

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450400

研究課題名(和文)ウシをモデルとした、加齢リスクを有する卵子を若返らせる手法に関する研究

研究課題名(英文)Possible countermeasures against age-associated deteriorations of bovine oocytes

研究代表者

岩田 尚孝 (IWATA, Hisataka)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：50385499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウシをモデルに用いて、加齢に伴う卵子の能力低下の原因の解明とその制御方法を検討した。遺伝子発現解析の結果、卵子周囲の顆粒層細胞の質が加齢個体で低下し、これを若齢由来に入れ替えると卵子の質が改善した。また加齢個体の卵胞液の性状も卵子に悪影響を与えており、これを変えることで卵子の質が改善することが分かった。加齢に伴い卵子のミトコンドリアの質は低下するが、卵子内にはミトコンドリアの異常を検知して、合成と分解を介して更新するメカニズムの存在を示した。さらにレスベラトロール処理が、ミトコンドリア品質管理機構を介して卵子の質を回復させることが出来ることを示した。

研究成果の概要(英文)：Present study investigated casual factors of the age associated deterioration of oocytes by using cows as a model animal, and showed that granulosa cells and follicular fluids of aged cows induced dysfunctions of oocytes. Results obtained in this study suggest that given granulosa cells and follicular fluid are replaced with those derived from younger cows, developmental competence of the oocytes derived from aged cows would improve. In addition, present study demonstrated the presence of mitochondrial quality control system in oocytes, through which oocytes replenish mitochondria in response to induced mitochondrial dysfunctions. In addition, present study showed that resveratrol induced mitochondrial replenishment by enhancing mitochondrial quality control system.

研究分野：動物生殖学

キーワード：加齢 卵子 ミトコンドリア 卵胞液 顆粒層細胞

1. 研究開始当初の背景

少子化は大きな社会問題であるが、初産年齢の上昇によって、加齢に起因する卵子や胚の異常が増加している。そのため加齢に伴う卵子の質低下の原因解明とその制御方法の解明は喫緊の課題であり、この原因の候補としては卵子内のミトコンドリアの質的、量的減少やそれに起因する活性酸素があるが、加齢に伴う卵子の質低下を惹起している原因は同定されてない。ヒトの卵子の研究には倫理的制約があり、モデル動物の卵子を用いる必要があるが、マウスは卵子の選抜過程や寿命など多くの点がヒトと異なり、良質なモデルとは言えない。そこで長寿でヒトと卵子の形成過程が似ているモデル動物を用いて加齢に伴う質低下の原因を検討しその制御方法を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究ではヒトと卵子の選抜過程や加齢に伴う内分泌的变化が似ており、さらに寿命が長く、多くの検体の入手が可能なウシをモデルにして、加齢に伴い卵子内の変化を詳細にとらえ、ミトコンドリアの質やそれを管理しているメカニズムを解明し、この質を改善する方法及び卵子の質低下を引き起こしている外的要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)加齢個体(120か月以上)卵子の内部で起こっていることの事象を明らかにするためRNAseqを用いて卵子および初期胞状卵胞内の顆粒層細胞について調べた。またATPや活性酸素などミトコンドリアの質について検討した。

(2)卵子周囲の細胞に加齢に伴う質低下が観察されたことから、周囲の細胞が加齢卵子のどのように悪影響を及ぼすのかについて検討した。最初に細胞を未成熟卵子の体外発育系に外挿する培養系を確立し、その後細胞の添加試験を行った。また周囲の環境が卵子の能力に及ぼす影響について明らかにするため加齢もしくは若齢の卵胞液の卵子の質に及ぼす影響を検討した。

(3)研究(1)のレスベラトロールの効果を受けて初期胞状卵胞由来卵子の体外培養系へのレスベラトロールの添加効果について検討した。

(4)ミトコンドリアの異常が卵子において観察された結果から、体細胞にあるミトコンド

リアの品質管理機構が卵子の中にあるのかどうかを検討するため、プタ卵子を Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) にて2時間処理しその後のミトコンドリアの合成機構やマイトファジー、AMP-activated protein kinase (AMPK) や silent mating type information regulation 2 homolog (SIRT1)の活性を比較した。

(5)CCCP処理後AMPKやSIRT1が活性化し、その後ミトコンドリアの合成が起こる結果からSIRT1やAMPKを活性化させるためレスベラトロールや5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide(AICAR)で卵子を体外成熟時に処理し、ミトコンドリアの合成や分解機構および卵子の質を検討した。

4. 研究成果

(1)遺伝子発現を卵核胞期、第2減数分裂中期の卵子および初期胚(>8cell)を用いて若齢と加齢間で比較したところ第2減数分裂中期での遺伝子発現差が大きく、活性酸素による障害やミトコンドリアの機能不全に関連付けられる遺伝子の発現が亢進していた。特に卵の体外授精による受精成績が加齢によって顕著に劣化する事が観察されたためこれを指標にNアセチルシステインや様々な抗酸化剤を添加したが受精成績は改善しなかった。一方でレスベラトロールの添加は受精成績を大幅に改善し、SIRT1の亢進が卵による効果をもたらすと考えられた(参考文献18)。また初期胞状卵胞(直径0.5-0.7mm)を加齢個体と若齢個体から切り出し体外培養すると卵子の発育能力が加齢個体で低く、加齢の影響は未熟な卵子にも及んでいることが明らかになった。さらに遺伝子発現解析によって加齢個体の卵子の顆粒層細胞では遺伝子発現プロファイルが退行卵胞様になっていることもわかり加齢に伴う卵子の質低下も卵子の質低下の原因であると考えた(参考文献15)。

