

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670733

研究課題名(和文)女性生殖器に特有の再生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of tissue regeneration in female reproductive organs

研究代表者

宮戸 健二(MIYADO, Kenji)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・室長

研究者番号：60324844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞増殖因子(以下、VEGF-A)は血管新生を司るサイトカインで、子宮内膜の再構築に中心的な役割を果たしている。我々の研究から、不妊症患者の子宮内液中のCD9の量が有意に低下するという結果が得られた。さらに、子宮内膜上皮からマイクロエクソソームと共にVEGF-Aが放出されることが明らかになった。また、CD9欠損マウスでは、受精の膜融合異常の他に、子宮内膜再構築にも異常が生じ、産仔の小型化が認められた。さらに、VEGF-Aを子宮内腔に注入したところ、出産直後のCD9欠損マウスでも子宮内膜が再構築され、VEGF-Aが、血管新生ではなく、子宮内膜上皮の再生に直接関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In mammals, the female reproductive tract is remodeled cyclically throughout adult life. Despite the expression of CD9 in the epithelium of the uterus, its role is unclear. Here, we addressed this issue by examining fertilization-competent Cd9<sup>-/-</sup> mice expressing CD9-GFP in their eggs (Cd9<sup>-/-</sup>-TG). Immunobiochemical analysis demonstrated that CD9 was present in the uterine secretions. Electron microscopic analysis revealed the extracellular matrix-like feature of CD9-containing structures. We also found that the litter size of Cd9<sup>-/-</sup>-TG female mice was significantly reduced after their first birth. Histological analysis revealed severely delayed re-epithelialization of the endometrium both in vitro and in vivo in mice. The quantity of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) was remarkably reduced in Cd9<sup>-/-</sup>-TG female mice. These results provide the first evidence that CD9-mediated VEGF secretion plays a role in re-epithelialization of the uterus.

研究分野：生殖生理学、細胞生物学、脂質生物学

キーワード：子宮内膜 再生 マイクロエクソソーム CD9 VEGF エクソソーム テトラスペニン 膜融合

## 1. 研究開始当初の背景

晩婚化によって生じる晩産の傾向は、我が国の出生率を低下させ、超少子化状態を引き起こしている。その結果として、急激に人口が減少することが予測され、近い将来、現在の経済規模を維持することが難しくなる恐れがある。単に出生を増やすような政策は女性軽視との誤解を招く恐れがあるが、緊急に児童福祉と医療が一体となった対策をとることが必要である。

出生率が低下する一因として、加齢によって引き起こされる生殖器官、生殖細胞の機能低下、および生殖器官に関連した疾患の増加が予想されている。ただ、生殖能力の低下が年々早まっていることが危惧されており、加齢だけでは説明できない事態が生じている可能性もある。

妊孕性が低下する原因として、様々な問題が想定されるため、病態を解明した上で治療法を確立するには、様々な方面から研究に取り組むことが必要である。一見、無策にも捉えられるが、不妊は難治性疾患としては認知されておらず、病気としても捉えられていない摩訶不思議な現象である。そのため、医療だけ考えても、生殖医療、精神面のケアといった様々な方面からの対策が必要である。また、今後の更なるライフスタイルの変化に対応して、既存の不妊治療および生殖補助医療の安全性と効率をより一層向上させることも必要である。

## 2. 研究の目的

急速なライフスタイルの変化は晩婚・晩産化をもたらし、出生率を急速に低下させることで、我が国に超少子化状態を作り出している。これにともない生殖補助医療による診療件数が増加し、出生児が日本全体の出生児数の3.1%(2011年の治療にて32,426人が出生、日本産科婦人科学会報告)を超え、毎年上昇傾向にある。そこで、社会状況に起因するライフスタイルの変化に対応して、生殖補助医療の質を向上させる必要性がある。実現のためには、高齢化にともなう妊孕性低下のメカニズム解明と適切な治療システムの構築をめざした、遺伝子・タンパク質・低分子物質の各レベルで病態、病因解明を行い、エビデンスに基づいた的確な治療システムを築くことが必要である。世界的にも、35歳以上の不妊症夫婦に対しては現在の生殖補助医療では限界があること考えられているものの、わが国では35歳以上で挙児を希望する夫婦の割合が多いのが現状である。そこで、配偶子の機能低下が原因と考えられる不妊症をさらに解析し、配偶子の機能を維持・回復させることをめざした新しい診断・治療法を開発する必要がある。

加齢や環境変化にともなって配偶子の機能が低下することが知見として蓄積されて

いる一方、配偶子の機能低下につながる原因物質の特定にはいたっていない。本研究では、各種疾患モデル動物を用いた研究から、従来の研究では到達できなかった配偶子機能を低下させる原因物質の特定をめざす。さらに、配偶子の機能低下は、加齢や環境変化といった後天的な原因ばかりでなく、配偶子の形成過程に起因する可能性も考えられる。そこで、配偶子形成についても疾患モデル動物を用いた解析を行い、可能性の是非を検証することで、新しい知見が得られると考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 配偶子機能異常に関する遺伝子改変(完全欠損および条件付き欠損)マウスを用いた検討

本研究に用いた遺伝子改変マウスは以下の8系統である。

- ・CD9 欠損マウス<sup>1)</sup>
- ・SVS2 欠損マウス<sup>2)</sup>
- ・β-catenin floxed/floxed マウス
- ・CSL 欠損マウス
- ・Jmjd6 欠損マウス
- ・PLCζ floxed/floxed マウス
- ・Tetra [CD3ε, MHC class I (D and K) 遺伝子座、β2-microglobulin]欠損マウス
- ・Ubb 欠損マウス

配偶子における条件付き遺伝子欠損マウスを、以下の2系統のトランスジェニックマウス(Tg)との交配によって作製した。

- ・ZP3 cre-recombinase Tg マウス
- ・Protamin cre-recombinase Tg マウス

(2) 配偶子機能の体外受精、体内受精による検討

体外受精については常法に従って受精培地(TYH培地)を用いて行い、極体放出および精子と融合した卵の割合を調べた<sup>1)</sup>。融合精子核の検出にはDAPIを用いた。

体内受精については通常の交配の他、精子と精漿成分をシリジに入れ、マウスの腔栓としてシリコンを用いることで代用した<sup>2)</sup>。

(3) 卵エクソソームの構成成分の解析

CD9を主成分とする卵エクソソームの脂質成分について薄層クロマトグラフィーおよび質量分析装置を用いて解析を行った。

<倫理面への配慮>

国立成育医療研究センターにおいては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている。実験動物を用いる研究については、動物実験指針に準拠して研究を実施した(承認番号2003-002,2005-003)。ヒト精漿タンパク質の使用について倫理委員会から承認された(女性の生理機能に影響を与える男性由来タンパク質および脂質の探索と作用機序の解明 宮戸健二 受付番号821)。

#### 4. 研究成果

##### (1) 子宮内膜再生の分子メカニズム

女性の生殖系、特に子宮内膜の再構築において、様々な因子の関与が報告されてきた。それらの機能は多岐に渡っているため、内分泌系との関連を含めた子宮内膜再構築の全体像を理解することが極めて困難である。その中でも血管内皮細胞増殖因子（以下、VEGF-A）は血管新生を司るサイトカインで、子宮内膜の再構築に中心的な役割を果たしていると考えられている。我々の最近の研究から、不妊症患者の子宮内液中の CD9 の量が有意に低下するという結果が得られた。さらに、子宮内膜上皮からマイクロエクソソームと共に VEGF-A が放出されることが明らかになった。また、CD9 欠損マウスでは、受精の膜融合異常の他に、子宮内膜再構築にも異常が認められ、産仔の小型化といった異常が認められた。さらに、VEGF-A をセファロースピースに吸着させて子宮内腔に注入したところ、出産直後の CD9 欠損マウスでも子宮内膜が再構築された。以上の結果から、VEGF-A が、血管新生ではなく、子宮内膜上皮の再生に直接関与していることが示唆された。さらに、子宮内膜を効率よく再生させるために、安定的に供給できるようにマイクロエクソソームの再構成を試みた。CD9 の全長を HEK293 細胞で発現させ、培養上清から精製を行った。さらに、マイクロエクソソームの主要な構成成分であるコレステロールとホスファチジルエタノールアミンを適量混合し、再構成を行った。凝集塊としては作製に成功した。

##### (2) 配偶子機能異常の原因究明と診断法および治療法の検討

我々の体を構成する組織や臓器は、異なる性質を持った多種類の細胞から構成されている。それらの細胞間では、サイトカイン、ケモカインといった分泌性タンパク質と受容体によるシグナル伝達を介してコミュニケーションが行われていると考えられてきた。一方、最近の研究から、エクソソーム（exosome）と呼ばれる細胞外小胞によっても、細胞間での物質輸送を介したコミュニケーションが行われていることが明らかになってきた。

エクソソームは、様々なタイプの細胞から分泌される直径 50nm ~ 150nm 程度の細胞外小胞である。エクソソームは様々な細胞から分泌されるが、その特徴は産生細胞により異なる。生体では唾液、血液、尿、羊水、悪性腹水等の体液中で観察され、培養細胞からも分泌される。エクソソームには様々なタンパク質や脂質、RNA が含まれており、標的となる細胞に運搬されることによって、その細胞に機能的変化や生理的变化を引き起こす。例えば、感染性病原体や腫瘍に対する免疫応答、

細胞や組織の修復、神経伝達といった正常な役割から、病原性タンパク質の運搬にも加担することが報告されている。

最新の研究では、エクソソームに含まれるマイクロ RNA のサブセットが、これらを分泌する腫瘍細胞種によって異なることが明らかになっている。そのため、エクソソームに封入されている RNA 分子は、RNA 分解酵素による分解から保護されるため、体液や細胞培養液から効率的に回収することができる。そのため、エクソソームに含まれるマイクロ RNA は、癌を含む様々な疾患のバイオマーカーとして注目されている。

細胞は、普段はそれほど多くのエクソソームを分泌していないが、外界の温度、栄養状態、酸素供給状態の変化といった細胞周囲の環境変化やストレスが加わると、細胞の生理的状态に変化が起こり、エクソソームの分泌量や質そのものが変わることがわかってきた。

エクソソームは内包されるタンパク質や核酸をエクソソームの取り込み細胞へと送達することで、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなり、癌の転移や免疫応答など種々の生体内イベントにおけるエクソソームの関与が注目されている。また、それとともに、その産生細胞に由来する特徴を有するエクソソームが、疾患診断のためのバイオマーカーとして期待されている。さらに、エクソソームをドラッグデリバリーシステム（DDS）として利用する試みも検討されている。

エクソソームは、血液などの体液に乗って輸送されるが、特定のエクソソームが到達しやすい臓器・組織があることもわかってきており、輸送様式には何らかの特異性があると考えられている。例えば、がん細胞は転移先の細胞へ到達しやすい輸送様式を持っていることが示されており、その一因としてエクソソームの膜に局在するタンパク質による特異性の決定が考えられる。

一方、我々の研究から、通常のエクソソームとは異なる構造をもった膜構造体（マイクロエクソソーム）が卵および子宮内膜から分泌されることが明らかになった。マイクロエクソソームの役割について、配偶子融合、子宮内膜の再生を中心にして解析を行った。

細胞障害性物質としては様々な物質が同定されている。我々は、受精のメカニズムの分子レベルでの解析を通じて、タンパク質だけでなく、脂質やカルシウムもまた重要な因子であることを明らかにしてきた。そうした受精を調節する物質の中にも細胞毒性因子が潜んでおり、何らかのメカニズムの破綻によって細胞毒性物質への変化する可能性が

あることを示すことができた。最近の我々の研究から、CD9、エクソソーム、さらにホスファチジルエタノールアミン (PE) の特定の分子種が配偶子融合の調節因子として働くことを明らかになった。PE にたどり着いたことで、膜融合機構の解明および膜融合の人工的な制御へ道を開いただけでなく、卵への主要な細胞毒性物質として PE に着目する手がかりとなった。これまでの研究から、PE の特定の分子種に膜融合促進活性があることがわかった。PE は卵に対して非常に強い細胞毒性作用があり、PE 毒性に対して、CD9 の膜貫通領域に相当するペプチドに中和効果があることを示した。

抗リン脂質抗体症候群は自己免疫疾患の1つとされ、血中に抗リン脂質抗体 (抗 PE 抗体も含まれる) とよばれる自己抗体が存在することで、さまざまな部位の血栓症から習慣流産などの妊娠合併症をきたす疾患である。抗リン脂質抗体症候群は若年で脳梗塞や流産をくりかえす疾患の主要因の一つであり、習慣流産の他にも妊娠合併症として、子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群が挙げられる。血栓症や妊娠合併症以外にも、心臓弁の異常による弁膜症、四肢にみられる網状皮斑、血小板減少、腎障害、神経症状が認められることがあり、これらの症例も含めると抗リン脂質抗体症候群の患者数は、わが国で20万人に達する。また、まれに多臓器の血栓症による臓器障害をきたし、急激な経過をとる致死率が高い劇症型抗リン脂質抗体症候群に至る症例もある。本研究の成果は、不育症例で高頻度に認められる抗 PE 抗体による抗リン脂質抗体症候群の発症メカニズムと治療法の開発につながる可能性がある。

#### 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22件) 主要なものを記載

1. Miyado K (責任著者), Kang W, Yamatoya K, Hanai M, Nakamura A, Mori T, Miyado M, Kawano N. Exosomes versus microexosomes: Shared components but distinct functions. *Journal of Plant Research*, in press.
2. Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, Tanaka H, Kondo T, Miyado K, Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, Asahara H. Complementary critical functions of Zfy1 and Zfy2 in mouse spermatogenesis

and reproduction. *PLoS Genetics*, 13(1): e1006578 (2017).

3. Sumiyoshi N, Ishitobi H, Miyaki S, Miyado K, Adachi N, Ochi M. The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models. *Biomed Res*, 37(5): 283-291 (2016).
4. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(12): 1620-1630 (2016).
10. Nakamura A, Miyado K (責任著者), Yamatoya K, Kawano N, Umezawa A. Breast milk stimulates growth hormone secretion in infant mice, and phosphorus insufficiency disables this ability and causes dwarfism-like symptoms. *Regenerative Therapy*, 2: 49-56 (2016).
11. Tsumura H, Ito M, Takami M, Arai M, Li XK, Hamatani T, Igarashi A, Takada S, Miyado K, Umezawa A, Ito Y. Conditional deletion of CD98hc inhibits osteoclast development. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5: 203-210 (2016).
12. Miyado M, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, Shihara D, Ogata T, Fukami M. Parturition failure in mice lacking Mamld1. *Sci Rep*. 5: 14705 (2015).
13. Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemuri MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A. Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*. 1: 18-29 (2015).
14. Nakamura A, Miyado K (責任著者), Nasu M, Kono T, Umezawa A. Phosphorus-insufficient

- maternal milk is associated with ectopic expression of collagen I and female-specific bony changes in infant mouse cartilages. *Regenerative Therapy*. 1: 5-10 (2015).
15. Ono C, Yoshida M, Kawano N, Miyado K(責任著者), Umezawa A. Staphylococcus epidermidis is involved in a mechanism for female reproduction in mice. *Regenerative Therapy*. 1: 11-17 (2015).
16. Nonaka MI, Zsigmond E, Kudo A, Kawakami H, Yoshida K, Yoshida M, Kawano N, Miyado K, Nonaka M, Wetsel RA. Epididymal C4b-binding protein is processed and degraded during transit through the duct and is not essential for fertility. *Immunobiology*. S0171-2985(14)00226-5 (2014).
17. Araki N, Trencsényi G, Krasznai ZT, Nizsalóczki E, Sakamoto A, Kawano N, Miyado K, Yoshida K, Yoshida M. Seminal vesicle secretion 2 acts as a protectant of sperm sterols and prevents ectopic sperm capacitation in mice. *Biol Reprod*. 92(1): 8 (2015).
18. Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Miyado K, Shitara H, Yokota S, Nomura M, Mihara K, Mizushima N, Ishihara N. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr Biol*. 24(20): 2451-8 (2014).
19. Wakai T, Harada Y, Miyado K, Kono T. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*. 20(11): 1090-100 (2014).
20. Kawano N, Miyado K(責任著者), Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep*, 4: 4701 (2014).
21. Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. Sugawara K, *Sci Rep*, 4: 4599 (2014).
22. Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K(責任著者), Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(11): 4145-50 (2014).
- 〔学会発表〕(計 7件)
- 宮戸健二、康宇鎮、齊藤英和、河野菜摘子、卵に対する細胞毒性因子の同定と対処法の開発、ワークショップ3「ライフサイエンスから未来のARTへ」、第34回日本受精着床学会 総会・学術講演会、軽井沢プリンスホテルウエスト、2016年9月16日。
- 河野菜摘子、康宇鎮、吉田薫、吉田学、宮戸健二、精漿タンパク質SVS2欠損マウスから見て来た、精子を殺すメスの免疫機構、ワークショップ「生殖から読み解く哺乳類の生命現象」(オーガナイザー: 深見真紀、宮戸健二、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、合同大会、神戸国際会議場、2015年12月1~4日。
- 宮戸健二、卵由来エクソソームによる配偶子融合の制御機構、日本獣医学解剖学会シンポジウム、北里大学獣医学部、2015年9月7~9日
- 大和屋健二、宮戸健二、河野菜摘子、哺乳類における配偶子融合の分子機構、日本動物学会第86回新潟大会、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、2015年9月17~19日。

宮戸健二、大和屋健二、河野菜摘子、テトラ  
スパニン/エクソソームによる履く融合の  
制御機構、日本動物学会第 86 回新潟大会、  
朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、  
2015 年 9 月 17～19 日。

Kenji Miyado, Kenji Yamatoya, Natsuko  
Kawano. Genesis of life: A mechanism of  
sperm-egg fusion in mammals. シンポジウ  
ム”Fusion in Fertilization: Interdisciplinary  
Collaboration among Plant and Animal  
Scientists”. 日本植物学会第 79 回大会、朱鷺  
メッセ新潟コンベンションセンター、2015 年  
9 月 6～8 日。

宮戸健二．受精における副生殖腺の役割、シ  
ンポジウム 3「受精に関する最近の話題」、  
日本生殖医学会学術講演会、パシフィコ横浜、  
2015 年 4 月 27～28 日。

〔図書〕(計 3 件)  
井上直和、宮戸健二 精子と卵子の膜融合。  
受精メカニズム新論争。細胞工学 Vol. 33。  
No.4, 2014.

Yoshida K, Kawano N, Harada Y, Miyado K.  
Role of CD9 in sperm-egg fusion and  
virus-induced cell fusion in mammals. Sexual  
Reproduction in Animals and Plants, edited by  
Sawada H, Inoue N, Iwano M, Springer, 2014.

動植物の受精学 – 共通性と多様性 – 澤田  
均 編，化学同人，2014 年

〔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

宮戸 健二 (MIYADO, Kenji)  
国立成育医療研究センター・細胞医療研究  
部・室長  
研究者番号：6 0 3 2 4 8 4 4

##### (2) 研究協力者

河野 菜摘子 (KAWANO, Natsuko)  
明治大学・農学部・講師  
研究者番号：0 0 4 5 1 6 9 1

##### (3) 研究協力者

齊藤 英和 (SAITO, Hidekazu)  
国立成育医療研究センター・周産期診療部  
研究者番号：9 0 1 2 5 7 6 6

##### (4) 研究協力者

浜谷 敏生 (HAMATANI, Toshio)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：6 0 2 6 5 8 8 2

##### (5) 研究協力者

宮本 義孝 (MIYAMOTO, YOSHITAKA)  
国立成育医療研究センター・細胞医療研究  
部・研究員  
研究者番号：2 0 4 2 5 7 0 5