卵管の機能異常の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、一般に用いられる老化モデル(12ヶ月齢以上)と十分に若い「若齢」マウス(2-4ヶ月齢)に加え、老化モデルよりも比較的若いマウス(8-10ヶ月齢)を「前老齢」と定義して用い、下記の実験を行った。

- (1) 若齢、前老齢、老齢メスマウスの繁殖能力を、それぞれ同等の月齢のオスマウスと交配させ、産子数を指標として調べた。
- (2) 卵巣機能と卵母細胞(以下、卵)の質(発生能)を、排卵数と体外受精後の発生率として調べた。また、オスマウスと交配させた後、卵管より卵を採取し、生体内での受精率を調べた。
- (3) 卵管での受精環境を明確に比較するため、器官培養した卵管内で体外受精を行う系を確立した。この系を用いて、若齢と前老齢卵管における受精率を比較した。
- (4) 卵管の蠕動運動による卵管液の流れを可視化する実験系を確立し、卵管液の流れを比較した。
- (5) 卵管のセネッセンス細胞の存在を、セネッセンス細胞の指標である CDKN2A タンパク質発現、SA-Gal (senescence-associated β -galactosidase) 染色、組織切片の形態観察の3点から検討した。

4. 研究成果

(1) 加齢に伴った産子数の変化について

若齢マウスと比較して、前老齢、老齢マウスでは、産子数の有意な低下が観察された。したがって、前老齢期において既に繁殖能力の低下がみられることが明らかとなった。

(2) 前老齢期マウスにおける繁殖能力低下について

前老齢マウスの繁殖能力低下について、排卵数、卵の発生能、さらに生体内での受精率について調べた。

前老齢マウスにおいて、排卵数は若齢マウスと有意な差は観察されなかった。一方、老齢マウスでは、若齢・前老齢と比較して有意に少ない排卵数であった。また、体外受精後の初期胚発生率は、若齢、前老齢間で有意な差は見られなかった。

オスマウスとの交配させ、卵管における受精率を調べた。その結果、前老齢マウスでは、若齢マウスと比較して受精率の有意な低下が観察された。

(3) 卵管器官培養における受精率について

以上の研究により、前老齢期では卵管における受精に何らかの問題が存在し、繁殖能力が低下している可能性が考えられた。そこで卵管の受精環境をより明確に比較するため、器官培養した卵管内で受精をさせる培養系を確立した。この培養系で受精能獲得済みの精子を用いて受精させたところ、受精率は若齢、前老齢間で有意な差は検出されなかった。すなわち、卵管における受精環境自体に若齢、前老齢間で大きな違いはないと考えられる。

(4) 加齢に伴った卵管機能低下の可能性の探索について

受精が起こる過程において、卵管は、精子の受精能獲得を促進し、その蠕動運動により精子を輸送、さらに受精に適した環境を提供するなど重要な役割を果たす。上記の結果より、受精の環境自体に若齢・前老齢間で大きな違いはないと考えられた。卵管機能のうち精子輸送には、卵管の蠕動運動による卵管液の流れが重要である。そこで、既報に従い卵管の蠕動運動および卵管液の流れを可視化する実験系を確立した。本実験系を用いて、現在、若齢、前老齢間での卵管蠕動運動、卵管液の流れを比較している。

(5) 卵管におけるセネッセンス細胞の存在について

加齢に伴ってセネッセンス細胞が卵管に蓄積する可能性を検討した。その結果、前老齢、老齢卵管では、SA- Gal 染色陽性の細胞が存在していた。また、前老齢、老齢卵管ではCDKN2A タンパク質が高発現していた。さらに組織切片を作製し、卵管の組織形態を観察したところ、老齢、前老齢卵管では空胞化した巨大な細胞が多く観察された。これらはすべてセネッセンス細胞の特徴と一致している。これらの特徴は若齢マウス卵管では観察されなかった。以上より、個体の加齢に伴って卵管にはセネッセンス細胞が蓄積すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuno Yuta, Kanke Takuya, Maruyama Natsumi, Fujii Wataru, Naito Kunihiko, Sugiura Koji	4. 巻 14
2. 論文標題 Characterization of mRNA profiles of the exosome-like vesicles in porcine follicular fluid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0217760	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山夏海, 松野雄太, 藤井渉, 内藤邦彦, 杉浦幸二
2. 発表標題 マウス卵胞発達にエクソソームが果たす役割に関する研究
3. 学会等名 第19回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山夏海, 福長一鈴, 藤井渉, 内藤邦彦, 杉浦幸二
2. 発表標題 哺乳類卵管の老化：加齢に伴う繁殖能力低下メカニズム
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----