

# 不妊への新たな治療戦略としてのオートファジーによる 卵子の品質改善に関する研究

放射線医学総合研究所  
基盤技術センター 実験動物開発・管理課  
塚本 智史

## 1. はじめに

近年、老化に伴う様々な疾患がクローズアップされているが、加齢に起因して生じる不妊もその一つである。加齢に伴う変化として顕著にあらわれるのは、卵母細胞（卵子）の品質低下と言われている。近年では、精子の運動性に異常があっても、精子核を卵細胞質へ顕微注入する技術を用いることで受精させることができる。しかしながら、受精直後の胚発生は卵子の品質に大きく依存しており、卵子の品質維持の機構を明らかにすることが求められている。今のところ、卵子の品質を判別する手法としては顕微鏡を用いた形態学的な観察が一般的であり、あらかじめ卵子の品質を評価することや改善することは困難とされている。言い換えれば、卵子の品質維持に関与する分子メカニズムが明らかになれば、品質評価や改善するための糸口となることが期待される。オートファジーとは隔離膜と呼ばれる二重の膜で取り囲んだ細胞質の一部をリソソームで分解する大規模な分解系のことである。オートファジーの主要な役割は栄養不良や飢餓時におけるアミノ酸供給であり、この機能は酵母からヒトに至るまで保存されている。また、オートファジーには細胞質の品質維持に関わる機能があることが最近の研究から明らかとなっている。これまでの研究によってオートファジーは様々な疾患（特に癌、肝機能障害、アルツハイマー病などの変性神経疾患、老化、細菌感染など）と関連することが明らかとなっている。一方、初期発生におけるオートファジー研究はようやく始まった段階であり、オートファジーによる新たな生理機能が今後発見される可能性がある。2008年、筆者らは、受精直後のマウス初期胚で活発にオートファジーが起こることを報告した（文献1）。この時期のオートファジーを欠損したオートファジー欠損卵では受精するものの着床前致死となることから、卵子由来のタンパク質や細胞質成分を積極的に分解することで着床までの胚発生に必要な栄養を確保していると考えられる。一方で、卵成熟過程ではオートファジーの活性は低く保たれているが、この低いレベルで起こるオートファジー（恒常的なオートファジーと呼ばれる）が卵子の品質維持に関与する可能性が示唆された。これまでの実験から、オートファジー欠損卵では加齢に伴い細胞質にタンパク質凝集体や脂肪滴などの不要成分が蓄積されることが明らかとなっている。このような不要成分の蓄積は、老化した野生型マウスの卵子でもしばしば観察されることから、オートファジー欠損卵では加齢によって品質維持の機構が破綻していると想定される。そこで、本研究では卵子における恒常的なオートファジーに着目し、恒常的なオートファジーを人工的に制御するなどして、それらが卵子の品質維持にどのような影響を与えるかの検討を行った。

## 2. 方法

### 実験1：オートファジー誘導薬剤による卵子のオートファジー誘導状況の解析

60～70週齢(ヒトの35歳齢相当)の老化した野生型C57BL/6(B6)マウスにホルモン投与によって排卵を誘起し輸卵管から卵子を回収した。次にオートファジー誘導薬剤であるラパマイシンとピモザイドを一定時間卵子に処理した。その後処理卵を用いてユビキチン抗体を使った免疫染色とBODIPYを使った脂肪滴染色を行った。なお、比較区としてはラパマイシンとピモザイドの溶媒であるDMSOを同じ濃度となるように処理した卵子を用いた。

### 実験2：カロリー摂取量が卵子の品質に与える影響の解析

4週齢の野生型B6マウスを高脂肪食負荷区(脂肪含量60%)と低脂肪食負荷区(脂肪含量10%)で飼育する2群に分けて12週間飼育した。12週間後に実験1と同様に排卵を誘起させ卵子を回収し、ユビキチン抗体とBODIPYを使いそれぞれタンパク質凝集体の有無と脂肪滴の含量を解析した。

### 実験3：オートファジー抑制環境が卵子の遺伝子発現に与える影響の解析

実験2と同様の方法で飼育した高脂肪食負荷区と低脂肪食負荷区のマウスから実験1と同様に卵子を回収した。回収した卵子からRNAを抽出しアレイ解析を実施した。オートファジー欠損卵においても同様にアレイ解析を実施して、高脂肪食負荷マウス由来の卵子との遺伝子発現との関連性を検討した。

### 実験4：RNA injectionによる卵子の分解活性を指標にした品質評価法の検討

ユビキチンとタンパク質凝集体形成に関与するSQSTM1(p62)のそれぞれのタンパク質に蛍光タンパク質が付いたタンパク質を発現させるようにmRNAを*in vitro*で合成して、高脂肪食負荷区と低脂肪食負荷区それぞれのマウス由来の1細胞期胚の細胞質へ顕微注入した。その後経時的に蛍光観察を行い発現レベルや発生への影響を検討した。

## 3. 結果 研究成果

実験1の結果:オートファジー誘導薬剤であるラパマイシンとピモザイド処理卵では、培養細胞で使用される最適濃度の範囲内であるにもかかわらず細胞毒性が顕著にあらわれることが分かった。また、短時間処理でも同様の毒性があらわれたことから、一般的に用いられているオートファジー誘導薬剤では、卵子におけるオートファジーの誘導は困難であると判断した。

