

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450458

研究課題名(和文)ニコチンアミドによるマウス卵子老化抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism underlying delayed mouse oocyte aging by nicotinamide

研究代表者

岸上 哲士(KISHIGAMI, Satoshi)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10291064

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)：哺乳類の成熟卵子は排卵後に一定時間内に受精が起こらなければ、継時的に老化し受精能や個体発生能を喪失する。この現象は、「排卵後の卵子の老化(postovulatory oocyte aging)」とよばれ、発生工学分野や不妊治療において重要な課題となっている。本研究では、卵子老化機構を解明し老化抑制機構の新たな技術開発を目指し、体細胞を用いた卵子老化過程の解析ならびに卵子老化抑制に関わるシグナルや化合物について研究を行った。その結果、体細胞が卵子老化過程の特に細胞骨格に影響すること、新規シグナルとしてmTORシグナルが卵子老化に関与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In most mammals, without fertilization, the ovulated metaphase II arrested oocytes rapidly lose their developmental potential following ovulation, which is called postovulatory oocyte aging often with characteristic phenotypes such as cytoplasmic fragmentation, abnormal spindle shapes and chromosome misalignments. Accumulating data suggest that many failures in assisted reproduction technologies (ART) are related to oocyte aging. Thus, elucidation of molecular mechanisms underlying oocyte aging and development are important to improve ART. In this study, we addressed how somatic cells impact on oocyte aging after nuclear transfer. Unexpectedly, no acceleration in oocyte aging was observed but distinct phenotypes were found in terms of cytoskeleton. We also examined whether some unknown signals contribute to oocyte aging to find that mTOR signal negatively regulates oocyte aging. Thus, these findings provide new insight for oocyte aging.

研究分野：発生工学

キーワード：哺乳類卵子 排卵後の老化抑制 アセチル化修飾

1. 研究開始当初の背景

卵胞内で成熟した卵子は、排卵後卵管内または試験管内で一定の時間内(マウスでは8~12時間)に受精しなければ受精能および発生能を失い退行することが知られている。これは「排卵後の卵子の老化(postovulatory oocyte aging)」とよばれ、発生工学分野や不妊治療において重要な課題となっている。一方、近年特に不妊治療の分野で問題となっている個体の高齢化においてもその卵子の発生能が低下することが明らかになっており、これは「個体老化による卵子の老化」とよばれ区別される。しかしながら、これら2つの異なる卵子の老化は、異なる原因による卵子の老化にも関わらず共通する表現型があることが近年明らかになりつつある。このように**卵子の老化にともなう発生能の低下は、深刻な問題であり、卵子老化機構の解明、老化抑制技術の開発、老化卵子の発生能回復技術の開発は緊急の課題**である。

これまでの研究から、成熟卵子は老化ともなっており、透明帯の硬化、表層顆粒の減少、マイクロフィラメントの喪失、紡錘体の伸長、ミトコンドリアの膜電位の低下などさまざまな細胞生理学的変化が報告されている(Miao et al. 2009)。さらに近年、**卵子の老化にともないDNAメチル化の喪失やヒストンアセチル化の亢進が報告され、卵子が老化にともないエピジェネティックな変化を引き起こす**ことが明らかとなり発生能の喪失の主要な原因の一つと考えられている(Liang et al. 2012)。試験管内で卵子の老化を抑制する方法として、一酸化窒素(NO)、プロテアソームの阻害剤MG132、カフェイン(caffeine)やピルビン酸等が報告されている(Liang et al. 2012)が、それぞれ作用点異なり、現在まで卵子老化の詳細な分子機構は明らかになっていない。

タンパク質のアセチル化は、リン酸化とならび主要な翻訳後修飾の一つであり、さまざまなタンパク質の機能制御に重要な役割を果たしている。標的タンパク質のアセチル化は、それぞれ特異的なヒストンアセチル基転移酵素(HAT)およびヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)により特定のリシン残基がアセチル化および脱アセチル化されることで可逆的にその機能が制御されている。卵子にはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が豊富に発現しており、卵子の減数分裂や受精後の初期発生においても重要な働きをしていることが示されている。これまで研究代表者は、発生におけるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の働きに着目し研究し、HDACの阻害剤の一つであるトリコスタチンA(TSA)により体細胞クローン胚を一定時間処理することで出生率を6倍以上に向上することに成功し(Kishigami et al. 2006)、また成熟卵子はHDACにより極端に低アセチル状態にあることや卵子活性化によりHDAC活性が低下し高アセチル化に誘導されることを

