

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462550

研究課題名(和文) リピドミクスと脂質代謝制御を基盤とした加齢による卵の質の低下に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment strategy for age-related decline in oocyte quality by analyzing lipid metabolism

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：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。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。本研究は、リピドミクスと脂肪酸代謝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脂質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 mechanisms of oocyte aging due to ovarian aging remain unknown. In the present study, we examined the molecular mechanisms of age-related decline in oocyte quality by analyzing lipid metabolism.

研究分野：医歯薬学

キーワード：卵の加齢 リピドミクス ミトコンドリア ベータ酸化 脂肪酸

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) 加齢卵における遺伝子発現を網羅的に調べた報告によると、加齢マウスの卵は若年の卵と比べ、ミトコンドリア機能、酸化ストレス制御、細胞周期、DNAの安定化に関する遺伝子の発現が低下していた (Hamatani et al. Hum Mol Genet 2004)。実際、卵の加齢により、ミトコンドリアの形態学的な変化、ミトコンドリアDNAのコピー数の低下や突然変異の増加が報告されている。しかしながら、ミトコンドリアの最も重要な機能であるエネルギー代謝と卵の加齢に関する詳細な検討はほとんど存在しない (Miao et al. Hum Reprod update 2009)。

(3) 我々は“卵の質の低下”は、ミトコンドリア機能低下によるエネルギー (アデノシン三リン酸, ATP) 産生の低下が一因であることを報告してきた (Takahashi et al. Reprod Med Biol 2011)。卵および受精後の胚は、ピルビン酸等の糖質が主なエネルギー源である。一方、脂肪酸はミトコンドリア内でβ酸化を受けアセチル CoA となるが、糖質と比べ高いエネルギー産生能 (約6倍) を有している。脂肪酸は、エネルギー代謝、アポトーシス、脂質メディエーターなどの制御機構を介して、“卵の質の維持”に重要な役割を發揮している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、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、糖質代謝制御機構、脂質代謝制御機構の変化を解析し、ミトコンドリア機能制御を基盤とした“卵の質の低下”に対する臨床応用可能な予防・治療法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

実験の材料として、若年マウス(3-4ヶ月齢)と加齢マウス(13-15ヶ月齢)から採取した卵、または“卵の質の低下”モデルである排卵後の加齢卵を用いて以下の実験を行った。

(1) 平成25年度：加齢卵におけるATP産生量とNADH量の低下のメカニズムについての検討、加齢卵におけるリポドミクスを用いた脂質代謝経路の変化の検討。

(2) 平成26年度：加齢におけるアシル CoA 合成酵素発現の変化の検討、加齢卵における carnitine palmitoyl transferase (CPT-1) 発現の変化の検討。

(3) 平成27年度：排卵後加齢卵におけるアシル CoA 合成酵素発現の変化の検討、排卵後加齢卵における carnitine palmitoyl transferase (CPT-1) 発現の変化の検討。

4. 研究成果

(1) 平成25年度は以下の実験を行った。加齢卵におけるATP産生量とNADH量の低下のメカニズムについての検討。加齢マウス卵におけるATP量は若年マウス卵と比べ低下することを明らかにしており、ATP産生の基質となるNADHについて加齢マウス選卵において変化するかどうか検討した。若年マウス卵と加齢マウス卵における、NADHレベルについて、蛍光顕微鏡を用いてその蛍光強度からNADH量を推定した。その結果、加齢マウス卵は若年マウス卵と比べ有意にNADH蛍光強度が低下している結果であった(図1)。

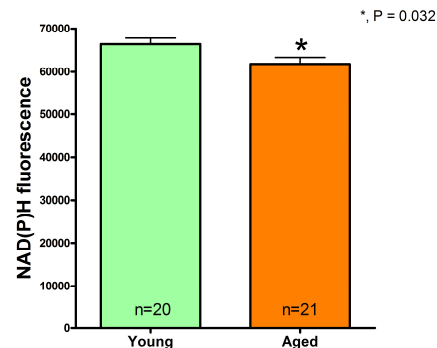


図1. 若年マウス卵および加齢マウス卵におけるNADH蛍光強度

NADH産生にはアセチル CoAが必要である。アセチル CoAはピルビン酸と脂肪酸のβ酸化から産生されるため、加齢卵における糖質代謝機構の律速酵素であるピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase, PDH) の発現および局在について検討を行った。若年マウスおよび加齢マウス卵におけるPDHの発現の変化は糖質代謝機構に重要な影響を与えると考えられる。予備実験の結果、蛋白レベルでのPDHの発現には卵子100個が必要であることが分かった(図2)。

