

博 士 論 文

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

2021

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻
(岩手大学)

川 越 雄 太

目 次

ページ

第Ⅰ章 緒 論	1
第Ⅱ章 ヒト胚盤胞の老化誘導因子候補の探索	11
1. 緒 言	11
2. 実験材料および実験方法	12
1) 供試試料	12
2) DNAマイクロアレイによるヒト胚盤胞の遺伝子発現量の比較	14
3) 発現変動遺伝子の探索	15
4) Gene Ontologyによる発現変動遺伝子の生物学的機能解析	15
5) 老化誘導因子候補の抽出とマウスにおける発現量測定	15
3. 結 果	18
4. 考 察	28
第Ⅲ章 CXCL5シグナル制御による若齢マウス由来生殖細胞の老化誘導	30
1. 緒 言	30
2. 実験材料および実験方法	32
1) 若齢マウス卵子を用いた老化誘導胚の作製	32
(1) 供試動物および供試試料	32
(2) マウス卵子の体外受精	33
(3) CXCL5添加による <i>in vitro</i> での老化誘導	33
(4) 老化誘導胚の胚盤胞到達率の測定	33
(5) 老化誘導胚からのmRNAの抽出とcDNAの精製	33
(6) Quantitative Realtime RT-PCRによる老化のバイオマーカーの発現量測定	33
2) 老化誘導胚の着床能の評価	34
(1) 供試動物および供試試料	34
(2) マウス卵子の体外受精	34
(3) CXCL5添加による <i>in vitro</i> での老化誘導	34
(4) <i>in vitro</i> での着床能評価試験	34
(5) 老化誘導胚の偽妊娠若齢マウスへの胚移植	35
(6) 着床率、産仔獲得率、流産率の測定	35
3. 結 果	35
4. 考 察	48

第IV章 CXCL5シグナル抑制による高齢マウス由来生殖細胞の質の改善	51
1. 緒 言	51
2. 実験材料および実験方法	53
1) 高齢マウス由来胚を用いたCXCL5シグナル抑制胚の作製と着床能の評価	53
(1) 供試動物および供試試料	53
(2) マウス卵子の体外受精	54
(3) 体外培養におけるCXCL5シグナルの抑制	54
(4) CXCL5シグナル抑制胚の胚盤胞到達率の測定	54
(5) シグナル抑制胚の偽妊娠若齢マウスへの移植	54
(6) 着床率、産仔獲得率、流産率の測定の測定	54
(7) CXCL5シグナル抑制胚由来の産仔の形態学的評価	54
2) CXCL5シグナル抑制による高齢マウス由来胚の遺伝子発現への影響	55
(1) 供試動物	55
(2) マウス胚の体外受精	55
(3) CXCL5シグナル抑制高齢マウス胚の作出	55
(4) DNAマイクロアレイを用いた各胚盤胞間の遺伝子発現解析	55
(5) クラスター解析による各胚盤胞間における遺伝子発現の類似性	55
3) CXCL5シグナル抑制による若齢マウス由来胚への副作用の有無	55
(1) 供試動物	55
(2) マウス胚の体外受精	55
(3) 体外培養におけるCXCL5シグナルの抑制	55
(4) CXCL5シグナル抑制胚の胚盤胞到達率の測定	55
(5) シグナル抑制胚の偽妊娠若齢マウスへの移植	56
(6) 着床率、産仔獲得率、流産率の測定の測定	56
3. 結 果	56
4. 考 察	72
第V章 新規加齢バイオマーカーとしてのCXCL5の有用性	75
1. 緒 言	75
2. 実験材料および実験方法	76
1) 供試動物および供試試料	76
2) 各試料からのmRNA抽出とcDNA合成	77
3) Quantitative Realtime RT-PCRを用いたCXCL5とCXCR2の発現量の測定	77
4) ELISAを用いた血清中CXCL5の発現量の測定	78
5) 卵巣組織切片の作製とCXCL5の免疫染色	78

3. 結 果	78
4. 考 察	90
第VI章 総合考察	93
謝辞	102
要約	103
引用文献	

第 I 章 緒 論

老化 (Aging)とは、細胞が様々なストレスにさらされた結果生じた損傷が細胞内に蓄積し、それによって細胞機能の低下が引き起こされ、最終的に臓器の機能が低下して個体の生理機能が衰退する現象と理解されており、すべての生物に共通して起きる不可避な現象である。これらの現象は、細胞老化そして個体老化という2つの段階で進行すると考えられている。個体老化は上述したように、臓器の機能低下に伴う生理機能の低下、それによって様々な疾患が発症する現象であるが、それらは体を構成している細胞が老化し、老化した細胞が蓄積することによって徐々に進行すると考えられる。しかし、個体老化と細胞老化の詳細な関連性は未だに不明である。近年、老化に関する研究の進展により、細胞の老化はDNA修復遺伝子 (DNA repair genes)の機能低下に伴うDNA損傷 (DNA damage)の蓄積 (1)や、活性酸素種の蓄積による酸化ストレス (Oxidative stress) (2)、テロメア (Telomere)長の短縮による細胞分裂の停止 (3)など、様々な要因が複雑に絡み合って引き起こされることが解明されてきている。

一般的に、細胞老化とは不可逆的な細胞周期の停止現象であり、正常な細胞が癌化することを抑制するために起きる「癌化抑制機構」として働いていると考えられている。およそ50年前にHayflick (3)が、哺乳動物の体細胞を継代培養していくうちに、ある一定回数、分裂を繰り返した細胞ではそれ以上分裂しない分裂限界 (Hayflick限界)を迎え、細胞分裂が不可逆的に停止することを発見した。これらの細胞は、継代に伴って染色体の末端を保護しているテロメアが短小化してDNAのダメージ応答 (DNA damage response: DDR)が引き起こされ、細胞増殖を抑制する因子群が活性化されて細胞分裂が不可逆的に停止して細胞の癌化を防いでいると考えられている (4)。細胞はDNA末端にテロメアを形成し、DNAの分解から染色体を保護し安定性を保っている。細胞分裂のたびにテロメアは短縮し、ある一定の長さになると染色体末端を保護できなくなり、DDRが引き起こされp53-p21経路やp16経路の活性化によって不