明らかにしている(Matsubara et al. 2013)。さらに、卵子をクラスIIIのHDACであるサーチュインの阻害剤であるニコチンアミドにより処理することで卵子老化の表現型である紡錘体の伸長やアポトーシスが抑制されることを見出した(Lee et al. 2013)。このように卵子のアセチル化制御は活性化後の発生および卵子老化に過程に深く関与していることが示されているが詳細な機構は不明である。

文献

- Kishigami S, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 340:183-189 (2006).
 Lee AR, et al. *J Reprod Dev*, 59:238-244 (2013).
 Liang X, et al. *Sci China Life Sci*, 55:670-676 (2012).
 Matsubara K, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 434:1-7 (2013).
 Miao K, et al. *Hum Reprod Update*, 15:573-585 (2013).

2. 研究の目的

本研究課題は、卵子の老化抑制の機構の解明と老化抑制技術の開発を目指していた。最初に卵子に比べて老化していると考えられる成体由来体細胞を注入することで、卵子の細胞骨格や老化の指標である紡錘体の形態およびアセチル化チュープリンの挙動に与える影響について詳細な解析を行った。また培養細胞ではサーチュインの標的の一つとして知られているmTORシグナルの卵子老化への影響を調べた。

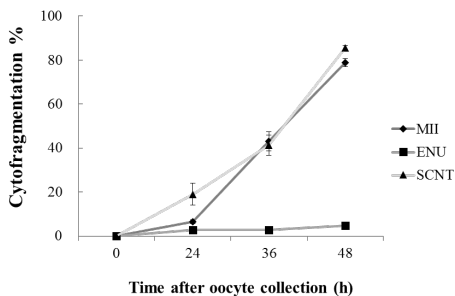
3. 研究の方法

- (1) 体細胞は卵子に比べてアセチル化レベルが高く維持される機構を持っている。そこで、卵子に体細胞を入れることで卵子老化過程にどのような影響するか調べた。過剰排卵処理をしたB6D2F1マウス由来の卵子(MII)、除核卵子(ENU細胞質のみ)、除核後体細胞核移をおこなった体細胞卵子(SCNT)を用意し、経時変化を48時間培養することで卵子細胞質の断片化(アポトーシス)率を調べた。
- (2) 断片化に体細胞がどのように影響するか明らかにするため、断片化した卵子を分類し、MII, ENU, SCNTの各実験区で調べた。
- (3) 老化卵子のチューブリンおよび老化卵子の指標のアセチル化チューブリンの状態を、各抗体を用いて蛍光免疫染色により調べた。
- (4) (3)と同様の方法で、紡錘体の形態を詳細に調べた。
- (5) 各実験区について抗アクチン抗体を用いて、細胞骨格の老化に伴う変化について検討を行った。
- (6) ニコチンアミドの阻害標的である

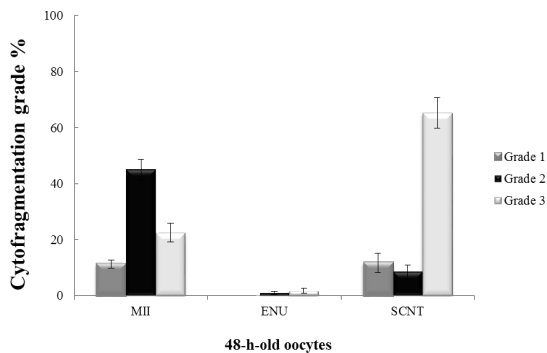
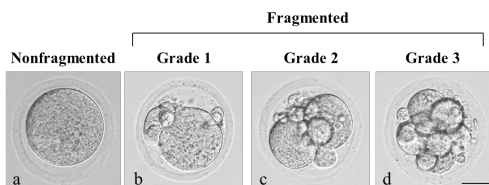
Sirtuin1 の作用点の一つが mTORC2 であることが知られている。そこで、mTOR の阻害剤である PP242 の様々な濃度を用いて、ニコチンアミドと同様に卵子断片化抑制効果を調べた。過剰排卵処理をした ICR マウス雌より新鮮排卵卵子を用意し、上記と同様に様々な濃度の PP242 の存在下で培養により老化させ卵子細胞質の断片化 (アポトーシス) 率への影響を検討した。