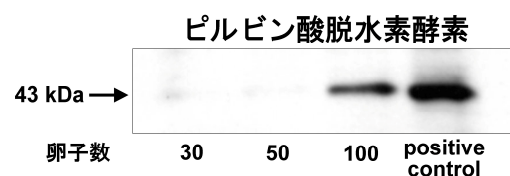


図2. 若年マウス卵におけるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) の発現

この結果から PDH の量的な変化をウエスタンブロット法により確認するには多くの卵子を必要とするため、免疫蛍光染色による PDH の発現の有無と PDH とミトコンドリアとの共局在について検討を行った。ミトコンドリアは MitoTracker Green にて染色し PDH との共局在は共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。その結果、若年マウス卵および加齢マウス卵の PDH は両者ともに発現しており、量的な差は検出することができなかったが、ミトコンドリアと PDH の共局在については、若年マウス卵がその局在を一致させているのに対して、加齢マウス卵ではミトコンドリアと PDH の局在が一致していない卵が認められた (図 3)。

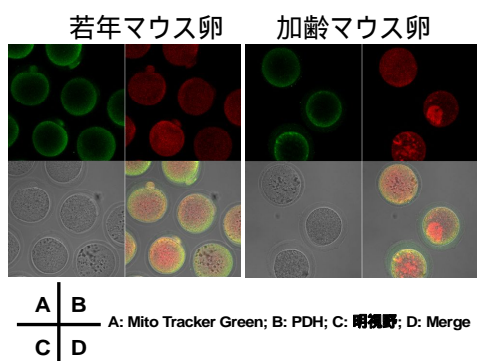


図 3 . 若年マウス卵および加齢マウス卵におけるミトコンドリアと PDH の発現

この結果は、卵の NADH 量と規定する重要な律速酵素である PDH が、加齢卵ではミトコンドリア局所で機能していない可能性を示唆するものである。加齢卵におけるリポドミクスを用いた脂質代謝経路の変化の検討。予備実験の過程で若年マウス卵 100 個を用いることでリポドミクス解析を行うことが可能であることが分かった。しかしながら加齢マウスより採取可能な卵子数は 1 回の実験で 100 個得ることはできなかった。よって、若年マウス卵と加齢マウス卵におけるリポドミクス解析を研究期間中に遂行することは困難であると考えられた。

(2) 平成 26 年度は以下の実験を行った。加齢におけるアシル CoA 合成酵素発現の変化の検討。長鎖脂肪酸は細胞質でアシル CoA 合成酵素によりアシル CoA に変化する。アシル CoA 合成酵素をコードする遺伝子は ASL4 であるが、その mRNA レベルの変化を定量的 PCR 法にて検討した。若年マウス卵と比べ加齢マウス卵では ASL4 mRNA レベルは低下傾向を示したが、統計学的に有意差を得るには至らなかった。その理由として、実験に供する加齢マウス個体の制限によりできなかったことがあげられる。加齢卵における carnitine palmitoyl transferase (CPT-1) 発現の変化の検討。CPT-1 はアシル CoA をカルニチン

と結合させミトコンドリア内へ輸送する律速酵素である。CPT-1 は CPT1A と CPT1B の 2 種類のアイソザイムが存在するが、各々をコードする遺伝子は CPT1A と CPT1B である。それらの mRNA レベルを定量的 PCR 法にて検討した。若年マウス卵を用いて CPT1 のどちらのサブタイプが発現しているか検討したところ、CPT1b mRNA がドミナントであった。若年マウス卵と加齢マウス卵における CPT1b mRNA の発現と検討したところ、加齢マウス卵の CPT1b mRNA レベルは若年マウス卵と比べ低下傾向を示したが、統計学的に有意差を得るには至らなかった。その理由として、ASL4 mRNA の時と同様に実験に供する加齢マウス個体の制限によりできなかったことがあげられる。

(3) 平成 27 年度は以下の実験を行った。平成 26 年度の実験結果から、実験に用いる加齢マウスの制限から、アシル CoA 合成酵素 (ASL4) および CPT1 の発現の変化を捉えることができなかったため、“卵の質の低下”モデルとして、排卵後加齢卵を用いた検討を行うこととした。排卵後加齢卵におけるアシル CoA 合成酵素発現の変化の検討。ASL4 mRNA レベルは新鮮卵と比べ排卵後の加齢卵で有意に低下していることが分かった。排卵後加齢卵における carnitine palmitoyl transferase (CPT-1) 発現の変化の検討。ASL4 mRNA 同様、CPT1b mRNA レベルは新鮮卵と比べ排卵後の加齢卵で有意に低下していることが分かった。これらの実験結果から、“卵の質の低下”モデルである排卵後の加齢卵では、脂質代謝によるエネルギー供給系路が悪化している事が示唆された。

