

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：11501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591815
 研究課題名（和文） 加齢による卵の質の低下の分子機構－メタボロミクスとオートファジー解析－
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of aging-related decline in oocyte quality: a study of metabolomics and autophagy
 研究代表者
 高橋 俊文（TAKAHASHI TOSHIFUMI）
 山形大学・医学部・講師
 研究者番号：20302292

研究成果の概要（和文）：女性は加齢により妊孕力が低下するが、その原因として卵の質の低下が重要である。本研究はメタボロミクスとオートファジー機構を解析することにより、加齢による卵の質の低下に卵の代謝機構の異常が関与することを明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）：The age-associated decline in female fertility is largely attributable to the decrease in oocyte quality due to ovarian aging. However, the precise mechanism of oocyte aging due to ovarian aging remains unknown. In the present study, we examined the molecular mechanisms of age-related decline in oocyte quality by metabolomics and analyzing autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：卵の加齢、メタボロミクス、オートファジー、細胞内カルシウム制御機構、ATP

1. 研究開始当初の背景

(1) 女性は35歳以降になると、妊娠率の低下のみならず、流産率の増加が起こる。これは、加齢による卵の染色体異常や胚発育の悪化が原因である。このような加齢による変化は、“卵の質の低下”と言い換えることができるが、加齢による“卵の質の低下”の詳細な分子機構は未だ不明である。

(2) 加齢卵の研究は、①適切な動物モデルがないこと、②卵採取に1年以上の動物の飼育時間があること、③試料として卵の絶対量が少ないことといった問題点がある。DNAチップ

プを用いた網羅的解析により加齢による多数の遺伝子変化が明らかとなったが（Hamatani et al. Hum Mol Genet 2004）、標的タンパク質の解析は、③の理由により困難である。

(3) メタボローム解析は、培養液中の多くの代謝産物を測定可能であり、卵のエネルギー代謝解析に適している。また、オートファジー機構が胚発育に必須であることが明らかとなり、この機構の解析で加齢卵の胚発育悪化に関与する分子を特定し、“卵の質の低下”に対する治療法が見いだせる可能性がある。

る。

(3) オートファジーは非特異的な細胞内のタンパク質分解システムであるが、低栄養・飢餓などの条件で細胞内のタンパク質を分解しアミノ酸を利用する際にも起きることが知られている。オートファジーはオートファゴゾームの形成とリソゾームの融合による起こるが、オートファゴゾームの形成に関与する *Atg5* 遺伝子を卵子特異的に欠失させたマウス卵は、8 細胞期以降の胚発生が停止することが報告された (Tsukamoto et al. *Science* 2008)。我々は、加齢マウス卵は、受精後 8 細胞期以降への胚発生が若年マウス卵と比べ悪化することを確認している。また、カルシウム (Ca^{2+}) ストアの低下による小胞体ストレスやオートファジーを誘導するタプシガルギン投与により、胚発生が悪化することもすでに報告している (Takahashi et al. *Biol Reprod* 2008)。以上より、加齢卵の胚発生悪化のメカニズムにオートファジー機構が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、動物モデルとして加齢マウスを用い、加齢マウス卵における“卵の質の低下”の分子機構を、(1) オートファジー機構の変化、(2) メタボロミクスを用いたエネルギー代謝特性の変化の観点から解析することを目的とした (図 1)。

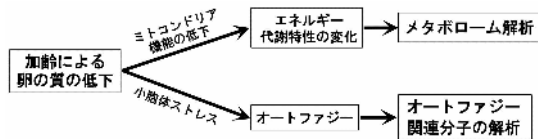


図 1. 加齢による卵の質の低下に対する新しい研究方法の開発

3. 研究の方法

若年マウス (3-4 ヶ月齢) と加齢マウス (13-15 ヶ月齢) を用いて以下の実験を行った。

(1) 平成 22 年度: ①若年マウスおよび加齢マウスにおける胚発生とアポトーシスの検討、②卵・胚における ATP 量の検討、③酸化ストレスとミトコンドリア機能の検討を行った。

(2) 平成 23 年度: ①若年マウスおよび加齢マウスにおける受精時の Ca^{2+} オシレーションの検討、②ストロンチウムによる Ca^{2+} オシレーションの検討、③細胞内 Ca^{2+} ストアの検討、④受精時の Ca^{2+} オシレーションと細胞内 ATP のリアルタイム測定の検討を行った。

