

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462474

研究課題名(和文)酸化ストレスと小胞体ストレスの制御による高齢不妊症患者のための新たな治療法の確立

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for reproductive aged women by regulation of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress

研究代表者

五十嵐 秀樹 (IGARASHI, Hideki)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：80333970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス排卵後加齢卵(加齢卵)を用い、小胞体ストレス(Endoplasmic reticulum stress: ERS)の制御が胚発生を改善するかを検討した。ERS時に発現する分子シャペロンであるGRP78の発現が未受精卵で最も強かったことから、加齢未受精卵をERS制御物質であるsalubrinalで処理し、体外受精後の胚発生を観察した。異常発生胚は未処理卵に比較して有意に減少した。また、桑実胚、胚盤胞、孵化胚盤胞の発生が有意に改善した。Salubrinal処理卵ではPERK経路下流のeIF2の脱リン酸化が抑制によりERSが制御され、加齢卵の胚発生が改善したと推測された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether poor embryo development of in vivo aged mouse oocytes (aged oocytes) could be improved by regulation of endoplasmic reticulum stress (Endoplasmic reticulum stress: ERS) or not. Because expression level of GRP78 (molecular chaperone induced by ERS) was the highest in unfertilized oocytes, we treated unfertilized aged oocytes with salubrinal (inhibitor of ERS) before IVF. Salubrinal treated aged oocytes showed significantly decrease in abnormal embryos and significantly increase in morula, blastocysts and hatched blastocysts. Regulation of ERS due to inhibition of dephosphorylation of eIF2 -PERK pathway by salubrinal might improve embryo development of aged oocytes.

研究分野：生殖医学

キーワード：マウス 加齢卵 小胞体ストレス salubrinal

1. 研究開始当初の背景

女性の社会進出が進むなかで女性の晩婚化は進み、女性の平均初婚年齢は 1990 年の 25.9 歳から 2012 年の 29.2 歳まで上昇した (厚生労働省、人口動態統計より)。さらに、第 1 子出生時の母の平均年齢は 1990 年の 27.0 歳から 2011 年の 30.1 歳まで上昇した (厚生労働省、人口動態統計より)。結果、生殖医療 (ART: Assisted Reproductive Technology) の現場では高齢不妊症患者の増加が著しく、我が国の ART の治療周期数は 35 歳以上が約 76% を占めるまでとなった (日本産科婦人科学会、2011 年生殖補助医療データブック)。35 歳以上では妊娠率が低下と流産率の増加により生産率が低下する。これに対して米国で行われている、若年患者からのドナー卵を用いた ART の治療成績は母体年齢の影響を受けない。この結果は高齢不妊症患者の治療成績の低下が子宮やホルモン環境よりも卵の加齢に大きく起因することを示唆する。しかし、この卵の加齢による不妊症は現在の ART では克服できず、メカニズムの解明と治療法の開発が喫緊の課題となっている。

一方、がん、動脈硬化症、糖尿病、神経変性疾患など加齢関連疾患に小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress: ERS) が関与することが報告されている。ERS に対する防御機能である小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) は、細胞の恒常性を維持する一方、変性タンパク質が過剰に蓄積し、ERS が UPR を超えて増強するとアポトーシスを誘導する。この ERS の卵加齢メカニズムへの関与は明らかとされておらず、ERS の卵加齢の関係を明らかとすることは加齢卵に対する治療の開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

卵加齢メカニズムへの ERS の関与を明らかとすること、そして ERS 制御が加齢卵の胚発生を改善するか否か検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス配偶子の準備

マウス排卵後加齢卵は 4-6 週齢 B6C3F1 雌マウスより通常の過排卵処理により採取した。“新鮮卵”を hCG 投与 14 時間後、“加齢卵”を hCG 投与後 20-24 時間後に採取した卵と定義した。マウス精子は 8-10 週齢 ICR 雄マウスより採取し、体外受精に用いた。