可逆的に細胞分裂を停止する (5)。特にヒトでは、テロメアを伸長させる酵素であるテロメラーゼの活性が生殖細胞以外の多くの体細胞では低いことが報告されており (6)、ある程度分裂した細胞では短小化したテロメアは元に戻ることができないため、細胞周期を停止する。また、近年ではテロメアの短小化により引き起こされる細胞老化以外にも、分裂限界前の段階でストレスを受けることによって細胞老化が引き起こされるいわゆる、「ストレス性の細胞老化」も報告されている (4,7)。マウスの細胞はヒトと比較してテロメアが4倍程長く (8,9)、またテロメラーゼ活性が高いことからテロメアの短小化は起こらない (10)。しかし、それにもかかわらず継代培養を繰り返すと細胞老化を起こすと報告されている (11)。これは、細胞老化がテロメアの短小化以外のストレスによっても誘導されることを示唆している。このようなストレス性の老化の原因と考えられている因子として、活性酸素種の蓄積やミトコンドリア機能の低下、オートファジー (Autophagy) 活性の低下などが報告されている (2,7,12)。

呼吸をする多くの生物はミトコンドリアで絶えず酸素を消費し、生命を維持するためのエネルギーを獲得している (13)。その過程で、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot -}$) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、一酸化窒素 (NO) などの副産物が産生される (14)。それらの物質は総称して、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) と呼ばれるが、このROSが細胞に蓄積し、DNA損傷や癌遺伝子の活性化などを引き起こすと考えられている (15)。通常は、生体内にスーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase: SOD) やペルオキシダーゼなどの酵素類が存在し活性酸素を分解している。これらの酵素を強制的に発現させた生物では、発生した活性酸素種によるダメージを減らし、寿命が延長することが知られている (16)。また、霊長類はSOD活性が高いことが知られているが、特にヒトはSODの活性が非常に高いため長寿である (17)。しかし、ROSが過剰に産生される場合、DNA損傷や癌遺伝子の活性化などを介して細胞の老化を促進し、寿命の低下を引き起こすと考えられる (18)。また、老化に伴いミトコンドリアの活性が低下することも報告されている。通常、ミトコンドリアの生理的役割は、主に電子伝達

系によるATP産生である。正常なミトコンドリアは生体内酸素の約90%を使用し、細胞の維持に必須なATPを産生するが、その際に数%程度の割合でROSも産生している。ROSは、低濃度であれば、生体内で細胞増殖や分化などに関与するシグナル分子として作用することが近年明らかになってきている (19)。しかし、老化に伴いROSの発生レベルが上昇してくると、酸化ストレスとしてミトコンドリアDNA (mtDNA)に変異を引き起こす。mtDNAはDNAを保護するヒストンタンパク質がなく修復能も低いため、老化に伴い変異が蓄積していくことが報告されている (20)。その結果、さらなるROSを発生させミトコンドリア機能の低下を招く悪循環が生じる。したがって、それによりエネルギー産生能が低下し、その結果として老化を促進していると考えられている (21)。さらに近年、オートファジーと老化の関係性が培養細胞と *in vivo* の実験で証明されており、オートファジー活性の低下と細胞老化に相関関係があることが分かってきた (22)。オートファジーはユビキチンシステムと並ぶ大規模なタンパク質分解経路として、細胞内の恒常性維持のために存在する機構であり、不要なタンパク質の分解などを担っている。通常、体内のオートファジー活性は低いレベルに抑えられているが、折りたたみ不全タンパク質の蓄積や酸化ストレスなどにより誘導され、異常タンパク質の除去を行う。その機構は、まず隔離膜が形成され、それが不要なタンパク質を取り囲みオートファゴソーム (Autophagosome) と呼ばれる膜小胞を作る。その後、オートファゴソームとリソソーム (Lysosome) が融合し、加水分解酵素によりオートファゴソームごと異常タンパク質が分解される。しかし、老化したマウスの組織ではオートファゴソーム形成の指標であるLC3-IIの減少が見られ、オートファゴソーム形成の抑制とタンパク質分解活性の低下が報告されている。このように、老化に伴うオートファジー活性の低下によって、本来は除去されるべき異常タンパク質や機能不全ミトコンドリアなどが分解されずに蓄積し、ROSの増加につながる。このような細胞内の幾つもの機構が密接に関わって恒常性を維持しているが、何らかの原因によってそれが破綻すると細胞に悪影響を及ぼし、その結果、重大なDNA損傷を引き起こして

細胞の老化を引き起こすことが知られている (23)。

通常、細胞はDNA分子に発生した損傷を速やかに修復する機構を持っており、日々の生活で受けるDNA損傷を修復して突然変異などの弊害が出るのを防いでいる (24)。ヒトのゲノムは1日に1細胞当たり約数万〜100万回程度のDNA損傷が発生することが報告されており (25)、これは正常な代謝の過程でも発生するため不可避な現象であるが、通常はそのような損傷はすぐに修復されるため大きな問題にはならない。細胞内では、DNAが損傷を受けるとサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin dependent kinase: CDK)である*CDKN2A (P16)*や*CDKN1A (P21)*遺伝子の発現が上昇することによって、癌抑制遺伝子の1つの網膜芽細胞腫 (Retinoblastoma : *RB*)遺伝子の恒常的な活性化が引き起こされる。次に、細胞周期の進行に必須な転写因子の活性を阻害し細胞分裂を不可逆的に停止させ、生体維持に不必要と考えられる異常な細胞の増殖が阻止される (26)。したがって、そのような細胞は通常はアポトーシス (Apoptosis)によって排除され、DNA損傷による細胞の癌化が防がれている (27)。しかし、老化に伴ってDNA修復遺伝子の機能低下 (28-30)がみられ、修復速度が損傷の発生に追いつかなくなる、あるいは修復できないほどの大きな損傷が起きた場合には、DNA内に発生する突然変異が徐々に蓄積され、細胞老化の促進や癌の発生などにつながると報告されている (4, 31)。