(2)初期胞状卵胞由来の卵子顆粒層細胞複合体(OGCs)に他の個体の顆粒層細胞を追加すると細胞はOGCsに取り込まれ卵子の発育を支持することが分かった。OGCsの細胞を全て入れ替えても卵子の発育が得られることも分かった(参考文献13,14)。この培養系を用いて加齢個体の細胞を若齢の個体のOGCsに追加する実験を行ったところ、面白いことにOGCsの体外発育は加齢個体の細胞を追加した時に低下し、若齢のそれでは影響を受けない結果となった。このため加齢に伴う卵子能力低下の原因は細胞にもあることが示された。卵胞液に関する検討では加齢個体の卵胞液は若齢個体の卵子の能力を損ない、若齢個体の卵胞液は加齢個体の卵胞液の能力を改善する結果を得たため、卵子が曝される卵胞液も卵子の質低下の原因となっていることを示した(参考文献3)。

(3)レスベラトロールを加齢ウシの初期胞状卵胞培養系に添加したところ顆粒層細胞の

遺伝子発現プロファイルが退行様から正常なものに変化した。また体外発育卵子のミトコンドリア数を増やし卵子の能力を改善した。このことからレスベラトロールは細胞に働きかけ OGCs の発育を改善し、ミトコンドリアに働きかけて卵子の発育能力を大きく改善する能力があることを示した(参考文献 10,12)。

(4) 卵子のミトコンドリアの品質管理機構がどのようになっているのかを調べるために卵子をミトコンドリアの脱共役剤 CCCP で処理すると ATP 合成が低下し、リン酸化 AMPK や SIRT1 のタンパク発現が増加し、その後ミトコンドリアの分解と合成が同時に亢進する結果を得たため卵子内部にもミトコンドリアの品質を管理しているメカニズムがあることを示した(文献 9)。

(5) ブタやウシの胞状卵胞卵子の体外成熟培地に SIRT1 や AMPK の活性化剤であるレスベラトロールや AICAR を添加したところレスベラトロールではミトコンドリアの機能が向上し卵子の体外発育能力が改善した。さらにミトコンドリアの合成を促す TFAM の遺伝子発現上昇とミトコンドリア DNA 増加とミトコンドリアの分解を制御するオートファジーが増加することが観察された。そのため、卵子中のミトコンドリア品質管理機構はレスベラトロールによって亢進できることを示した(参考文献 16)。さらに AICAR の添加も卵子のミトコンドリアの機能を改善し卵子の体外発育能力を改善することを示した(参考文献 11)。

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 18 件)

岩田尚孝 卵子の老化とミトコンドリア Hormone Frontier in Gynecology 査読有り 23 巻 inpress
www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0015_2302

Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shiratsuki S, Tasaki H, Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Gene expression of granulosa cells and oocytes in various stages of follicle and in vitro grown oocytes and granulosa cell complexes. J Reprod Dev 査読有り 2016 inpress
doi.org/10.1262/jrd.2016-022

Takeo S, Kimura K, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Age-associated deterioration in follicular fluid induces a decline in bovine oocyte quality Reprod Fertil Dev. 2016 inpress
[doi: 10.1071/RD15228](https://doi.org/10.1071/RD15228).

Tanaka H, Takeo S, Abe T, Kin A, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Liver

condition of Holstein cows affects mitochondrial function and fertilization ability of oocytes. J Reprod Dev. 査読有り 2016 inpress

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26832309>

Iwata H. Age-associated events in bovine oocytes and possible countermeasures Reproductive medicine
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12522-015-0233-5>

査読有り 2016 inpress

竹尾駿・**岩田尚孝** 加齢ウシの卵胞液の性状と卵子の体外成熟 日本胚移植学雑誌 査読有り 37 巻、2015、127-131

http://jets.kenkyuukai.jp/journal2/journal_detail.asp?journal_id=2050

白築章互・**岩田尚孝** 加齢がウシ卵子の発育能力とミトコンドリアに及ぼす影響 日本胚移植学雑誌 査読有り 37 巻、2015、119-125

http://jets.kenkyuukai.jp/journal2/journal_detail.asp?journal_id=2050

伊丹暢彦・**岩田尚孝** ウシ卵巣中の卵胞数と加齢の関係 日本胚移植学雑誌 査読有り 37 巻、2015、113-117

http://jets.kenkyuukai.jp/journal2/journal_detail.asp?journal_id=2050

Itami N, Shiratsuki S, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Mitochondrial biogenesis and degradation are induced by CCCP treatment of porcine oocytes. Reproduction. 査読有り 150 巻、2015、97-104. doi: 10.1530/REP-15-0037.

