

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390456

研究課題名(和文) 卵子加齢にみる老化のメカニズムと発生能への影響を探る戦略的基盤研究

研究課題名(英文) Basic study to explore molecular mechanism of the oocyte effecting on developmental potential

研究代表者

阿久津 英憲 (Akutsu, Hidenori)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・室長

研究者番号：50347225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：加齢モデルのES細胞では、Wntシグナル関連遺伝子の発現低下が認められWnt-β-Cateninシグナルの機能低下を見出した。そこで、β-Catenin遺伝子を欠いた胚からES細胞の作製を行った。β-Catenin遺伝子欠損ES細胞樹立に成功し、その分化特性解析から分化多能性が欠落することを見出した。副次的に、β-Catenin遺伝子欠損ES細胞は混合型悪性胚細胞腫瘍の発症機序を説明できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed embryonic stem (ES) cells derived from aging mice model. It was found that some genes of Wnt-beta-Catenin signaling were relatively lower expression compared with control ES cells. Then, we successfully derived ES-like cells from beta-Catenin defected embryos. The ES cells showed severely impaired in pluripotential differentiation under loss of Beta-Catenin, although can maintain self-renewal ability. Additionally, we found mixed germ cell tumor was generated from the beta-Catenin defected cells in vivo. Taken together, beta-Catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo derived stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ES細胞 卵細胞 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)社会的背景 生物には寿命があり、哺乳動物は、その寿命内でも次世代へつなく生殖期間は限られている。現在わが国は、出生率(合計特殊出生率)が1.32(2006年)と依然非常に低い値である。一方で、不妊症治療特に生殖補助医療(ART)享受による出生児数は総出生児数の1%を超え着実に増加している。社会のライフスタイル変化に伴い女性の妊娠・出産時年齢が上昇してきた昨今、ARTはいかなる生殖年齢層にも有効ではないことが明らかとなっている。加齢による生殖機能の不可逆的低下に早急に対応する必要が出てきた。まず、確かな基礎実験に裏打ちされたエビデンスを国民に提供する必要がある。

(2)生物学的背景 加齢とともに卵子の機能は低下する。米国の卵子ドナーを利用したART享受による出生率のデータが明らかに示している。加齢と卵子ドナーを利用すると年齢に関係なく高い出産率が得られることから女性30歳以降の妊娠率低下は、加齢による卵子の質の低下と強く関連していることが示唆されている。女性は限られた生殖期間があり、つまり“生殖寿命”は卵子の質の低下でもある。

(3)卵細胞の質評価法の限界 個体の加齢に伴う卵子の質低下は、ミトコンドリア機能低下に代表される細胞質の機能低下が胚発生低下の大きな要因とされている(Linnane AW, et al. *Mutat Res*;1992.)。ミトコンドリア機能低下による代謝活力減少だけでは個体への発生率低下の十分な説明ができない。未熟卵に精子を受精させても発生は進まず、クローン動物作成でも未熟卵へ体細胞を移植しても発生は進展しないことなどから初期胚発生には卵細胞質の成熟は必須である。それでは生殖適齢と加齢個体からの成熟卵子(第二減数分裂中期卵)の質に差異を与えているものは何であるのか。卵子の質とは何であるのか。精子との受精により個体発生能を獲得すること、つまり卵子の本質は全能性を持つことにほかならない。私たちはこれまで卵子の質を評価するシステムを持ち合わせておらず、加齢の卵子全能性に及ぼす影響に関するエビデンスを得ることは非常に困難であった。

2. 研究の目的

申請者らは、実験動物(マウス)を用いた卵子加齢モデルを策定し、生殖適齢マウスより得られた卵子と生殖限界期マウスの卵子(加齢卵子とする)とでマイクロアレイ遺伝子発現解析を行った(Hamatani T, Akutsu H, et al. *Hum Mol Genet*; 2004)。既知の知見を裏付けるように、加齢卵子ではミトコンドリア機能に関連する遺伝子発現の低下や酸化ストレスに関連する遺伝子群の発現の変動が認められた。卵子の加齢に関して、初めて網羅的に遺伝子発現の変化をとらえることができた。加えて、今まで報告がなかった

きわめて重要な遺伝子発現の変化があることがわかった。

(1)マウス加齢モデル系を構築し、加齢マウス由来の卵細胞を用いて胚性幹(ES)細胞を樹立する。生殖適齢マウス由来のES細胞と特性解析の比較検討を行う。

(2)卵子の質の本質である全能性に関する β -Catenin 遺伝子に着目し、分化多能性に与える影響を明らかにするために、 β -Catenin 遺伝子欠損胚からES細胞樹立検証を行う。

(3)少子化と晩婚化が社会の課題となる中、生殖医療において女性の加齢と生殖医療の課題を科学的側面から抽出する。

3. 研究の方法

(1)78~80週齢のマウス(C57BL/6)を対象とし、過排卵により卵子を採取し、生殖適齢雄マウス(129/sv)の精子を用いICSI法により受精卵を得て発生した胚盤胞からES細胞を樹立する(加齢ES細胞)。本研究では、加齢ES細胞のDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現結果をもとにしたバイオインフォマティクス解析、発現に有意差のある遺伝子群に対して細胞活動での機能分類解析を行った。