このように、以前から言われている老化の原因に加え、最近では、慢性的な炎症が細胞にストレスを与え老化を引き起こすという報告が見受けられる。通常は機能を損なった細胞は癌化を防ぐためにアポトーシスによって排除されるが、それらの細胞のうち何らかのメカニズムによってアポトーシスを免れる細胞があることを、Yamakoshiら (32)が*P16*遺伝子改変マウスを用いた*in vivo*イメージングにより確認している。*P16*遺伝子は正常細胞ではほとんど発現していないが、老化細胞では有意に高い発現レベルを示すため老化のバイオマーカーとして有用と考えられている。*P16*遺伝子に発光酵素であるルシフェラーゼを挿入し容易にイメージングできるようにした*P16*遺伝子改変マウスは、老化した細胞でルシフェラーゼ活性が観察さ

れる。このマウスは、老化とともにルシフェラーゼ活性陽性の老化細胞が生体内で蓄積し、アポトーシスにより排除されることなく存在し続けることが確認されている。また、Jeyapalanら (33)は老化したサル細胞でも*P16*遺伝子の発現レベルの亢進を報告しており、マウスだけでなくヒトをはじめとした霊長類でも老化細胞の蓄積が考えられる。以前から、蓄積した老化細胞は炎症作用を有する因子を分泌することが確認されており、近年その分泌因子はまとめて、Senescence-associated secretory phenotype (SASP)因子と呼ばれている (34)。SASPとは、様々な要因で細胞周期を停止した老化細胞が種々の炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリックス分解酵素などの生理活性物質を分泌し、それがオートクライン、パラクライン作用によって、自らまたは周囲の細胞にも影響を与える現象である。Coppeら (35)によって見出されたこの現象は、主に持続的なDDRによって引き起こされると考えられており、SASPの発現によってIL-6、IL-8、TNF- α 、TGF- β など炎症性サイトカインの発現上昇がみられる (34)。このようなSASP因子は細胞老化を誘導および、加速させる働きがあることが報告されている (36)。実際に正常細胞と老化した細胞をともに培養すると、正常細胞で*P16*、*P21*、ケモカインなどの発現量が増加し、老化細胞様の特徴、すなわち細胞の増大や扁平化、Senescence induced beta galactosidase (SA- β -GAL)活性の上昇が確認されており、周囲へのパラクライン作用が示唆される (34,37)。SASPは主に転写因子の核内因子である*NF- κ B*や*C/EBP*、*GATA4*が活性化し分泌されることが報告されている (38, 39)。また、Acostaら (40, 41)が報告しているように、ケモカイン受容体である*CXCR2*を介したオートクライン作用によって、自らの老化が促進されることも報告されている。さらに、Adamら (42)の報告によると、細胞老化によってクロマチン構造や遺伝子発現に関与している*LAMIN β 1*遺伝子の発現低下が見られ、その結果、DNAのヒストンメチル化レベルが低下する。ヒストンH3の9番目のリジン残基 (H3K9)のジメチル化レベルが低下すると、クロマチン構造が変化してSASP因子の発現が上昇するという報告も見受けられる (43)。このように、SASPに関して様々な報告が見られ、老化との関連性が指摘さ

れているが、この現象については未だに不明な点が多い。

以上のように、最近の研究により老化の分子生物学的メカニズムは徐々に解明されてきている。しかし、老化には様々な因子や環境的要因も関わっているため原因が多岐にわたること、また、組織や細胞の違いによって関連する因子も大きく異なる。したがって、老化に共通する原因因子の特定は非常に難しい。

一方、日本では医療の進歩に伴い、生殖補助医療 (Assisted reproductive technology: ART)により生まれる児の数も増加しており、現在、約20人に1人の割合で出生していると言われている (44)。体外受精による初めての出生児は1978年にイギリスで誕生 (45)しており、日本でも1983年から段階的に治療が開始された (46)。年間の治療数は年々増加の一途を辿り、現在では年間に約30万周期もの治療が行われている (44)。この数は今や世界的に見ても圧倒的に多く、技術、実績において日本が世界をリードしているが、近年の晩婚化により患者の高齢化が著しく、非常に大きな問題となっている。

体外受精 (*in vitro* fertilization: IVF)によるヒトの妊娠率は、20代、30代前半では30%以上であるが、38歳以上の高齢患者になると妊娠率の急激な減少が見られ、40歳以降では10%以下と若齢患者と比較して著しく低い (47)。また、年齢の上昇に伴って流産率も増加するため、40歳以上の患者の出産率は数パーセントにまで落ち込む。日本では不妊治療患者の約55%が38歳以上の高齢を原因とした不妊患者であることから、これらの課題の早期の解決が望まれている (44)。

生殖細胞、特に卵子は哺乳類では出生前に分化が終わり、出生後は増えることはないと考えられている。その起源は胎児期に形成された始原生殖細胞 (Primordial germ cells: PGCs)が卵巣の原基となる生殖隆起 (Germinal ridge: GR)に入り込み、増殖することから始まる。マウスでは発生7.5日目の卵黄嚢壁中にアルカリフォスファターゼ陽性の細胞としてPGCsが観察される (48, 49)。さらにPGCsは徐々に数を増やし、発生10.5日目頃に将来の生殖腺となる器

