

令和 2 年 12 月 18 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960203

氏名 梅原 審

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：アデレード（国名：オーストラリア）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

卵巣線維化に着眼した繁殖障害の予防法・治療法の開発

3. 派遣期間：令和 1 年 9 月 1 日～令和 2 年 9 月 13 日

4. 受入機関名及び部局名

University of Adelaide, Faculty of Health and Medical Sciences

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【目的】

本研究課題は、申請者らがこれまでに見出した“加齢に伴い生じる卵巣間質の線維化が卵巣機能低下を誘発する”という研究成果 (Umehara et al., Aging cell, 2017) を基に、卵巣の線維化が加齢以外にも起こる雌に共通した妊娠性低下原因であるのか？そして、それが生じるメカニズムはどうなのか？ということを明らかにすることで、雌の繁殖障害の予防法・治療法の開発を目指すものである。

【所期の目的の遂行状況】

本研究課題の計画では、1年目に肥満マウスのような病態をもつマウスと加齢マウスを用いて比較解析を行い、その共通性と相違性を抽出することで、卵巣線維化メカニズムの解明を試みる予定であった。しかしながら、実際には、計画通りに肥満マウスと加齢マウスを用いて解析するだけでなく、排卵障害が生じるプロジェステロン受容体欠損マウスや、デヒドロテストステロン (DHT) を3か月投与した雌マウス (DHT マウス) など、想定以上の低妊娠性モデルを用いることができた。さらに、研究室スタッフのアドバイスから、出産を経験していないマウス (処女マウス) が、出産を経験したマウス (経産マウス) よりも妊娠性が低いことが判明し、これらマウスも本解析に用いることができた。

これらマウスに外因性のホルモン製剤を投与することで、その妊娠性を検討するとともに、卵巣を回収した。まず、卵巣を 4% パラフォルムアルデヒドによって固定し、パラフィン切片を作成した後、線維化を判定するため、コラーゲンを可視化するピクロシリウス染色 (PSR 染色) や抗コラーゲン抗体を用いた免疫蛍光染色に供試した。その結果、加齢マウスと同様に、肥満マウスや DHT マウスの卵巣において線維化が生じていた。また、妊娠性が低い処女マウスでは経産マウスと比較して、卵巣線維化が起こりやすいことも明らかとなった。特に、ホルモン投与によって排卵される卵の数と卵巣線維化の重篤度に負の相関が認められたことから、卵巣線維化は加齢以外にも低妊娠性を呈する病態モデルマウスで生じ、それが排卵数に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。したがって、卵巣線維化は雌の妊娠性を低下させる共通した障害であることが明確化された。

このように認められた線維化は、卵巣だけでなく肝臓や腎臓でも認められる障害であり、前者では肝硬変、後者では慢性腎臓病と呼ばれる。これら臓器において、線維化は炎症反応や細胞ストレス（酸化ストレスや小胞体ストレス、脂質の過剰蓄積）に起因していると言われている。興味深いことに、肥満や代謝環境の劣悪化は、全身だけでなく、卵巣局所の炎症反応も高めると報告されていることから、病態や環境要因によって卵巣局所で慢性炎症が発生すると、卵巣が線維化し機能低下すると仮設立てた。そこで、肥満マウスや加齢マウスから血清や卵巣を回収し、ELISA 法を用いた炎症性サイトカイン測定を行った。すると、興味深いことに、血清中サイトカイン濃度には、肥満マウス・加齢マウス共に変化が認められなかつたが、卵巣局所では、肥満マウスと加齢マウスで共通して、炎症性サイトカイン濃度が高値となっていた。そこで、線維化が生じている卵巣間質部分を物理的・化学的な処理によって回収し、RNA 抽出一逆転写を行ったのち、Real-time PCR 法を用いて炎症のマーカー遺伝子類の発現を検討した。すると、炎症性サイトカインである *Inf*g, *Tnf*a, *Il6* が著しく上昇していることが明らかとなった。以上の結果より、線維化卵巣において、強烈な炎症反応が誘起されていることが見出された。また、細胞ストレスも検討するため、肥満マウスや加齢マウスから卵巣を回収した後、凍結組織切片作製用包埋剤 (OCT pound) を用いて凍結切片を作成し、各種マーカー抗体を用いた免疫染色を行った。細胞内の酸化ストレスを検討するため、過酸化された脂質を認識する抗 4-Hydroxynonenal 抗体や、酸化ストレスによって DNA が損傷されることで生成する抗 8-OHdG 抗体を用いて免疫染色を行った結果、それら陽性細胞が肥満マウスや加齢マウスの卵巣間質で多発することが明らかとなった。また、小胞体ストレスや脂質の蓄積も酸化ストレスと同様に、加齢マウスや肥満マウスで劇的に高まっていた。以上のことから、卵巣においても、肝臓や腎臓のような線維化プロセスが発生した結果、組織線維化が起こっていること、そしてそれが低妊娠性を引き起こすことが明確化された。

さらに、本研究室では、細胞外の pH や酸素消費量をリアルタイムで測定することで、細胞の主要なエネルギー代謝経路の状態を非侵襲・高感度に経時的に計測する細胞外フラックスアナライザーを用いた解析を異なる細胞で検討している。細胞ストレスは、エネルギー代謝と密接にかかわっていることから、本解析でも細胞外フラックスアナライザーを用いた解析を行った。その結果、肥満マウスや加齢マウスでは、酸素消費量がコントロール群と比較して低値を示すこと、特にミトコンドリアにおけるストレステストを行った結果、ミトコンドリアの機能ポテンシャルが著しく低下していることが明らかとなった（図 2）。すなわち、線維化が起こっている卵巢では炎症反応・細胞ストレス・ミトコンドリア異常が共通して起こっていることが明らかとなった。