4. 研究成果

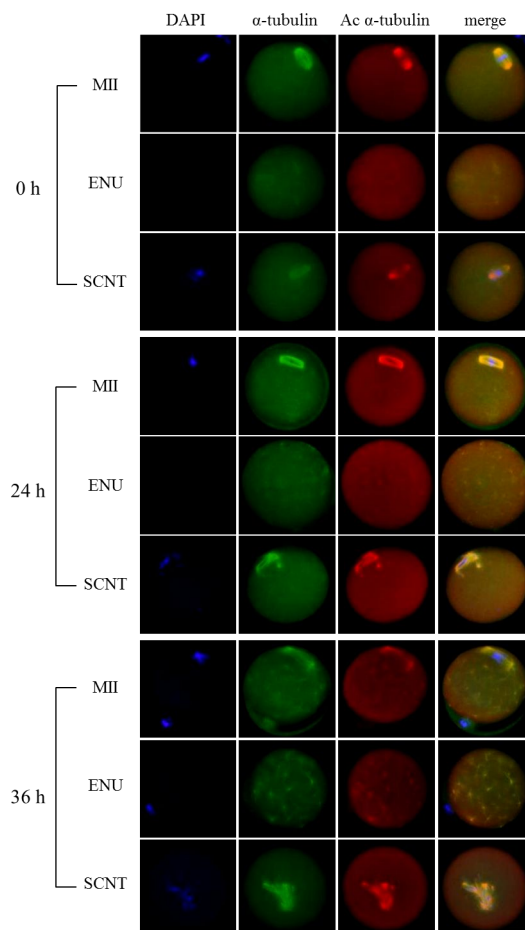
(1) 卵子 (MII) 除核卵子 (ENU 細胞質のみ) 体細胞卵子 (SCNT) のうち、MII 卵子に比べて一部の SCNT 卵子は 24 時間培養で断片化が認められたことから、一部の卵子では注入された体細胞因子が卵子の老化過程に影響することが示唆された。しかし、36 時間および 48 時間で断片化に大きな違いは見られなかったことから体細胞による卵子の老化への影響は一部の卵子に限られることが明らかとなった。一方、除核した卵子 (ENU) は既報と一致して、断片化がみられなかった。



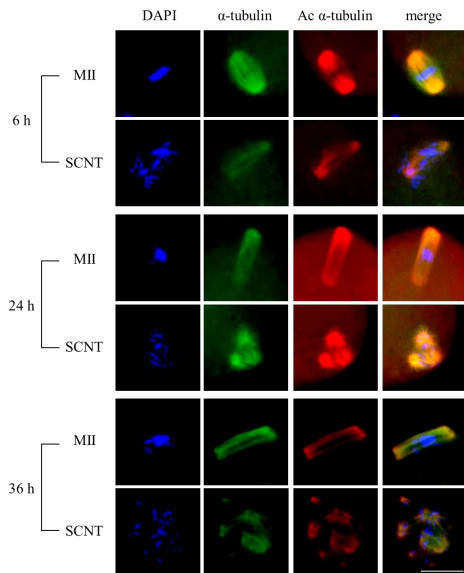
(2) 卵子の断片化を以下の Grade1 から 3 の 3 つに分類して調べたところ、体細胞卵子は、通常の MII 卵子および除核卵子よりも断片化が細かいことが明らかとなった。このことから細胞骨格および紡錘体の影響が考えられた。