官であるGRに向けて移動を開始する。卵黄嚢壁中に出現したPGCsは、消化管形成の過程で起こる卵黄嚢の折りたたみによる受動的移動と、自らのアメーバ運動によりGRへ移動する (50)。GRに到達したPGCsは分化を開始し卵原細胞となり、分裂を繰り返し増殖していく。発生12.5日目頃までその数を増やし続け、発生13.5日目頃になると雄性GR内では増殖停止期に入るが、雌性GRではすぐに減数分裂過程が始まり発生を続け卵原細胞へと分化する (51)。一方、ヒトでは受精後24日目頃に出現したPGCsが、妊娠28~35日の間にGRに移動する (52)。GRに到達したPGCsは、マウスと同様に雄性のGRでは増殖を停止しするが、雌性のGRではすぐに減数分裂を開始し、細胞分裂を繰り返し増殖して妊娠5ヶ月頃までには細胞数が700万個にまで達する。その後、これらの卵原細胞の内の多くがアポトーシスにより数を減らし、一部の卵原細胞が第一次減数分裂を開始し一次卵母細胞に分化する。出生時には約200万個の卵母細胞を卵巣に残して出生する (53,54)。哺乳類では出生後はその数は増えることはないと考えられており、性成熟に達するまで卵子の成熟は進まない。一次卵母細胞は第一減数分裂前期で分裂を停止しており、性成熟後にLHサージによる刺激を受けるまで減数分裂を再開せず、ヒトではこの段階で数十年にも及ぶ間分裂を停止している場合もある。この長期間におよぶ減数分裂の停止期に、母体の高齢化に伴って卵巣内で卵子が様々なストレスに暴露されることで卵子の老化が進むと考えられている (55-57)。したがって、高齢不妊患者の卵子は排卵した時点で既に妊娠する能力が低下しており、自らの卵子で妊娠することが非常に難しいと考えられる。また、マウスでも同様に老化した卵子では妊娠率の低下が見られる。Hamataniら (58)は、高齢マウスの卵子を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行い、老化の影響について調査を行った。その報告によると、老化したマウスの卵子では細胞周期、細胞内代謝、ミトコンドリア機能などに関係している遺伝子発現量に差が現れることを報告している。また、カルシウムシグナルやクロマチン構造に関する遺伝子、着床関連遺伝子などの遺伝子発現にも影響が現れる。一方、Grondahlら (59)によるヒトのドナー卵子を用いた網羅的遺伝子発現解析では、ヒトで

も、細胞内代謝やミトコンドリア機能、ストレス応答に関する遺伝子や細胞周期、細胞分裂に関連している遺伝子の発現に有意な差が現れることを報告している。さらにこの報告では、染色体の分配機構に関与している遺伝子群の発現にも変化が見られることも報告されている。染色体では特にコヒーシン (Cohesin) と呼ばれるタンパク質が、分裂後の姉妹染色体分体をつなぎとめる役割をしているが、老化により発現量が減少していき染色体間の接着が弱まる。その結果、減数分裂の際に紡錘糸が正常に染色体に接着する前に分裂が開始するため、染色体分配が正常に行われず、染色体の異数性卵子が増え着床率の低下が引き起こされる (60-62)。マウスおよびヒトの卵母細胞において、減数分裂に特異的なコヒーシンを年齢別に定量し比較したところ、マウスでは、8週齢と比較して40週齢で減数分裂特異的なコヒーシンの発現量が低下しており、実際に異数性卵子の数が増加することが示唆されている (63)。また、Tsutsumiら (64) はヒトでも年齢依存的なコヒーシンの発現量低下を報告しており、老化による染色体異常、異数性卵子の増加が妊娠率低下の原因になっていると考えられる。しかし、ヒトと比べて染色体異数性の割合が低いマウスにおいても、形態的に良好な高齢個体胚の妊娠率は低いため、妊娠率の低下は他の要因の関与も考えられるが、その原因因子の特定は未だ行われていない。

海外では妊娠が難しい高齢患者に対して、若齢患者のドナー卵子を用いたIVFが行われているが、日本ではドナー卵子を用いた不妊治療は普及しておらず、倫理的な観点からも患者自身の卵子で妊娠することが望ましいと考えられている。また、最近、Hayashiら (65, 66) がマウスの人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS細胞) を用いた精子と卵子の作出を報告しているが、ヒトへの応用は技術面や倫理面でもまだ時間がかかると考えられる。したがって、老化した卵子や受精卵の質を改善し、自らの卵子で妊娠する治療法の確立が望まれている。

これまでに、様々な研究者がアンチエイジング効果があると謳われているサプリメントの

摂取や、抗酸化作用のある物質の培養液への添加などによって、卵子・受精卵の質改善を試みている。Liuら (67)は、ポリフェノールの一種のレスベラトロールを含んだ餌を一定期間与えると、高齢マウスでも妊娠率が上昇すると報告している。レスベラトロールを摂取すると、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) 依存性クラスIIIヒストン脱アセチル化酵素として機能するSirtuin1の発現量が増加と活性化を促す。さらに、ミトコンドリア機能の向上や、テロメラーゼの発現レベルの上昇などの効果を示し、正常な卵胞数の増加、テロメア長の伸展、テロメアーゼ活性の改善が見られる。その結果、卵子の数、質ともに改善し着床率の向上につながると報告されている (67,68)。また、抗酸化物質であるCoenzymeQ10やメラトニン、ビタミンCなどをマウスに摂取させると、妊娠率が上昇するとの報告もある (69-72)。さらに、このような物質を受精卵の培養中に培養液に添加して受精卵の質の改善が試みられている。ウシやマウス、ブタなどの卵子を用いた研究で、培養液中に添加すると活性酸素やフリーラジカルの除去が期待され、細胞内のタンパク質やミトコンドリア、核内DNAなどへのダメージが軽減し、着床率が向上すると報告されている (73,74)。しかし、ヒトの卵子や受精卵に対する効果についての検討は少なく、効果は限定的である (75-77)。また、オートファジーを欠損した卵子ではタンパク質の凝集体や脂肪滴などの不要物質が蓄積し、それが卵子の質を低下させると報告されている (78)。卵子でも体細胞と同様に、老化によってオートファジー活性が低下するため、卵子や胚の質の低下が引き起こされていると考えられる。メラトニンの長期間投与によるオートファジーの活性化が卵巣の老化を抑制し、排卵数、受精率が向上するという報告は見受けられるが (79)、オートファジーの活性化による老化個体由来の卵子の質の改善に関しての報告はない。一方、マウスではカロリー制限によって受精卵の発生率が向上するとの報告も見られる (80)。したがって、今後の研究によってはヒトへの応用も考えられるが、現状としては未だ高齢不妊に対する効果的な治療方法は確立されていない。これらの方法は、外的因子から胚を守る方法であるが、いずれも効果は限定的である。