(3) 平成 24 年度: ①若年マウスおよび加齢マウスにおける胚発生に関するオートファジー系路に関する検討、②オートファジー経路の促進剤または阻害剤が若年マウスの胚発生に対する影響の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 平成 22 年度: ①加齢マウスにおける胚発生とアポトーシスの検討。In vivo の受精率は若年マウスと比べ加齢マウスでは有意に低下していた。受精卵を追加培養したところ、8 細胞期以降の胚発生が加齢卵では有意に低下し、胚盤胞到達率は加齢マウスで有意に低下した (図 2)。胚盤胞に到達した胚をヘキスト 33258 を用いて核染色し細胞数を、TUNEL 法および活性型カスパーゼ 3 の発現を検出しアポトーシスの割合を検討した。加齢マウス由来の胚盤胞は若年マウス由来のものとは有意に細胞数が低下し、アポトーシスの割合が有意に増加した。②加齢マウス卵・胚における ATP 量の検討。未受精卵、前核期胚、桑実胚の ATP 量をルシフェリン・ルシフェラーゼアッセイを用いて定量し検討した。加齢マウス由来の未受精卵、胚はいずれも若年マウス由来のものとは有意に ATP 量が低下していた。③加齢マウスにおける酸化ストレスとミトコンドリア機能の検討。酸化ストレスは carboxy-DCF diacetate (DCF) の蛍光強度を用いて検討した。その結果、未受精卵における酸化ストレスは、若年マウスと加齢マウスで有意な差を認めなかった (図 3)。活性型ミトコンドリアの割合を膜電位依存性蛍光色素である JC-1 を用いて検討した。活性型ミトコンドリアの割合は、若年マウスと加齢マウスで有意な差を認めなかった (図 4)。以上の結果から、加齢マウスの胚発生悪化の一因としてアポトーシス経路が関与していることがわかった。また、加齢マウス由来の卵および胚は若年マウス由来のものとは比べエネルギー代謝が低下していることがわかった。しかし、それらの原因として酸化ストレスの関与は明らかではなかった。

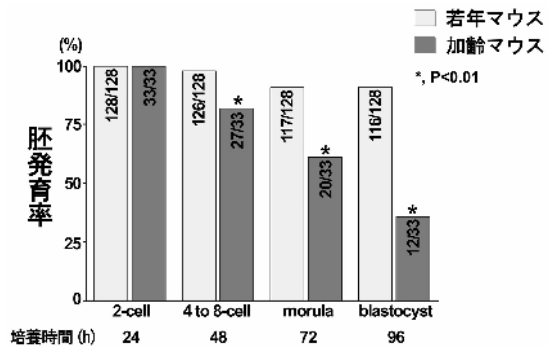


図 2. 若年マウスおよび加齢マウスにおける *in vivo* 受精卵の胚発生

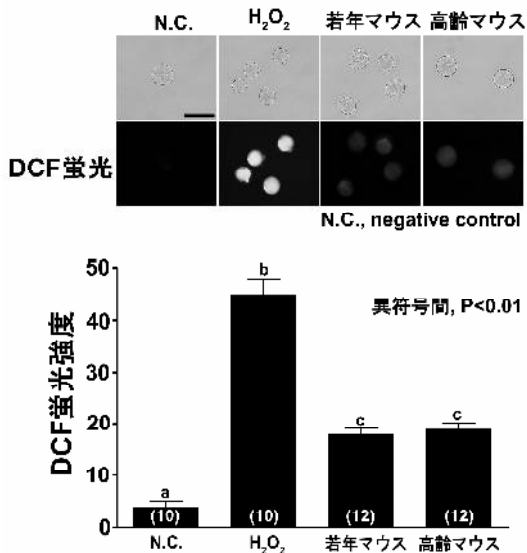


図 3. 若年マウスおよび高齢マウス卵における酸化ストレスレベルの検討

(2) 平成 23 年度：①受精時のカルシウムオシレーションの検討。受精時のカルシウムオシレーションをカルシウム蛍光指示薬 fura-PE3 を卵に負荷、細胞内カルシウム濃度を測定した。高齢マウス卵のカルシウムオシレーションの波形を解析し、若年マウス卵のカルシウムオシレーションと比較したところ、以前我々が報告した排卵後の高齢卵におけるカルシウムオシレーションの波形の変化（低振幅・高頻度）は認められなかった。