(2) 新鮮卵への ERS 誘導が体外受精結果に及ぼす影響の検討

Thapsigargin (Tg: 小胞体カルシウムポンプ阻害剤) 5 μM を 2 時間処理、Tunicamycin (Tu: タンパク質糖鎖合成

阻害剤) を 0.5 または 5.0 μg/ml で 4 時間処理することで ERS 誘導を行った。ERS 誘導卵の体外受精を行い、胚発生への影響を検討した。

(3) ERS の評価

ERS の評価は GRP78 (ERS 時に誘導される分子シャペロン) の発現強度をウエスタン・ブロッティングで評価した。

(4) 加齢卵の ERS 制御方法

ERS 制御は Salburinal (sal) により行った。Sal は以下のメカニズムで ERS を制御する。

Sal は PERK 経路下流の eIF2 の脱リン酸化を阻害する。

eIF2 は持続的にリン酸化され、持続的にタンパク質の翻訳を抑制する。

小胞体の作業負荷が軽減され、小胞体ストレスが制御される。

(5) Sal による ERS 制御下での体外受精と胚培養方法

方法 1. 体外受精後に処理

体外受精終了後に、KSOM に 1、5、10 μM の Sal を添加し胚培養を行う。

方法 2. 体外受精前に処理

体外受精前に 1、5、10 μM の Sal を添加して 1 時間処理し、体外受精後は KSOM で胚培養を行う。

(6) Sal による PERK 経路下流シグナル eIF2 の脱リン酸化抑制の効果の評価

eIF2 と phospho(p)-eIF2 の発現をスタン・ブロッティングで評価した。

4. 研究成果

結果

(1) ERS 誘導の体外受精後の受精率と胚発生に及ぼす影響

新鮮卵と加齢卵の体外受精後の胚発生は、加齢卵で受精率の低下とその後の胚発生の悪化が認められた (図 1)。Tg により ERS を誘導した卵では受精率の低下とその後の胚発生の悪化が認められた (図 2)。一方、Tu による ERS 誘導卵では 0.5 μg/ml で胚盤胞以降の胚発生が有意に悪化した。5.0 μg/ml では受精率の低下、その後の胚発生も悪化した。特に桑実胚以降の胚発生は著しく悪化した (図 3)。

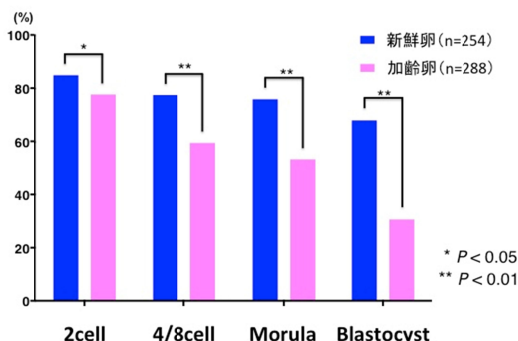


図 1. 新鮮卵と加齢卵の体外受精後の胚発生

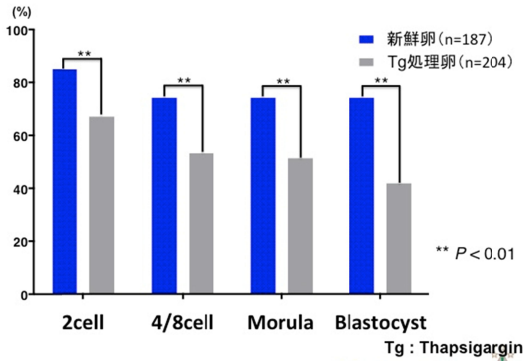


図2. Thapsigargin(Tg)によるERS誘導卵の体外受精後の胚発生

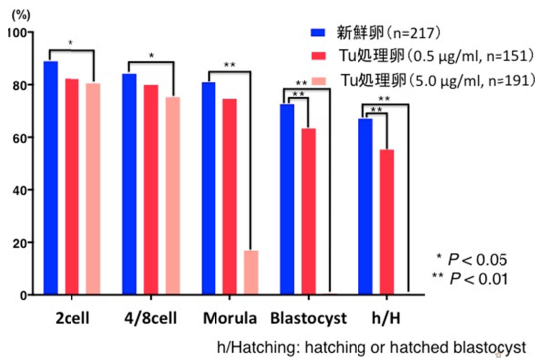


図3. Tunicamycin(Tu)によるERS誘導卵の体外受精後の胚発生

- (2) 体外受精後の胚発生とERS発現の検討
未受精卵(MII卵)体外受精後の胚発生に伴うERSの変化をGRP78の発現により検討した。GRP78の発現は未受精卵、1細胞胚で最も強く、その後の胚発生に伴い減弱した(図4)。