そこで本研究では、まずヒトの受精卵を用いた遺伝子発現の網羅的な解析を行い、老化により発現が変動している遺伝子群の同定を行なった。次にその遺伝子群の中から、胚の老化を誘導する内在性の因子が存在すると考え、その候補因子の探索を行った。さらに、その因子が関与している細胞内のシグナル経路を制御することにより着床率に影響を及ぼすかを、マウスを用いた実験系によって評価した。また、最終的にはヒトへの臨床応用を考え、細胞内シグナル経路を制御した場合の安全性についても評価を行った。

第II章 ヒト胚盤胞の老化誘導因子候補の探索

1. 緒言

ヒトの不妊治療において、胚の質の診断は1990代にVeeckら (81)やGardnerら (82)が形態学的な評価法を提唱して以来、現在に至るまで形態学的評価が第一の診断方法として普及している。この形態学的評価法は、ある程度妊娠率と相関関係があることが報告されているが、高齢患者では形態的に良好胚と診断された胚を移植しても、若齢患者と比較して有意に妊娠率が低い (83)。その原因として染色体の異数性が指摘されている (84)。ヒトと比べて染色体異数性の割合が低いマウスでは、形態的に良好な高齢個体胚の妊娠率の低さについては他の要因の関与が考えられる。老化には様々な要因が関与しているため、その原因を追求することは非常に困難であるが、これまでにマイクロアレイを用いた網羅的解析によりいくつかの興味深い報告がなされている。Hamataniら (58)によるマウス卵子を用いた報告や、Grondahlら (59)によるヒトの成熟卵子を用いた単一卵子における遺伝子発現の解析などが報告されている。それによると、ヒトやマウスでは全体の約4.5%の遺伝子が老化の影響を受け、そのほかの大部分の遺伝子は老化による発現の変動は見られない。しかし、老化により発現が変動している遺伝子は、細胞周期や紡錘体形成、DNA損傷応答、酸化ストレス除去など、胚の正常な発生やDNA恒常性を維持するための遺伝子である。このことから、次世代に遺伝子を正常に伝達するための機能が老化により低下することが、老化に伴う胚の質の低下の最も大きな要因であり、妊娠率低下の原因でもあったと考えられる。これらの報告は卵子の遺伝子発現を比較したものであり、その段階ですでに染色体分配に関係する遺伝子の発現が影響を受けている。したがって、染色体の異数性を防ぐためには、卵子が体内に存在する段階で卵子の老化を抑制し、遺伝子発現の変化を最小限に留める必要がある。しかし、これは現時点では非常に困難であることが予想され、染色体異数性以外の原因による着床不全に対する治療法の開

発が待たれている。現在では、解析技術の進歩に伴ってマイクロアレイだけでなく、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現の網羅的解析も可能になり、さらに詳細な解析が実現している。いくつかの遺伝子が老化に伴う卵子・胚の質の低下の原因と考えられる報告 (85-87)があるが、いまだに革新的な治療法につながるような報告は見られない。

近年、老化と慢性炎症の関係性が報告されており、老化した細胞はSASP因子と呼ばれる炎症性のサイトカインを放出し、それがオートクライン、パラクライン作用により自らあるいは周囲の細胞の老化を促進することが示唆されている (34,40)。したがって、卵巣内でも同様の機構により老化が促進されと考えられ、卵子・胚などの生殖細胞の質の低下を引き起こす一因の可能性もある。

本章では、ヒトの凍結余剰胚盤胞をサンプルとして、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的な比較解析を行い、若齢患者と高齢患者の胚における遺伝子発現の変化を観察した。また、それらの遺伝子プロファイルの中から、高齢患者由来の胚盤胞で発現が大きく変動している遺伝子を発現変動遺伝子として抽出し、それらの遺伝子がどのように細胞内の生物機能に関与しているかをGene Ontologyを用いた*in silico*解析により明らかにした。さらに、発現変動遺伝子群の中に胚の老化を誘導する内在性因子が存在していると推定し、特にSASP因子を中心としてその因子候補の同定を試みた。

2. 実験材料および実験方法

1) 供試試料

秋田大学医学部附属病院に不妊治療を目的に通院し体外受精を行った患者で、形態学的に良好な胚盤胞が獲得され、なおかつ、凍結融解胚移植時に子宮内膜が7.0mm以上であった患者 (N=10)を本研究の対象患者とした。各年齢の妊娠率を算出し、妊娠率が有意に低下する年齢で若齢患者 (N=5)と高齢患者 (N=5)の2つのグループに分けた (Table1-1)。これらの対象患

Table 1-1 Patient demographic data in two age groups for microarray analysis in human blastocysts.