(2)(1)の解析からWntシグナル関連遺伝子の発現低下が認められたため、Wnt- β -Cateninシグナルに注目した。 β -Catenin遺伝子を精子及び卵子発生過程で組織特異的に欠損させた系を用いて、 β -Catenin遺伝子欠損受精卵の胚盤胞への初期胚発生とその評価としてES細胞の作製を行った。樹立した細胞に対して幹細胞特性解析を行った。

(3)生殖医療における加齢の課題を抽出し総説としてまとめ専門誌へ報告をする。

4. 研究成果

(1)ES細胞のDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、対象グループと明確にグループ分けされることが主成分分析により示された。バイオインフォマティクス解析により対象グループに比し細胞外マトリックス及び細胞間接着系に関連する遺伝子群の発現が有意に低下していることを見出した。細胞活動での機能分類では、“cell adhesion”、や“biological adhesion”などの細胞接着の低下が示唆され、細胞成分に関する機能分類では“extracellular”に関する機能低下が示された。細胞外基質に関連する遺伝子の発現低下により加齢ES細胞では接着性に機能低下がおきていることが示唆された。遺伝子発現に有意差のあった遺伝子群から細胞接着及び細胞外基質に関連する遺伝子を抽出し、リアルタイム定量RT-PCR法解析を行った。Pcdhb20 (protocadherin alpha 20)、Spon2 (spondin 2, extracellular matrix protein)、Pcdhb6 (protocadherin alpha 6) やNrp1 (neuropilin 1) は遺伝子発現量が加

年齢 ES 細胞で有意に低下していることが確認された。加齢モデルを構築し、卵細胞への影響を観察する実験システムは個体あるいはそれより得られるサンプルの希少性よりこれまで世界的にも十分な解析システムが構築されず、知見が得られてもバリデートするシステムを構築することは極めて重要である。本研究では、胚盤胞期胚から樹立される ES 細胞を加齢化モデルとして多分化能性へ寄与する性質を体外培養系で探る実験系を構築した。加齢 ES 細胞の遺伝子発現で有意差のある遺伝子群の機能分類を試みた結果細胞の接着系の機能が低下していることが示唆された。

(2) すでに報告のあるノックアウト実験では、着床後すぐに胚性致死となるが、-Catenin 遺伝子欠損受精卵は胚盤胞まで発生することを確認した。次に、-Catenin 遺伝子欠損胚盤胞から ES 細胞樹立を行い作製に成功した。次に、卵子の質の本質である全能性、その代替として分化多能性に与える影響を明らかにするために、胚盤胞から ES 細胞樹立を行った。胚盤胞の内部細胞塊の必須な性質として分化多能性があり、-Catenin 遺伝子欠損と分化多能性獲得の評価として ES 細胞樹立検証の結果、ES 様細胞の樹立に成功した。次に、この -Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞の細胞特性を行った。細胞増殖能は野生型及びヘテロ型の ES 細胞同様の増殖能を持ち、自己複製能を持つことが明らかとなった。しかし、分化多能性の解析から、-Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞は外胚葉・内胚葉・中胚葉の各正常分化組織へ分化することがなく、明らかに分化多能性が欠落していた。これまで、加齢 ES 細胞の特徴として細胞接着系の遺伝子発現が低下していることを明らかにしてきたが、この -Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞は -Catenin や E-Cadherin などのタンパク質の発現に異常は認められなかった。しかし、-Catenin (Plakoglobin) は定性的な解析ではあるが、免疫組織染色で明らかに発現が上昇しており、-Catenin の機能不全を補完していることが示唆された (図 1)。

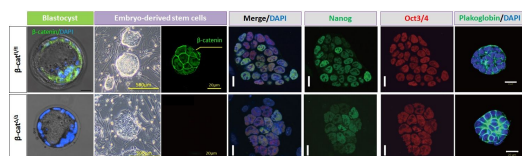


図 1 -Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞

-Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞についてその特性をまとめた。未分化能: Oct3/4、Nanog、Sox2 などの未分化マーカー発現では、蛍光免疫染色法と定量的 PCR 法とも対象の ES 細胞との間で差は認められなかった。未分化マーカーの減弱は認められなかった。自己複製能: -Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞と野生型 ES 細胞の増殖能に有意な差は認められなかった。-catenin はマウス ES 細胞の

自己複製能および未分化性維持には必須ではないことが示唆された。分化多能性について検討した。in vitroでの分化多能性解析では、胚様体作製 6 日目と 14 日目いずれも -Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞由来胚様体において顕著に分化マーカーの減弱が示された。免疫不全マウス皮下移植による in vivoでの多分化能解析では -Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞の腫瘍組織は分化組織は認められなかった。キメラ形成能試験では、キメラ産仔を得ることはできなかった。さらに、-Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞由来の腫瘍組織を組織学的に解析した結果、混合性悪性胚細胞腫瘍 (セミノーマ, 胎児性癌, 絨毛癌) であることを見出した (図 2)。一方、野生型 ES 細胞由来の奇形種は三胚葉への分化が認められ、また、キメラ個体を得ることができた。-Catenin 遺伝子欠損 -ES 細胞にみ