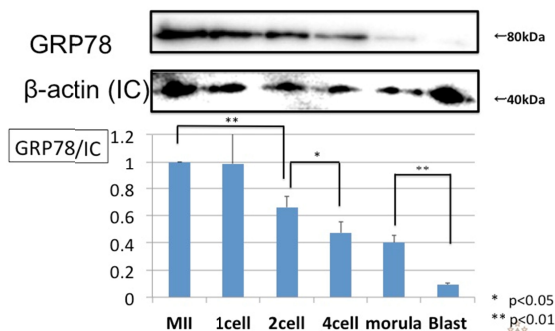


図4. 胚発生に伴うGRP78発現の変化

- (3) 新鮮卵と加齢卵のERSの比較
新鮮卵、加齢卵、Tg処理新鮮卵(positive control)のERSをGRP78の発現により検討した。加齢卵のGRP78の発現は新鮮卵より有意に増強していた(図5)。

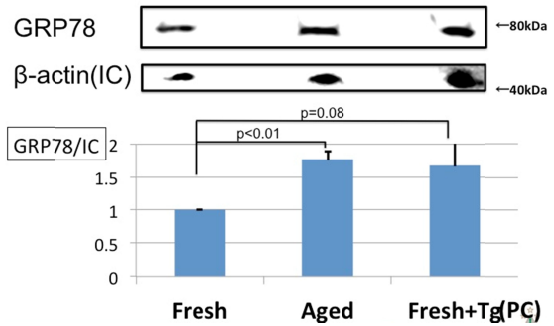


図5. 新鮮卵と加齢卵のGRP78発現の比較

- (4) SalによるERS制御が体外受精後の胚発生に及ぼす影響

方法1. 体外受精後に処理

Sal濃度1、5、10µMどれも未処理の加齢卵と比較して発生不良胚であるfragment胚の発生は有意に減少した。胚発生は1、5µMで桑実胚の発生率が改善したがそれ以降の胚発生は改善されなかった(図6)。

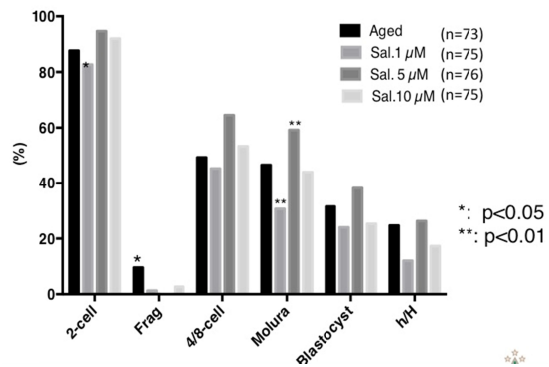


図6. 体外受精後のsal処理によるERS制御が胚発生に及ぼす影響

方法2. 体外受精前に処理

Sal濃度1、5、10µMどれも未処理の加齢卵と比較して発生不良胚であるfragment胚の発生は有意に減少した。胚発生は5µMで桑実胚以降の胚発生が有意に改善した(図7)。