	Young group	Aging group
Number of donated blastocyst	5	5
Age (range)	26 (26-29)	41 * (39-44)
Length of infertility (years)	5	13 *
Reason for treatment	Unexplained: 1 Tubal factor: 4	Unexplained: 3 Male factor: 1 Tubal factor: 1
Number of stimulated cycles	4	3
Number of oocytes retrieved	21	6 *

Data were shown by median. *, $P < 0.01$: significant difference under Mann-Whitney U test.

者の凍結保存胚盤胞のうち、保管期限である2年間を経過した胚で、秋田大学の倫理委員会(承認番号 No.787)と日本産婦人科学会の承認のもと、胚を研究に使用するための同意が得られた患者の凍結余剰胚盤胞をマイクロアレイのサンプルとして使用した。Gardner分類 (82)で3BB以上の形態学的に良好な胚盤胞のみを、それぞれのグループから5個ずつ選択し融解を行い、マイクロアレイ解析に供した。

2) DNAマイクロアレイによるヒト胚盤胞の遺伝子発現量の比較

サンプルとして使用した凍結余剰胚盤胞は、胚融解用メディウム (Thawing Media：北里コーポレーション)を用いて融解した。融解した胚盤胞はRNA抽出までHepes含有のModified Human Tubal Fluid (mHTF: Irvine scientific)中で保存した。全ての胚を融解後、速やかにSuperAmp™ Lysis Buffer (Miltenyi Biotec)中にサンプルを入れ溶解した後、SuperAmp RNA amplification Kit (Miltenyi Biotec)によりmRNA抽出を行った。mRNAを抽出した後、同じチューブにTerminal Deoxynucleotidyl Transferase (Miltenyi Biotec)を添加しcDNAへの逆転写を行った。転写したcDNAのサンプル量は、ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて定量した。また、cDNAのクオリティはAgilent 2100 Bioanalyzer platform (Agilent)を用いてチェックし、マイクロアレイに適切なサンプルであることを検証した。

マイクロアレイのプラットフォームは、Agilent Whole Human V2 Genome Oligo Microarrays 4 × 44K (Agilent)を使用した。各サンプルのcDNA 250ngをテンプレートとして使用し、蛍光プローブのCy3 (Thermo Fisher Scientific)で標識した。Cy3標識cDNAを65℃で17時間、ハイブリダイゼーションチャンバー内でプラットフォームへのハイブリダイゼーションを行なった。17時間後、室温のAgilent Gene Expression Wash Buffer 1でプラットフォームを1分間洗浄し、その後、37℃に温めたAgilent Gene Expression Wash Buffer 2で1分間洗浄を行なった。最後にアセトニトリルで洗浄した。全ての洗浄工程が終了後、プラットフォームの蛍光シグナルを

Agilent's Microarray Scanner System (Agilent Technologies)で読み込んだ。その後、蛍光シグナルのイメージ図をAgilent Feature Extraction Software (Agilent Technologies)で読み込み、それぞれのプローブの蛍光強度を測定した。

3) 発現変動遺伝子の探索

読み込まれた蛍光シグナルを蛍光強度によって定量し、遺伝子発現量の比較を行った。各プローブのシグナル発現量は、ハウスキーピングジーンを発現量をコントロールとして計算し、値の正規化を行なった。正規化後、2群間の遺伝子の発現量を比較しその比率を求めた。遺伝子ごとに、高齢患者における発現量の若齢患者の発現量に対する比率を算出し、その値の Log_2 を発現変動比率とした。その比率が ± 5 以上の変動を示すものを発現変動遺伝子として抽出した。

4) Gene Ontologyによる発現変動遺伝子の生理学的機能解析

抽出した発現変動遺伝子プロファイルが細胞内のどのような生物学的プロセスに関わっているかを調べるため、Gene Ontologyを用いた解析を行なった。解析にはGene Ontologyの解析ソフト The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)を用いて解析を行なった。各アノテーションに対して、ゲノム全体と本研究の発現変動遺伝子プロファイルにおける発現頻度の差を検定し、それぞれの頻度に有意な差が見られるものを老化により影響を受ける生物学的プロセスとした。なお、検定にはFisher検定を用いた。

5) 老化誘導因子候補の抽出とマウスにおける発現量の測定

発現変動遺伝子群の中から、高齢患者胚で高発現しているSASP因子に着目し、なおかつレセプターが卵子と胚に発現している因子を卵子・胚の老化誘導因子の候補として抽出した。

また、マウスを用いた動物実験によって、ケモカインの一種であるC-X-C motif chemokine 5 (CXCL5)と老化の関連性を調べるため、Quantitative Realtime RT-PCRを用いて、マウス胚盤胞のCXCL5およびそのレセプターであるCXCR2の発現を測定し、若齢マウスと高齢マウスで比較した。若齢マウスは3-6週齢のICRマウス (クレアジャパン：東京)を、高齢マウスは43-53週齢のICRマウスを用いた。過排卵刺激を行うため、Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Sigma Chemical Co., St, Louis, MO) 7 IUをマウスの腹腔内に投与し、48時間後にhuman chorionic gonadotropin (hCG; ASKA Pharmaceutical. Co., Ltd.) 10 IUを腹腔内投与して排卵を促した。hCG投与46～47時間後に頸椎脱臼により屠殺したマウスから卵管を採取し、顕微鏡下でmHTFにて灌流して2細胞期胚を採取した。採取した胚はmHTF中で3回洗浄し、10～15個の胚をミネラルオイル (Irvine Scientific)で覆った30 μ lのKSOM (Merck Millipore)中に静置し、37°C、5%CO₂の環境下で96時間培養した。培養後、胚盤胞30個を1サンプルとして回収し、1.5mlチューブに最少量のメディウムとともに入れ、液体窒素中で急速凍結した後、使用するまで-80°Cで保管した。なお、本研究は聖マリアンナ医科大学動物実験委員会の承認 (承認番号 No.1606008)を得て実施した。

mRNAの抽出はRNeasy micro kit (QIAGEN)を用いて行った。抽出したmRNAは、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio inc)を用いて直ちにcDNAに転写した。転写後、qRT-PCRはLight Cycler 480 SYBR Green I Master (Roshe Diagnostic)を用いて、Light cycler® 96 (Roshe Diagnostic)にて測定を行なった。測定に使用したプライマーの塩基配列はTable 1-2に示した。