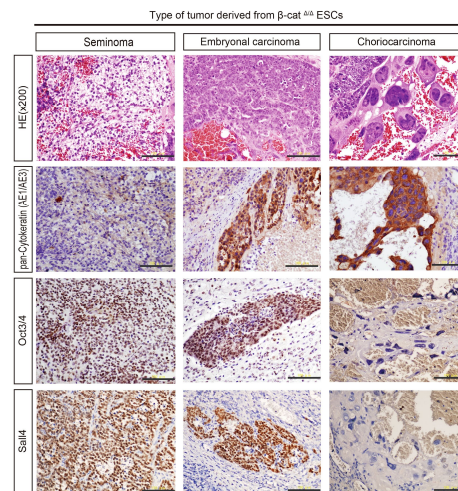


図 2 混合性悪性胚細胞腫瘍の作製

られた分化異常は -catenin を再導入することで回復できた。これらの結果から、-catenin は ES 細胞の分化運命決定と組織の恒常性維持に必須であることが示唆された。

(3) 加齢と卵細胞の質低下は様々な関連要素が指摘されているものの、本質的な機序へのアプローチする手段が見出せていない。今後の生殖医療研究では、加齢に関連する基礎的研究が重要な課題であると思われる。

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 16 件)

欧文

1. Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -Catenin Functions Pleiotropically in Differentiation and Tumorigenesis in

Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *PLoS One*, 2013; 8: e63265.

2. Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013; 11: 108.

3. Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Scientific Reports*, 2012; 2: 930.

4. Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2012; 3: 8.

5. Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril*, 2012; 97: 275-281.

6. Egli D, Akutsu H. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res*, 2011; 28: 118-125.

7. Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports*, 2011; 1: 68.

8. Hamatani T. Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality. *Reprod Biomed Online*, 2011; 22: 103-105.

9. Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 480-493.

10. Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010; 465: 175-181.

11. Tarín JJ, Hamatani T, Cano A. Acute stress may induce ovulation in women. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010; 8: 53.

12. Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. *Curr Med Chem*, 2010; 17: 3245-3252.

13. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 491-503.

14. Chen A, Egli D, Niakan K, Deng J, Akutsu H, Yamaki M, Chad C, Fitz-Gerald F, Zhang K, Melton D, Eggan K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell*, 2009; 4: 103-106.

15. Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 2009; 78: 137-142.

和文

1. 阿久津英憲, 佐藤俊, 秦健一郎:「ARTによる出生時の問題児のエピジェネティクス異常との関連」, 臨床婦人科産科, 2011; 65: 770-776.

2. 阿久津英憲, 佐藤星子:「ヒト ES 細胞, iPS 細胞」生命の誕生に向けて (第二版) 編集; 日本哺乳類動物卵子学会: 2011, 268-272.

〔学会発表〕(計6件)

1. Akutsu H, Sugawara T, Takezawa Y, Kawasaki T, Okumura N, Miura T, Miyado K, Umezawa A: Beta catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells (poster) T-2375. 11th ISSCR 2013 Annual Meeting, June 12-15, 2013. Boston, MA

2. 小川誠司, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 山田満稔, 奥村典子, 菅原かな, 井上 治, 福永朝子, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典:「着床前期胚において特異的に発現する新規 SCAN-zinc finger 遺伝子 Zfp371 の解析」(ポスター)第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌, 5月 10~12 日, 2013 年

3. 奥村典子, 阿久津英憲, 浜谷敏生, 山田満稔, 菅原かな, 小川誠司, 井上 治, 上條慎太郎, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典:「β-カテニン は分化多能性に必須でありその機能不全は悪性胚細胞腫瘍発生に関与している」(口頭)第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌, 5月 10~12 日, 2013 年

4. Akutsu H. "Human ES cells: acquired pluripotency from blastocysts." Asia Pacific Initiative on Reproduction 2012, Aug 31, 2012; Osaka, Japan

5. 阿久津英憲:「エピゲノムの基礎知識」 エピゲノムワークショップ 第 52 回日本哺乳類動物卵子学会, 大田原, 5月 21 日, 2011 年

6. 阿久津英憲:「受精からの発生で理解する

幹細胞生物学」 日本生殖再生医学会第6回
学術集会，東京，3月13日，2011年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿久津英憲 (AKUTSU, Hidenori)

国立成育医療研究センター・研究所・室長

研究者番号：50347225

(2) 研究分担者

浜谷敏生 (HAMATANI, Toshio)

慶應大学・医学部・講師

研究者番号：60265882

(3) 連携研究者

豊田雅士 (TOYODA, Masashi)

東京都健康長寿医療センター・研究所・部

長

研究者番号：50392486