

	カゴエ ユウタ
氏 名	川越 雄太
本籍（国籍）	青森県
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	連研 797 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	老化した胚における老化関連物質 CXCL5 の発現とその機能解明 （Expression and function of senescence associated secretory factor CXCL5 in aging preimplantation embryos）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 松原 和衛 副査 平田 統一(岩手 准教授),木村 直子(山形 教授),河村 和弘 (国際医療福祉大学 教授),横山 仁(弘前 准教授)

論 文 の 内 容 の 要 旨

現在、日本では医療の発展に伴い、出生児の約 20 人に 1 人が生殖補助医療 (Assisted reproductive technology: ART) により生まれている。しかし、昨今の晩婚化による不妊患者の高齢化で、不妊原因の約 50%が高齢を原因とした不妊であり深刻な問題となっている。高齢不妊の主たる原因は、卵子および着床前期胚の質の低下である。その分子機構として DNA 修復遺伝子の機能低下による DNA ダメージの蓄積、酸化ストレス、ミトコンドリア機能の低下や機能不全などの関与が考えられているが、未だ効果的な治療法は確立されていない。本研究では、老化した胚における老化関連物質の同定と、その機能解明を目指して以下の研究を行った。

第一に、ヒト胚の質の低下に関与している老化関連物質を同定するため、患者の同意が得られた凍結余剰胚を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、候補遺伝子を同定した。若齢患者と高齢患者の胚盤胞の遺伝子発現をマイクロアレイで比較したところ、820 個の遺伝子が高齢患者で 5 倍以上発現が変動していた。その中から、老化した細胞で分泌されることが知られている、Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる現象により分泌される炎症性因子に着目し、そのレセプターが卵子や胚に発現している遺伝子を抽出した。その結果、高齢患者胚で 7.7 倍高発現している SASP 因子の一つである CXCL5 を見出した。

第二に、CXCL5 が卵子や胚の老化に伴う質の低下を誘導する因子として機能しているかをマウスを用いた動物実験により評価した。まず、マウスの卵子や胚の CXCL5 の発現量を qRT-PCR で測定した。その結果、高齢マウスの卵子・胚でも CXCL5 の発現増加が認められた。そこで、CXCL5 のペプチドを添加し老化胚の培養環境を模した培養液で若齢マウス由来胚を培養したところ、若齢マウ

スと比較して有意に着床率が低下した。また、老化マーカー（P21、P53、PAI-1、IL-6）の発現が増加することを確認した。CXCL5 処理した若齢マウス胚では、*in vitro* の着床能評価試験において、トロホブラストの細胞数の減少と進展面積の縮小が認められた。以上の結果から、高齢マウス胚では CXCL5 によりトロホブラストの細胞増殖能が低下し、その結果着床率が低下することが推察された。次に、高齢マウス胚の CXCL5 シグナルを抑制することで、着床率が改善できるかを評価した。高齢マウス由来胚の培養液中に CXCL5 の中和抗体とそのレセプターである CXCR2 のアンタゴニストを添加し、CXCL5 シグナルを抑制した。それらを偽妊娠マウスに胚移植し着床率を測定した。その結果、CXCL5 シグナルを抑制した高齢マウス胚で着床率の有意な改善が認められた。また、産仔獲得数の増加も認められた。さらに、CXCL5 シグナルの抑制が遺伝子発現にどのような影響を与えるかを評価した。若齢マウス胚、高齢マウス胚、CXCL5 シグナル抑制高齢マウス胚の遺伝子発現プロファイルを比較した結果、細胞増殖に関連する遺伝子の発現が大きく変動していることが確認された。また、将来的な臨床応用を念頭に、若齢マウス胚を用いて CXCL5 シグナルの過剰な抑制の悪影響を評価したところ、着床率は特に影響は受けなかった。以上の結果より、高齢マウス胚で CXCL5 を抑制すると、トロホブラストの細胞増殖が促進され、その結果着床率が改善することが推察された。また、その後代にも悪影響は認められなかった。