(図 4) ②ストロンチウムによるカルシウムオシレーションの検討。ストロンチウムによるカルシウムオシレーションを若年マウス卵と高齢マウス卵で比較した。受精時のカルシウムオシレーションの波形と同じく、両者の間に波形の差は認められなかった (図 5)。

③細胞内カルシウムストアの検討。細胞内のカルシウムストアを若年マウス卵と高齢マウス卵で検討した。カルシウムイオノフォアを投与し、細胞内カルシウム濃度を測定し、細胞内カルシウムストアを評価した。細胞内カルシウムストアは、若年マウス卵と高齢マウス卵で変化はなかった。以上の結果は、我々の予想した結果と異なり、細胞内カルシウム制御機構の悪化が高齢マウス卵では起きていないことがわかった。

④カルシウムオシレーションと細胞内 ATP のリアルタイムモニタリング。受精時のカルシウムオシレーションを測定する際、細胞内 ATP のリアルタイムモニタリングを行った。方法はマグネシウム感受性蛍光色素である Mg green を fura-PE3 と同時に卵に負荷、各々の蛍光に対するフィルターを用いて蛍光を分離し測定した。細胞内 ATP の産生の増加を若年マウス卵と高齢マウス卵で比較検討した。受精後の

細胞内 ATP の増加率は、若年マウス卵と比べ高齢マウス卵で有意に低下していることがわかった。①～④の研究結果より、高齢マウス卵は細胞内カルシウム制御機構の悪化は起きていないことがわかった。高齢マウス卵の受精後の細胞内 ATP 産生の増加は低下していることがわかった。

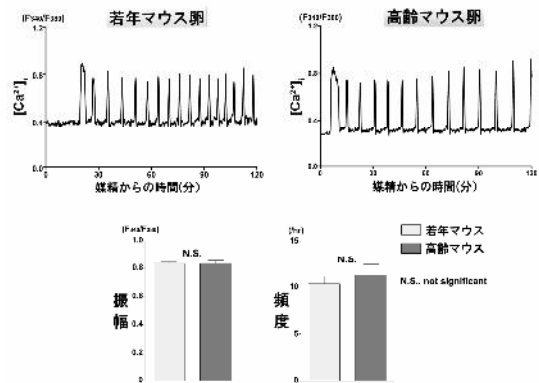


図 4. 若年マウスおよび高齢マウス卵における受精時のカルシウムオシレーション

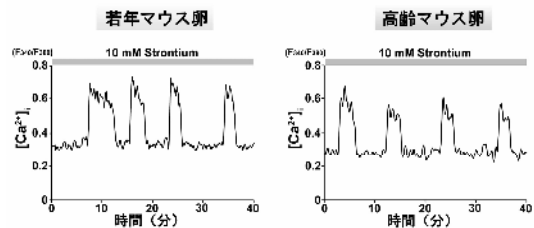


図 5. 若年マウスおよび高齢マウス卵におけるストロンチウムによるカルシウムオシレーション

(3) 平成 24 年度：①胚発育に対するオートファジー経路の関与の検討。オートファジー経路の検出には、オートファゴソームのマーカーである LC3 の発現で評価した。方法は LC3 の免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて LC3 陽性ドット数を算出した。若年マウス卵と高齢マウス卵で比較検討した。LC3 陽性ドット数は未受精卵、2 細胞期胚、4 細胞期胚、桑実胚となるに従い、若年マウスおよび高齢マウスいずれでの胚でも増加した。また、有意差はないものの高齢マウス卵におけ LC3 陽性ドット数は若年マウス卵と比べ増加する傾向が認められた。

②オートファジー経路の促進剤または阻害剤が胚発育に及ぼす影響の検討。若年マウスの受精卵を、オートファジー経路の促進剤である mTOR 阻害剤またはオートファジー経路の抑制剤である 2-methyladenine を培養液中に添加し 5 日間体外培養した。培養 5 日目の胚盤胞到達率を算出した。また、培養後の胚を用い LC3