Sugiyama M, Kawahara-Miki R, Kawana H, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. J Reprod Dev. 査読有り 61 巻、2015、251-9. doi: 10.1262/jrd.2015-001.

Takeo S, Abe T, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside on the mitochondrial function and developmental ability of bovine oocytes Theriogenology. 査読有り 84 巻、2015 490-7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.013.

Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through SIRT1 activation Theriogenology. 査読有り 83 巻、2015、1360-7. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.01.029.

Oi A, Tasaki H, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, and **Iwata H**. Effects of reaggregated of granulosa cells and oocytes derived from early antral follicles on the properties of oocytes grown in vitro J

Reprod Dev. 査読有り 61 巻、2015、191-7.
doi: 10.1262/jrd.2014-123.

Tasaki H, Munakata Y, Arai S,
Murakami S, Kuwayama T, and **Iwata H.**
The effect of high glucose concentration on
the quality of oocytes derived from
different growth stages of follicles
Journal of Mammalian Ova Reserch. 査読
有り 32 巻、2015、41-48
http://dx.doi.org/10.1274/jmor.32.41

Itami N, Kawahara-Miki R, Kawana H,
Endo M, Kuwayama T, **Iwata H.**
Age-associated changes in bovine oocytes
and granulosa cell complexes collected
from early antral follicles. J Assist
Reprod Genet. 査読有り 31 巻、2014、
1079-88. doi: 10.1007/s10815-014-0251-y.

Sato D, Itami N, Tasaki H, Takeo S,
Kuwayama T, **Iwata H.** Relationship
between mitochondrial DNA Copy
Number and SIRT1 Expression in Porcine
Oocytes. PLoS One. 18 巻、2015、e94488.
doi: 10.1371/journal.pone.0094488.

Santos EC, Sato D, Lucia T, **Iwata H.**
Brilliant cresyl blue staining negatively
affects mitochondrial functions in porcine
oocytes Zygote. 査読有り 23 巻 2015、352-9.
doi: 10.1017/S0967199413000610.

Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y,
Kuwayama T, Kawahara-Miki R, **Iwata H.**
Resveratrol improves the mitochondrial
function and fertilization outcome of bovine
oocytes. J Reprod Dev. 査読有り 60 巻、
2015、92-9 doi: 10.1262/jrd.2013-102

〔学会発表〕(計 12 件)

Abe T, Kobayashi A, Shirasuna K,
Kuwayama T, **Iwata H.** Supplementation
of culture medium with resveratrol
increases developmental rate to the
blastocyst stage concomitant with
increase in ATP content and decrease in
lipid content. Ovarian Club 6 2015.
11 Barcelona Spain

Shiratsuki S, Shirasuna K, Kuwayama T,
Iwata H. Low oxygen tension changes the
metabolism and proliferative activity
of bovine granulosa cells. Ovarian
Club 6 2015.11 Barcelona Spain

Shun T, Abe T, Shirasuna K, Kuwayama T,
Iwata H. Maternal aging affects
mitochondrial turnover in bovine
oocytes. Ovarian Club 6 2015.11
Barcelona Spain

Tasaki H, Itami N, **Iwata H.**
Acquisition of meiotic competence in
porcine secondary follicles following
long-term culture 2014.9 World
congress of reproductive biology

Edinburgh

Takeo S, Kutwayama T, **Iwata H.** The
age-associated deterioration in the
follicular fluid induces a decline in
bovine oocyte quality 2014.9 World
congress of reproductive biology
Barcelona, Spain

Itami N, Kuwayama T, **Iwata H**
Resveratrol enhances the in vitro
development of oocytes derived from
early antral follicles 2014 World
congress of reproductive biology
Barcelona, Spain

谷津恵、白砂孔明 桑山岳人 **岩田尚孝**
卵子中の障害を受けたミトコンドリアは
作り変えられる H25.8 第 107 回日本繁
殖生物学学会 帯広

白砂孔明 桑山岳人 **岩田尚孝** レスベ
ラトロール添加がブタ初期卵状卵胞卵子
の体外発育に及ぼす影響 H25.8 第 107
回日本繁殖生物学学会 帯広

伊丹暢彦 白砂孔明 桑山岳人 **岩田尚
孝** レスベラトロールが加齢ウシ初期卵
状卵胞卵子に及ぼす影響 H25.8 第 107
回日本繁殖生物学学会 帯広

川名宏典 白砂孔明 桑山岳人 **岩田尚
孝** 体外成熟中の AMPK の活性化がウシ
卵子の体が培養成績とミトコンドリアに
及ぼす影響 H25.8 第 107 回日本繁
殖生物学学会 帯広

岩田尚孝 卵子老化に関わる因子と老化
素子の可能性 H25.7 32 回日本受精着
床学会 東京

田崎秀尚・大井綾乃・門司恭典、桑山岳
人、**岩田尚孝** レスベラトロールは卵子
内のミトコンドリアを SIRT1 を介して更
新し卵子の質を改善する H25.3 日本畜
産学会 筑波

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者
岩田 尚孝 (IWATA Hisataka)
東京農業大学・農学部・教授
研究者番号：50385499

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：