CXCL5 は SASP 因子として様々な老化細胞で発現が見られる遺伝子であることは報告されており、本研究でも高齢マウスの各組織と血液中の発現増加が確認された。そこで、第三の研究として、胚の老化の新規バイオマーカーとしての CXCL5 の有用性を評価した。同意が得られた不妊患者の卵丘細胞の CXCL5 の発現と年齢との相関関係、また、それぞれの胚の形態学的評価との相関関係について解析を行った。患者の年齢と卵丘細胞の CXCL5 発現量を測定したところ、年齢依存的な発現量の増加が確認された。しかし、対象とした患者の胚の形態学的評価との相関関係は認められなかった。本研究期間では対象患者の数が少なかったため、相関関係が見られなかった可能性も考えられる。年齢依存的な増加は認められたため、CXCL5 の胚の老化のバイオマーカーとして有用と推察された。大規模な試験によって更に評価を行なう必要がある。本研究により、生殖科学における老化関連物質として CXCL5 を初めて同定した。また、胚の培養中に CXCL5 を抑制すると高齢マウス胚の着床率の改善が確認されたため、将来的には高齢不妊患者の新たな治療法の可能性を秘めている。

論文審査の結果の要旨

日本では医療の発展に伴い、出生児の約 20 人に 1 人が生殖補助医療により生まれている。しかし、晩婚化によって不妊患者が高齢化し、高齢不妊が深刻な問題となっている。高齢不妊の主たる原因は、卵子および着床前期胚の質の低下であり、いまだ効果的な治療法は確立されていない。本研究では、老化した胚における老化関連物質の同定とその機能解明を目的に、ヒトとマウスの卵子

/着床前期胚を用いて 3 つの研究を行った。第一に、ヒト胚の質の低下に關与している因子を同定するため、不妊患者の凍結余剰胚を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、若齡患者と高齡患者の胚盤胞の遺伝子発現を比較し、820 個の発現変動遺伝子を抽出した。その中から Senescence-associated secretory phenotype(SASP)と呼ばれる現象により分泌される炎症性因子の一つである c-x-c motif chemokine5(CXCL5)を、胚の老化関連物質の候補として見出した。第二に、CXCL5 が卵子や胚の老化に伴う質の低下を誘導する因子として機能しているかを、マウスを使用した動物実験により評価した。その結果、マウスの卵子や胚でも老化に伴って CXCL5 の発現増加が認められた。そこで、CXCL5 のペプチドを添加し老化胚の培養環境を模した培養液で若齡マウスの胚を培養したところ、妊娠率の有意な低下が見られ、*P21* などの老化遺伝子マーカーの発現も増加した。さらに、CXCL5 処理した若齡マウス胚では、トロホブラストの細胞数の減少と進展面積の縮小が認められた。したがって、CXCL5 の発現増加により引き起こされるトロホブラストの細胞増殖能の低下が、高齡マウス胚の妊娠率の低下の原因と考えられた。次に、高齡マウス胚の CXCL5 の抑制による妊娠率の改善効果を評価した。高齡マウス胚の培養中に CXCL5 を抑制すると、着床率と産仔獲得数に有意な改善が認められた。さらに、CXCL5 の抑制により、高齡マウス胚の細胞増殖に關連する遺伝子発現が大きく変動することを確認した。高齡マウス胚の CXCL5 を抑制することで、トロホブラストの細胞増殖が促進され、その結果着床率が改善することが推察された。第三に、*CXCL5* は SASP 因子として様々な老化細胞で発現が見られる遺伝子であることは報告されており、本研究でも高齡マウスの各組織および血液中の発現増加を確認している。そこで、CXCL5 の胚における老化の新規バイオマーカーとしての有用性を評価した。同意が得られた不妊患者から得られた卵丘細胞の CXCL5 の発現と年齢との相関関係および、胚の形態学的評価との相関関係についての解析を行った。その結果、患者年齢と卵丘細胞の CXCL5 の発現量には年齢依存的な発現量の増加が見られた。しかし、胚の形態学的評価との相関関係は認められなかった。これまでに、胚の老化関連物質は同定されておらず、本研究で初めて CXCL5 が同定された。本研究により、今後の生殖科学の発展にとって非常に重要な研究成果が得られたと考えられる。

よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（学術）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Y. Kawagoe, I. Kawashima, Y. Sato, N. Okamoto, K. Matsubara, K. Kawamura (2020)
CXCL5-CXCR2 signaling is a senescence-associated secretory phenotype (SASP) in preimplantation embryos.

Aging cell. Vol.19, e13240, Epub, 2020.

(CXCL5-CXCR2 シグナルは着床前期胚の細胞老化関連分泌形質である)