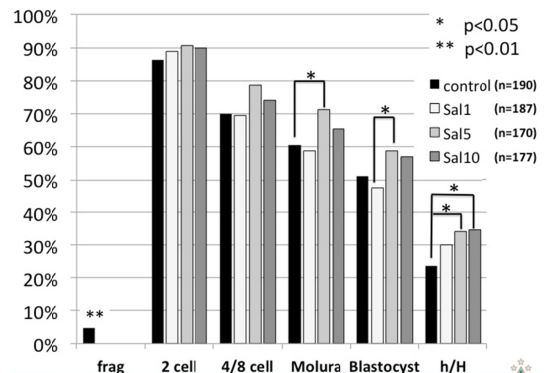


図7. 体外受精前のsal処理によるERS制御が胚発生に及ぼす影響

- (5) SalによるGRP78発現抑制とPERK経路下流シグナルeIF2の脱リン酸化抑制

Sal で 1 時間処理を行った加齢卵では GRP78 発現が未処理卵と比較して有意に減少した。またその後の 4 時間インキュベーションでもその減少効果は変化しなかった (図 8)。さらに PERK 経路下流シグナル p-eIF2 の発現は Sal を 1 時間処理を行った加齢卵で未処理加齢卵よりわずかに増加し、その後の 4 時間インキュベーションでは明らかに増加した (図 9)。

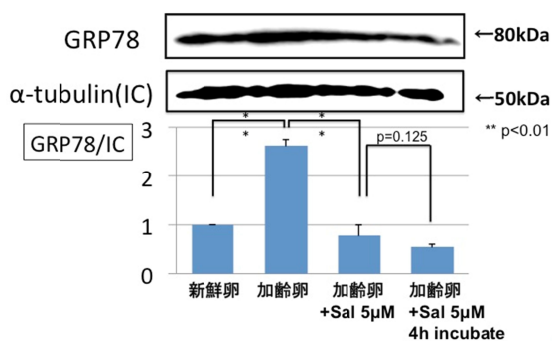


図 8. Sal 処理による GRP78 発現の変化

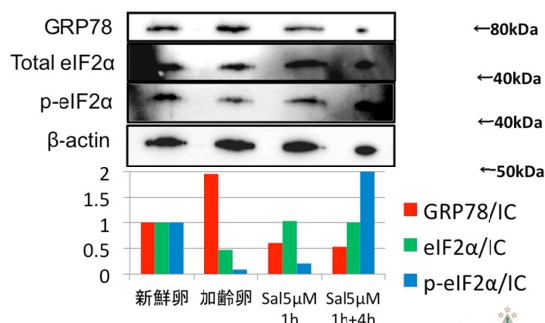


図 9. Sal 処理による eIF2 と p-eIF2 発現の変化

結論

- (1) 加齢卵では新鮮卵より ERS に強く暴露されており、加齢卵の受精率・胚発生の悪化に ERS の関与が示唆された。
- (2) Salubrinal 投与により胚発生が改善したことから、ERS の制御が加齢による卵の質の低下を改善させる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 4 件)

Igarashi H, Takahashi T, Abe H, Nakano H, Nakajima O, Nagase S. Poor embryo development in post-ovulatory *in vivo*-aged mouse oocytes is associated with mitochondrial dysfunction, but mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation. Hum Reprod. 31, 2331-2338, 2016. 査読有 .

Kurosawa H, Utsunomiya H, Shiga N, Takahashi A, Ihara M, Ishibashi M, Nishimoto M, Watanabe Z, Abe H, Kumagai J, Terada Y, Igarashi H, Takahashi T, Fukui A, Suganuma R, Tachibana M, Yaegashi N. Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption. Hum Reprod 31, 2321-2330, 2016. 査読有 .

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. 13: 53, 2015. 査読有 .

Igarashi H, Takahashi T, Nagase S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. Reprod med Biol. 09 May 2015. DOI: 0.1007/s12522-015-0209-5. 査読有 .

〔学会発表〕(計 1 件)

Igarashi H, Takahashi T, Amita M, Hasegawa H. Impact of endoplasmic reticulum stress on the postovulatory aging of the mouse oocyte. 70th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. Honolulu (Honolulu convention center), Hawaii, USA, October 18-22, 2014 (発表 2014 年 10 月 20 日) .

〔その他〕

ホームページ等

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-20591905/20591905seika.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

高橋 俊文 (TAKAHASHI, Toshifumi)
公立学校法人福島県立医科大学・ふくしま子ども・女性医療支援センター・教授
研究者番号 : 20302292

網田 光善 (AMITA, Mitsuyoshi)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センター・医員
研究者番号：30420061

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
松尾 幸城 (MATSUO, Koki)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：90594317