Table 1 - 2 Sequences of the oligonucleotide primers

Species	Gene	Oligonucleotide Sequence (5' → 3')	
Mouse	<i>Cxcl5</i>	Forward	GCATTTCTGCTGCTGTTCACT
		Reverse	GGTTAAGCAAACACAGCGTAGCT
	<i>Cxcr2</i>	Forward	TCCTAACACTAGACCCCAAACACTC
		Reverse	TTTCTCTCCTCCACCTCTTCCTT
	<i>P16</i>	Forward	GCGTGTCTAGCATGTGGCTTT
		Reverse	TCCTTCTGCTCCCTCCCTCT
	<i>P21</i>	Forward	AATACCGTGGGTGTCAAAGCA
		Reverse	AGGGAGGGAGCCACAATACA
	<i>P53</i>	Forward	GATGCCCATGCTACAGAGGAG
		Reverse	ACAGAAAAGGGGAGGGATGAA
	<i>Pai-1</i>	Forward	TTCCTCTCACTTCCACCCAAA
		Reverse	AGCAACAGCAACAGAAACAACAC
	<i>Il-6</i>	Forward	CACCAAGAACGATAGTCAATTCCA
		Reverse	TCACCAGCATCAGTCCCAAG
Human	<i>Histone H2a</i>	Forward	GCTTGCTATACGTGGAGATGAAGA
		Reverse	AGCGATTTGTGGATGTGTGG
	<i>β-actin</i>	Forward	AGGGAGGGAGCCACAATACA
		Reverse	AGGGAGGGAGCCACAATACA
	<i>CXCL5</i>	Forward	CCACTATGAGCCTCCTGTCC
		Reverse	CAACGCAGCTCTCTCAACAC
	<i>HISTONE H2A</i>	Forward	GCTTGCTATACGTGGAGATGAAGA
		Reverse	AGCGATTTGTGGATGTGTGG

3. 結 果

本研究における対象患者の年齢、不妊期間および採卵卵子数に有意な差 ($P<0.01$)を認めた (Table 1-1)。また、各年齢の妊娠率を比較したところ、37歳以下の妊娠率 (33.9%)と38歳以上の妊娠率 (15.8%)で有意な差 ($P<0.01$)を認めた (Fig. 1-1)。それぞれの群に属する患者の胚盤胞の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて解析したところ、23,210個の遺伝子が両群で発現していることを確認した (Fig. 1-2)。2群間の発現比を算出し、発現比が5倍以上の差がある遺伝子を発現変動遺伝子として抽出したところ、820個の遺伝子が5倍以上の発現変動をしていることを認めた。各遺伝子の発現量をX軸に、両群間の発現比をY軸にしてプロット図として示した (Fig. 1-3)。高齢患者の胚で発現が上昇している遺伝子は702個、発現が低下している遺伝子は118個であった。これらの発現変動遺伝子の細胞機能への関わりを Gene Ontologyを利用して調査したところ、生物学的プロセスである Cellular macromolecule metabolic process (43%)、Mitotic cell cycle process (25%)、G-protein coupled receptor signaling pathway (11%)、Mitochondrial respiratory chain complex I assembly (11%)、Regulation of immune response (7%)、Organelle organization (4%) において、Gene Ontologyのデータベースである Gene Ontology Consortium (88)でアノテーション付けされている全ゲノムの発現頻度と比較して、本研究の発現変動遺伝子のプロファイルは有意に高い発現頻度 ($P<0.01$)を示していた (Fig. 1-4)。

抽出した発現変動遺伝子群の中から、レセプターが卵子と胚に発現しており、なおかつ高齢胚で高発現しているSASP因子を老化誘導因子の候補として抽出した (Fig.1-5)。その結果、高齢胚で5倍以上の発現増加を認めた *CXCL5*、*AXL receptor tyrosine kinase (AXL)*、*Cathepsin B (CTSB)*、*Tissue inhibitor of Metalloproteinases 2 (TIMP2)*の4つのSASP因子のうち、卵子や胚にそのレセプターを発現しており、なおかつ高齢群で最も高発現 (7.7倍, $P<0.01$)である *CXCL5*を抽出した (Fig. 1-6)。また、同サンプルを用いてRealtime quantitative RT-PCRによる *CXCL5*の

発現変動の検証を行ったところ、高齢患者胚で有意 ($P<0.01$) な発現の上昇が認められた。

動物実験により *CXCL5* と老化の関連を調査するため、予備実験としてマウスの胚を用いて *CXCL5* とそのケモカインレセプターである *CXCR2* の発現量を測定した (Fig. 1-7)。その結果、卵母細胞、胚盤胞ともに高齢マウス胚では *CXCL5* が有意 ($P<0.01$) に高い発現を示した。なお、*CXCR2* の発現量は2群間で差は認められなかった (Fig. 1-8)。