以上のような知見を基に、線維化カスケードの主要プロセスを明らかにするため、まずミトコンドリア特異的な抗酸化剤である BGP15 を用いた薬理学的処理を行った。すると、興味深いことに、ミトコンドリア機能が改善され、細胞ストレスが低減する一方で、炎症反応のうち *Infg* や *Tnfa* には変化が認められず、*Il6* のみ低減していた。特に、この炎症システムをより詳細に検討したところ、肥満マウスや加齢マウスでは炎症性サイトカインとともに、抗炎症性サイトカインもこう発言しており、炎症性マクロファージと抗炎症性マクロファージが共に卵巢間質に頻発していたが、BGP15 投与後では、抗炎症性サイトカイン発現が低減されるとともに、抗炎症性マクロファージが減少するといった結果が得られた。炎症と抗炎症システムは、線維化の誘導に重要なシステムである。具体的には、Injury（傷や細胞死）が起こると、その部位から炎症性サイトカインが分泌され、異常を除去する炎症性マクロファージが集積する。炎症性マクロファージは外敵の駆除や死んだ細胞の除去など急性的な炎症を導く。それら除去が終了すると、この炎症を抑えるために、抗炎症性サイトカインが分泌され、抗炎症性マクロファージが誘引される。この抗炎症性マクロファージが線維芽細胞や間質細胞に影響を与えることで、コラーゲンの発現が誘起され、組織が修復される。肝硬変や慢性腎臓病では、このシステムが常態化した結果、過剰にコラーゲンが蓄積し、組織線維化が誘発される。以上のことから、加齢マウスや肥満マウスの卵巢では、ミトコンドリア異常にによって、炎症が誘起された結果、その修復が過剰化した結果、卵巢が線維化してしまうことが明らかとなった。実際に、BGP15 の投与によって、卵巢の線維化が解消され、妊娠性が回復することも確認していることから、ミトコンドリアと抗炎症性マクロファージの相互作用によって、卵巢間質の線維化が制御可能になることが、明らかとなった。

特に、このようなミトコンドリアが重要であるという知見から、さらにミトコンドリアに焦点を当て、ミトコンドリア抑制剤であるロテノンの給餌試験も行った。すると、肥満マウスや加齢マウスと同様に、ミトコンドリア異常や細胞ストレス、炎症の上昇が確認され、軽度であるが卵巢の線維化も認められた。さらに、ミトコンドリア機能改善が報告されている MitoQ や Metformin を肥満マウスに投与したところ、BGP15 と同様に、線維化の解消や妊娠性の改善が認められた。以上のことから、ミトコンドリア異常が卵巢線維化の中核に位置し、それが妊娠性低下の主要因であることが明らかとなった。

以上のように、当初想定していた以上に研究を遂行することができた。これは、卵巢サンプルや肥満マウス・加齢マウスなど実験サンプルの回収・飼育を、私が滞在する以前から始めてくださるといった、受け入れ教員から十分なサポートを受けた結果である。これらの結果・成果に関して、THE SOCIETY FOR REPRODUCTIVE BIOLOGY や Society for the Study of Reproduction での発表を目指していたが、現在のコロナウィルスによる世界的パンデミックによって叶わなかった。現在は、これらデータを取りまとめ、論文投稿を目指しているところである。また 2020 年 11 月には、これら知見に関して日本 IVF 学会でシンポジウムをすることが決まっており、発表の機会を得ている。

以上のような肥満マウスと加齢マウスを用いた線維化カスケードの研究から、細胞代謝の重要性が示唆されたことから、線維化カスケードの詳細を明らかとするため、加齢マウスを用いてエネルギー代謝と線維化の関係に焦点を当てた研究も行っている。細胞外フラックスアナライザーでは、細胞のエネルギーとして必須なアデノシン 3 リン酸 (ATP) 産生が起こっている場所（解糖系あるいはミトコンドリア）を推定することができる。それによって、ATP 産生を見てみると、肥満と加齢に共通して解糖系由来 ATP がコントロールと比較して、有意に低い一方で、肥満ではミトコンドリア由来 ATP は変わらないが、加齢ではそれが有意に減少するといった相違性も認められた。

そこで、ATP 産生経路にかかる遺伝子発現経路を見てみると、加齢マウスにおいて劇的に

変化していることが明らかとなり、ATP 産生経路に大きな異常が起こっていることが明確化された。現在は、この実験系を用いて、細胞代謝と線維化との関係性を薬理学的視点から解明を試みている。

また 2 年目に挑戦する計画であった、抗線維化剤の薬理学的效果の検討も、1 年目からスタートすることができた。具体的には、肺線維症の治療薬として使われている Pirfenidone や Nintedanib の投与、さらには計画にはなかった抗炎症剤である sgp130FC の投与試験もスタートした。

加齢マウスにこれら薬剤を添加したところ、Nintedanib 投与では効果が認められなかつた一方で、Pirfenidone の 2 週間に渡る飲水投与や、sgp130Fc の 4 日間の注射投与によって、妊娠性の改善が認められるとともに、卵巣の線維化が解消していた。また先の実験で用いた BGP15 に関して、4 日間の注射投与だけでなく、2 週間の飲水投与も行った結果、その表現型に差があることを突き止めた。具体的には、4 日間の投与では、一部の表現型の改善しか認められなかつたが、2 週間投与することで大部分の異常が改善し、劇的に卵巣線維化が解消された。

このように想定以上の進歩で結果が得られたが、自身の就職のため、派遣日程を短縮するため、研究を完遂することはできなかつた。今後は、この機会で得られたコミュニティーを基盤に、この研究を継続していく計画である。