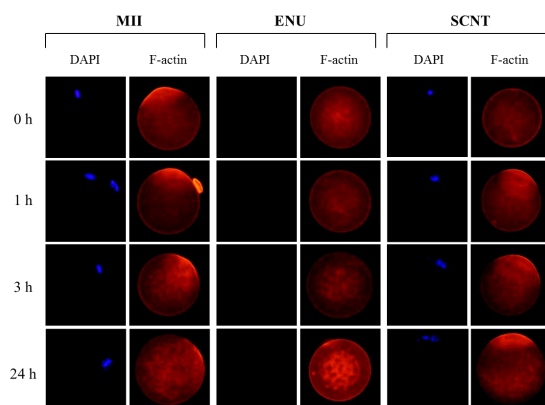
(3) 老化卵子において チューブリンおよび老化の指標であるアセチル化 チューブリンの状態を調べたところ、下図の通り、24 時間老化においてアセチル化 チューブリンのパターンに大きな違いが見られなかったことから、チューブリンのアセチル化は、24 時間では体細胞の影響が少ないことが明らかとなった。一方、36 時間老化においては、細胞質に MII 卵子および ENU 卵子において星状体様の構造が多数出現したのに比べ、SCNT 卵子ではあまり見られなかった。このことから細胞死が始まる 36 時間において細胞質の細胞骨格の制御に違いがあることが示唆された。



(4) さらに紡錘体の詳細な形態を調べたところ、通常の卵子に老化に見られる伸長した紡錘体ではなく、24 時間以降すべての老化した SCNT 卵子は多極の紡錘体を有することが明らかとなった。



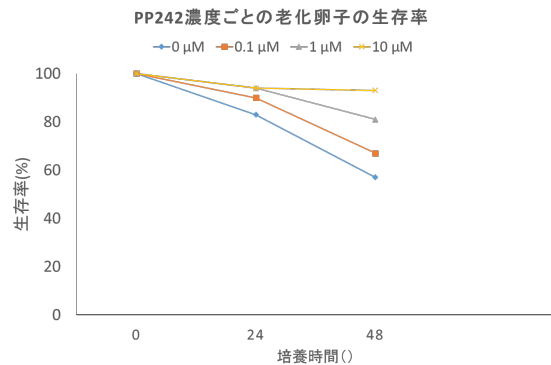
(5) 次に、もう一つの細胞骨格であるアクチンについて検討を行った。通常の老化卵子過程では、アクチン線維は、老化に従い、卵子の一部に局在しているアクチン(アクチンキャップ)も崩壊する。しかし、SCNT 卵子では 24 時後の卵子においてもアクチンキャップが維持されていることが明らかとなった。



以上の結果から、通常の MII 卵子と体細胞由来核をもつ SCNT 卵子では紡錘体および細胞質の両方で全く異なる老化過程を経ることを明らかにすることができた。しかし、今回

チュープリンのアセチル化のレベルに大きな違いはないことから、卵子に注入された体細胞は卵子のアセチル化制御機構に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

(6) 卵子の断片化を、0.1 μM から 10 μM PP242 の卵子の断片化の抑制効果を検討した結果は、次の通りであり濃度依存的に抑制効果が示された。



これらの結果から、ニコチンアミドの卵子抑制効果の標的の一つの可能性が mTOR であること、また卵子では細胞の栄養センサーである mTOR が卵子細胞の寿命を決めている新たな可能性が示唆された。

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 2 件)

Kuwayama H, Tanabe Y, Wakayama T, Kishigami S. Birth of cloned mice from vaginal smear cells after somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. 2017, 94, 79-85. 査読有

Lee AR, Shimoike T, Wakayama T, Kishigami S. Phenotypes of Aging Postovulatory Oocytes After Somatic Cell Nuclear Transfer in Mice. *Cell Reprogram*. 2016, 18, 147-53. 査読有

[学会発表](計 1 件)

桑山拓樹、田邊圭啓、若山照彦、岸上哲士、隆垢細胞を用いたクローンマウス産仔の作出と検討, 第 109 回日本繁殖生物学会大会、2016 年 9 月 14 日、東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸上 哲士 (KISHIGAMI, Satoshi)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：10291064

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし