

論文内容の要旨

氏名 伊藤 めぐむ
学位の種類 博士(工学)
学位記番号 生第29号
学位授与の日付 平成24年3月22日
学位授与の要件 学位規程第5条第2項該当
学位論文題目 高齢不妊症における分子制御機構の解明

論文審査委員 (主査) 教授 細井 美彦
(副主査) 教授 佐伯 和弘
(副主査) 教授 松本 和也

近年、女性のライフスタイルの変化にともない、妊娠を希望する女性の年齢は高齢化している。一方、生殖細胞の老化は、他の組織や細胞に比べ進行が早く、35歳以後、急速に妊孕性が低下する。高齢不妊症に共通する病理変化として、貯蔵卵胞の減少、卵巢ホルモン制御の異常、卵子染色体の異常、卵子ミトコンドリアの機能低下などが知られているが、その詳細な分子機構は明らかでなく、高齢不妊症の診断法や治療法は確立されていない。そこで、本研究では、高齢不妊症における分子制御機構を解明することを目的として、迅速かつ正確に診断が可能なバイオマーカーの同定を試みるとともに、生殖細胞の老化に関わるシグナル伝達機構および分子制御機構の解明を目指した。

第一に、酸化ストレスが老化の主な原因であると考えられていることから、抗酸化ストレス作用を持ち、かつ多くの疾患や老化のマーカーとして用いられる Glutathione S-transferases (GSTs) に着目し、高齢不妊症のバイオマーカーとしての有効性について検討した。異なる年齢の患者から採取した顆粒膜細胞における GSTs の発現を比較したところ、GSTT1 のみ加齢により発現亢進し、GSTT1 発現量と卵丘卵子複合体(COC)成熟度との間に負の相関が認められた。また、GSTT1 発現量の高い患者から得られた卵子の発生能は低く、GSTT1 発現量の低い患者から得られた卵子の発生能は高い傾向が示された。さらに、老化モデルとしてヒト顆粒膜細胞腫細胞株(KGN細胞)を過酸化水素水やFSHで処理したところ、GSTT1の発現亢進が明らかとなった。以上の結果より、GSTT1は高齢不妊症の優れたバイオマーカーであることが明らかとなった。

次に、生殖細胞系列における老化制御分子メカニズムを明らかにするため、様々な生体活

動において重要なシグナル伝達を担っている p38MAPK (p38) に着目し、ヒト顆粒膜細胞における p38 の加齢変化について検討を行った。高齢 (Older 群) および若齢 (Younger 群) の顆粒膜細胞を用いてリン酸化 p38 (p-p38) の免疫染色を行ったところ、Older 群では、Younger 群と比較して約 7 倍に活性化していることが明らかとなった。より詳細な発現解析を行うため、p-p38 の細胞内局在変化について検討したところ、Younger 群では p-p38 は主に核に局在しているが、Older 群における核局在率は著しく低下し、細胞質での局在性を示した (核局在率; Younger 群 58.6%, Older 群 29.8%, $P < 0.01$)。そこで、in vitro における老化モデルとして、過酸化水素水処理した KGN 細胞を用いたところ、老化顆粒膜細胞と同様に、p38 は強く活性化し細胞質局在を示すことが明らかとなった。また、p38 の活性化や細胞質局在は、抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) および p38 阻害剤 (SB203580) によって抑制され、同時に高齢不妊症マーカーである GSTT1 の発現も抑制された。また、FSH や TNF- α で処理した KGN 細胞において p38 の強い活性化が確認され、NAC および SB203580 による抑制効果が認められたものの、過酸化水素水処理した KGN 細胞における p38 の変化とは明らかに異なっていた。以上の結果から、ヒト顆粒膜細胞の Older 群で認められた p38 の変化は、酸化ストレスを介している可能性が強く示唆された。

次に、顆粒膜細胞における GSTT1 の加齢変化が p38 により特異的に制御されているかどうか明らかにするため、様々な MAPK 阻害剤 (ERK 阻害剤、p38 阻害剤、JNK 阻害剤) で KGN 細胞を前処理し、GSTT1 の発現に及ぼす影響を観察した。予想に反して、FSH により誘導される GSTT1 の発現はすべての阻害剤によって抑制されたが、老化モデルである過酸化水素

水処理 KGN 細胞では、p38 阻害剤のみによって抑制されることが明らかとなった。また、p38 の機能調節や局在変化を制御することが知られている MK2 の阻害剤を用いると、FSH による GSTT1 の発現亢進に対して全く影響がみられないものの、過酸化水素水による GSTT1 の発現亢進は著しく阻害されることが明らかとなった。さらに、GSTT1 ノックダウン細胞 (Δ GSTT1) における p-p38 および pMK2 発現を検討したところ、いずれの分子も強く抑制されていることが明らかとなった。したがって、p38-MK2 シグナル経路は、加齢による GSTT1 の発現亢進を直接的に制御している可能性が示唆された。さらに、顆粒膜細胞における GSTT1 の役割を明らかにするため、細胞の生死やホルモン制御を司るミトコンドリアの機能に着目し、 Δ GSTT1 細胞におけるミトコンドリア活性の測定を行ったところ、 Δ GSTT1 細胞におけるミトコンドリアの膜電位は、コントロールの細胞群と比較して強く過分極していることが明らかとなった。少なくともこの変化はアポトーシスには影響しないことが示されたことから、GSTT1 の発現を抑制することによりミトコンドリア活性が増加しているものと推測された。すなわち、加齢による GSTT1 の発現亢進はミトコンドリア機能を制御している可能性が示唆された。

以上の結果から、顆粒膜細胞において加齢変化する GSTT1 は高齢不妊症バイオマーカーとして非常に有用であることが明らかとなった。また、顆粒膜細胞において p38 は特徴的な細胞内局在変化を示し、老化の制御に関わっている可能性が強く示唆された。さらに、GSTT1 の発現は p38-MK2 シグナル伝達経路を介して調節されており、ミトコンドリア機能に直接的に関与することが明らかとなった。

社会情勢や生活習慣の変化にともない、生殖補助医療による不妊治療は近年急速に増加してきた。社会のニーズに後押しされるように、高度先進生殖医療技術はめざましい発展を遂げ、様々な原因に起因する不妊症患者の治療が可能となりつつある。しかしながら、原因不明不妊症の多くは現在の技術を持ってしても治療が困難であり、新規診断法や治療法の開発が望まれている。

高齢不妊症は、母体の老化にともなって妊孕性が低下する症例であり、古くから経験的に知られてきた。近年、女性の晩婚化がすすみ、児を望む年齢が増加するにしたがって、高齢不妊症患者が増加傾向にある。しかしながら、現在まで高齢不妊症を正確に判定する検査法や効果的な治療法は存在せず、高齢不妊症の科学的な解明は急務である。

本論文は、このような社会的ニーズの変遷に即しており、生殖医療分野における未解決の課題に挑戦した研究論文である。本論文は3章より構成されており、医療応用的観点から高齢不妊症分子マーカーの同定、生物学的観点から分子マーカーおよびその関連分子の動態および機能について検証を行っている。

第1章では、臨床的に様々な病態の分子マーカーとして知られているグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)のヒト顆粒膜細胞における発現に着目し、加齢による発現量の変化を明らかにしている。非常に重要な知見として、ほとんどすべてのGSTサブクラスは加齢により発現が低下するにもかかわらず、GST theta1 (GSTT1)のみ加齢により発現亢進していることを見いだした。また、顆粒膜細胞におけるGSTT1の発現量と卵子の質には負の相関があることを明らかにした。さらに、ヒト顆粒膜細胞株(KGN細胞)を用いて、酸化ストレスおよびFSHがGSTT1の発現を誘導することを明らかにし、生殖細胞における老化マーカーとしてGSTT1の有用性を示している。

第2章では、生体内の重要なシグナル伝達を担うことが知られており、老化およびGSTの発現制御に関与することが想定されるp38MAPKの発現および活性化に着目している。p38はヒト顆粒膜細胞において加齢とともに強く活性化していることを見いだした。また、p38の細胞内局在を異なる年齢の顆粒膜細胞を用いて比較したところ、大変重要な知見として、若い顆粒膜細胞ではp38が核内に局在しているのに対して、老化顆粒膜細胞では細胞質に局在している

ことを示した。さらに、酸化ストレスを負荷したKGN細胞においても、老化顆粒膜細胞と同様にp38の活性化および細胞内局在変化が認められ、老化によるp38の一連の変化は酸化ストレスに起因していることを強く示唆している。一方、p38の加齢変化とGSTT1発現量の変化はよく一致しており、またGSTT1の発現はp38阻害剤により抑制されることから、p38の活性化および局在変化はGSTT1の発現を直接的に制御している可能性が示された。

第3章では、GSTT1発現の加齢変化がp38シグナル伝達経路を介して特異的に制御される可能性について検証している。酸化ストレスによるGSTT1の発現亢進は様々なMAPKのうちp38によってのみ制御されることを証明した。次に、p38の下流分子であるMK2は、p38の細胞内局在を決定する重要なシグナル伝達因子の一つであり、GSTT1の発現制御との関連性が注目されることから、MK2阻害剤のGSTT1発現におよぼす影響について検討を行っている。MK2阻害剤は酸化ストレスによるGSTT1の発現亢進を阻害することを見だし、GSTT1がp38-MK2シグナル伝達経路を介して発現制御されていることを明らかにした。さらに、GSTT1発現制御細胞(Δ GSTT1)を作製し、p38およびMK2の活性は Δ GSTT1において著しく低下しており、GSTT1とp38-MK2シグナル伝達経路との関連性を裏付ける証拠を得た。次に、生殖細胞の老化におけるGSTT1の機能を明らかにするため、本細胞におけるミトコンドリア膜電位活性を測定し、対照群の細胞と比較して明らかにミトコンドリアが活性化していることを確認した。すなわち、GSTT1は老化にともなって発現が亢進する分子であり、従来は抗老化作用を持つと考えられてきたが、予想に反して老化を促進する分子である可能性を示唆している。

本論文では、高齢不妊症における新規診断法の開発に向けて、臨床的に応用が可能な分子マーカーの同定に成功するとともに、本マーカー分子と生殖細胞の老化の関係について医学的、細胞生物学的見地から非常に重要な基礎的知見を得ており、博士(工学)論文として価値あるものと認める。