の免疫蛍光染色を行い、LC3 陽性ドット数を算出した。mTOR 阻害剤添加した受精卵はコントロール群と比べ、有意に胚盤胞発育が低下した。また、mTOR 阻害剤に 2-methyladenine を添加すると、その影響はキャンセルされた。mTOR 阻害剤添加群はコントロールと比べ LC3 陽性ドット数が有意に増加したが、mTOR 阻害剤に 2-methyladenine を添加すると、その影響はキャンセルされた。以上から、加齢マウスでは、オートファジー系路が促進している可能性が示唆された。

(4) 3 年間の研究期間で明らかになったことは以下の 3 点である。①加齢マウス卵由来の受精卵は、若年マウス由来のものとは比べ、ATP 産生に関するエネルギー代謝経路が障害されていることが明らかとなった。②加齢マウス卵におけるエネルギー代謝経路の障害は、これまで我々が研究を行ってきた、排卵後の時間経過による卵の質の低下によるものとはその分子機構が異なっている可能性が示唆された (図 6)。③加齢マウス由来の受精卵はオートファジー系路が促進している可能性が示唆された。しかしながら、当初、実験を予定していた、ヒトの卵・胚の培養液中のメタボローム解析に関しては、遂行することができなかった。

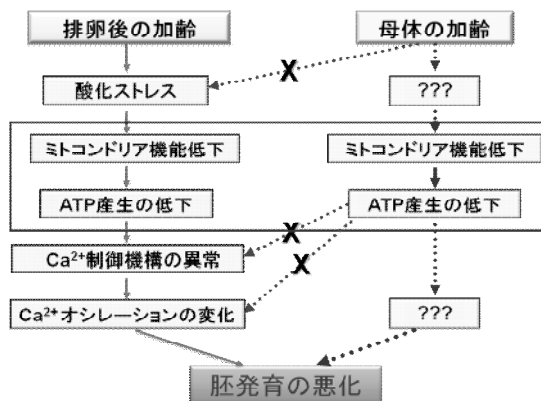


図 6. 排卵後の卵の加齢と母体の加齢による卵の加齢における胚発育悪化のメカニズム (共通点と相違点)

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 5 件)

- ① Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Koki M, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. 査読有り in press

- ② 高橋俊文, 石田博美, 倉智博久, 酸化ストレスと卵の加齢, HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 査読なし, 19, 2012:149-155
- ③ 高橋俊文, 高橋可菜子, 倉智博久, [妊孕能を考える]卵の加齢, 産婦人科の実際, 査読なし, 61, 2012:1885-1890
- ④ 高橋俊文, 前川絢子, 倉智博久, 母体の加齢による卵の加齢のメカニズム, 産科と婦人科, 査読なし, 78, 2011, 929-934
- ⑤ Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Kurachi H. Cellular and molecular mechanisms of various types of oocyte aging. Reprod Med Biol. 査読有り 10, 2011:239-249 10.1007/s12522-011-0099-0

[学会発表] (計 3 件)

- ① 高橋俊文, 卵の加齢の分子機構, 第 64 回日本産科婦人科学会, 神戸ポートピアホテルおよび神戸国際展示場 (神戸市), 2012 年 4 月 13 日
- ② 五十嵐秀樹, 高橋俊文, 原周一郎, 松尾幸城, 倉智博久, 卵の加齢メカニズムにおける小胞体ストレスの関与についての検討, 第 56 回日本生殖医学会, パシフィコ横浜 (横浜市), 2011 年 12 月 8 日
- ③ 五十嵐秀樹, 網田光善, 原周一郎, 堤誠司, 高橋俊文, 倉智博久, 卵加齢メカニズムの新しい概念: マウス卵の加齢に小胞体ストレスが関与する, 第 63 回日本産科婦人科学会, リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場 (大阪市), 2011 年 8 月 29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊文 (TAKAHASHI TOSHIFUMI)
山形大学・医学部・講師
研究者番号: 20302292

(2) 研究分担者

五十嵐 秀樹 (IGARASHI HIDEKI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 80333970

網田 光善 (AMITA MITSUYOSHI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 30420061

倉智 博久 (KURACHI HIROHISA)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 40153366

(3) 連携研究者

なし