(4) 3 年間の研究機関で明らかになったことは以下の点である。加齢マウス卵は ATP 合成の基質である NADH 量が低下しているが、そのメカニズムとして、糖質代謝の律速酵素である PDH の発現がミトコンドリアと共局在していないこと、すなわちミトコンドリア内へピルビン酸を効率的に導入することが障害されている可能性が示唆される。脂肪酸代謝経路 (β-酸化) で重要な酵素であるアシル CoA 合成酵素および CPT1 の発現を検討したところ、加齢マウス卵でそれらの mRNA 発現レベルが低下している傾向が認められた。また“卵の質の低下”モデルである排卵後加齢卵においてアシル CoA 合成酵素および CPT-1 の mRNA 発現レベルの低下が確認された。脂肪酸の代謝経路の変化を明らかにする目的でリポドミクス解析を行ったが、加齢マウスから分析に必要な卵を得ることが困難であった。今後、分析技術の進歩により単一卵子での解析が可能となれば、ミトコンドリアより上位のレベルで脂質代謝経路での変化を捉えることが可能かもしれない。

これらの結果から、加齢による“卵の質の低

下”のメカニズムの一つとして、糖代謝エネルギー経路の障害が起きていることが考えられ、さらに脂肪酸をエネルギーに変換する経路であるミトコンドリア内でのβ酸化機構に異常が起きている可能性が示唆された。本研究の結果を踏まえ、脂肪酸のβ酸化機構を標的とすることが、加齢による“卵の質の低下”を改善可能かどうか今後も研究を継続予定である。

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9件)

Hasegawa A, Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Matsukawa J, Nagase S. Predictive factors for oocyte retrieval failure in controlled ovarian hyperstimulation protocols: a retrospective observational cohort study. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:53 査読有

Igarashi H, Takahashi T, Nagase S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. *Reprod Med Biol*. 2015;14:159-169 査読有

Hara S, Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Matsuo K, Hasegawa A, Kurachi H. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonists prevent tumor necrosis factor-α-mediated inhibition of FSH-induced follicle development and estradiol production in a preantral follicle culture system. *Journal of Mammalian Ova Research* 2014;31(1):2-11 査読有

Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Amita M, Matsuo K, Hasegawa A, Kurachi H. Brachial-to-ankle pulse wave velocity as an independent prognostic factor for ovulatory response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res* 2014;7:74 査読有

高橋俊文、倉智博久. 臨床医学の展望 2014 産科学・生殖医学. 日本医事新報 2014;4691:26-31 査読無

高橋俊文. 卵巣の aging と妊孕能 卵の加齢のメカニズム. 日本産科婦人科学会雑誌 2014;66(5):1328-1334 査読無

Matsuo K, Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Amita M, Kurachi H. Effects of different trehalose concentrations in a warming medium on embryo survival and clinical outcomes in vitrified human embryos. *Gynecol Obstet Invest* 2013;76(4):214-220 査読有

Hara S, Takahashi T, Amita M, Matsuo K, Igarashi H, Kurachi H. Pioglitazone

counteracts the tumor necrosis factor-α inhibition of follicle-stimulating hormone-induced follicular development and estradiol production in an in vitro mouse preantral follicle culture system. *J Ovarian Res* 2013;6(1):69 査読有

Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. *J Obstet Gynecol Res* 2013;39(10):1431-1439 査読有

[学会発表](計3件)

五十嵐秀樹. カルシウムオシレーションの役割と有効な卵子活性化法. 第6回生殖補助医療胚培養士セミナー TFT ビル東館 9階 臨時研修室(東京都江東区) 2014年10月5日

五十嵐秀樹、高橋俊文、倉智博久. 加齢に伴う卵の質の低下と酸化ストレスの関与. 第58回日本生殖医学会学術講演会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2013年11月15日

五十嵐秀樹、倉智博久. 加齢に伴う卵の質低下と「卵の若返り」を目的としたミトコンドリア移植の試み. 第13回日本抗加齢医学会総会 パシフィコ横浜 会議センター(神奈川県横浜市) 2013年6月29日

[図書](計1件)

高橋俊文. 生殖医療ポケットマニュアル(大須賀 穰、京野廣一、久慈直昭、辰巳賢一編) 医学書院 2014:P13-32

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

堤 誠司 (TSUTSUMI, Seiji)
山形大学・医学部・講師
研究者番号: 50323168

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

原 周一郎 (HARA, Shuichiro)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 10436230

(3)連携研究者

なし