実験2の結果:高脂肪食負荷区と低脂肪食負荷区のマウスでそれぞれ飼育した場合、卵子形成は共に正常であったが、高脂肪食負荷区のマウス由来の排卵卵子数は、低脂肪食負荷区のマウス由来のものよりも優位に多いことが分かった。ユビキチン抗体を使った免疫染色では、低脂肪食負荷区と高脂肪食負荷区にユビキチン陽性の凝集体数に大きな差は観察されなかった。一方で、BODIPYを使った染色から、高脂肪食負荷区の卵子では脂肪滴の含量が増加していることが明らかとなった。

実験3の結果:高脂肪食負荷区の卵子では、脂質代謝やミトコンドリア機能に関連する遺伝子群の発現が低脂肪食負荷区の卵子と比較して異なっていた。これらの遺伝子群の発現異常はオートファジー欠損卵でも確認された。

実験4の結果:高脂肪食負荷区およびオートファジー欠損卵において、RNA注入後のユビキチンタンパク質の発現は正常であったが、p62タンパク質の発現(量あるいは時期)が正常卵と比較すると優

位に低いあるいは遅いことが明らかとなった。また、RNA注入後の受精卵を体外で培養したところ、発生は全く正常であることが分かった。

#### 4. まとめ

これまでの実験からオートファジー欠損卵では、ユビキチンとp62陽性のタンパク質凝集体や脂肪滴などの不要成分が蓄積することが明らかになってきたが、本研究によってオートファジー欠損卵で観察された不要成分の蓄積は、老化やカロリー摂取量とも関連があることが示された。不要成分の蓄積はオートファジー欠損卵では正常卵と比較してより早期に生じることからも、オートファジー欠損卵は加齢の際の卵品質低下モデルとして、今後卵子の品質維持や評価のための研究に有効利用できることも同時に示唆している。一般的によく知られているオートファジー誘導薬剤の卵子への毒性については、予想外の結果であったが、臨床応用を視野に入れた場合には、処理卵の胎児形成やその後の発育段階への影響を考慮する必要がある。仮に目的としたオートファジー誘導が起こったとしても安全性の面からすぐには取り入れることは難しいだろう。代替法として計画したカロリー摂取制限が卵子の品質へ与える影響については興味深い知見が得られた。高脂肪食負荷区のマウスにおいて、低脂肪食負荷のマウスよりも排卵卵子の数が優位に多かった点についてはさらなる検討が必要だが、何らかのシグナリング経路の破綻もしくは恒常的なオートファジー活性の低下によって本来は排除されるべき低品質の卵子が卵巣内で成熟し排卵したとも考えられる。実際に老化やカロリー制限によってタンパク質分解活性が変動することも近年の研究から明らかとなっており、卵子の品質維持とも関連している可能性がある。ユビキチン抗体を使った免疫染色では、高脂肪食負荷区の卵子にはユビキチン陽性の凝集体はほとんど観察されなかったが、BODIPY染色によって脂肪滴の含量が増加していることが明らかとなった。この結果は、今年度アメリカで開催された第43回Society for the Study of Reproduction国際学会において、アメリカとオーストラリアのグループからも同様の報告がされており再現性が高い結果と考えられる。しかし、なぜ高脂肪食負荷によって脂肪滴の含量が増加するのか、それに関連する分子メカニズムは明らかとなっていない。本研究によって脂肪滴の増加にはオートファジーが関連することが示唆される。アレイを使った遺伝子発現解析から発現レベルに異常が確認された遺伝子については、これらの遺伝子の機能から卵子の品質維持の機構との関連性やこれらの遺伝子群の発現をモニターすることで卵子の品質評価や発生能の指標につなげることができないか検討したいと考えている。電子顕微鏡を用いた観察からは、オートファジー欠損卵ではミトコンドリアの微細構造に異常が見つかった。このことはミトコンドリアの機能に関連する遺伝子発現異常との関連性を裏付けている可能性がある。また、あらかじめ合成した蛍光タグ付きのユビキチンやp62のmRNAを受精後の早い時期に注入して、そのタンパク質の発現や発現後の分解活性をモニターする系は実用性が高いことが証明された。この方法の利点の一つは、発現したタンパク質の分解（消失）が早いために注入後数時間後の発現（蛍光強度）をモニターすることで、注入した卵の分解活性が簡単に分かることである。二つ目の利点は合成したRNAは細胞質へ注入するために、核ゲノムへの影響は排除することができる点である。実際に、その後の実験からこれらのmRNAをインジェクションした胚を仮親に移植することでマウス個体を得ることに成功している。本研究によって、オートファジーによる卵子に品質維持の機構には、加齢やカロリー制限が少なくとも影響を及ぼすことが明らかとなった。また卵子の品質をモニターする

評価法の実用化に向けた基礎データを収集することに成功した。最後に本研究を進めるにあたり研究助成をして頂いた公益財団法人アステラス病態代謝研究会ならびに選考委員の先生方に深くお礼申し上げます。

## 5. 発表論文、参考文献

文献 1

**Tsukamoto S**, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N.  
Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos  
Science. 2008 321(5885):117-120