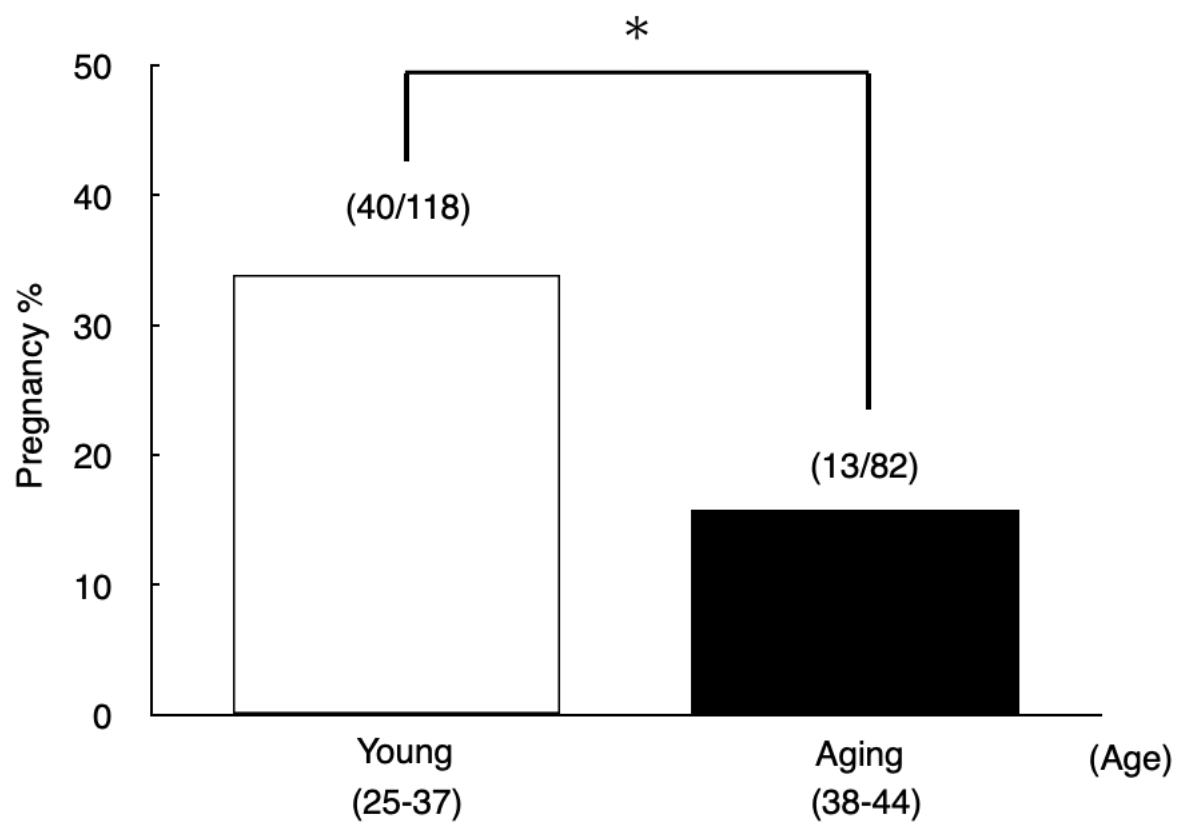


Fig. 1 - 1 Pregnancy rate of two age groups.

Statistical significance is indicated at * $P < 0.01$.

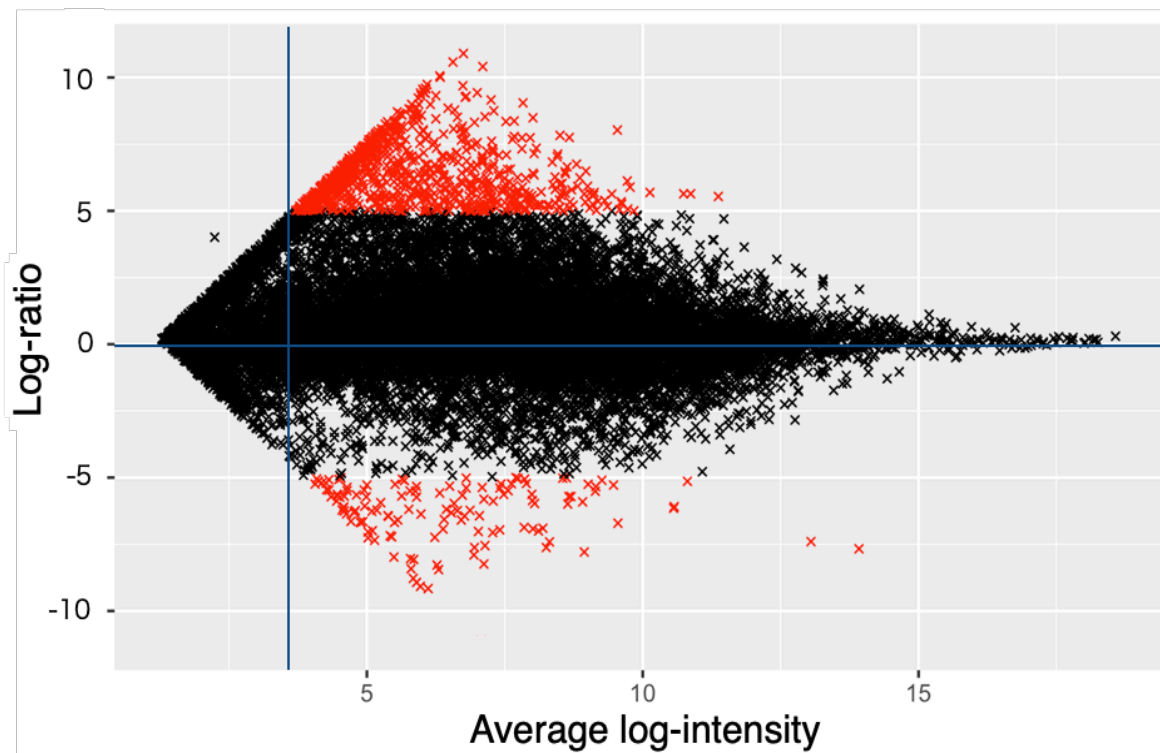


Fig. 1 - 2 A scatter plot of all 23,210 transcripts on Agilent Whole human V2 genome Oligo microarray 4 x 44K.

Black cross indicates the genes which has no difference on the expression level, Red cross (820) indicates differentially expressed genes.

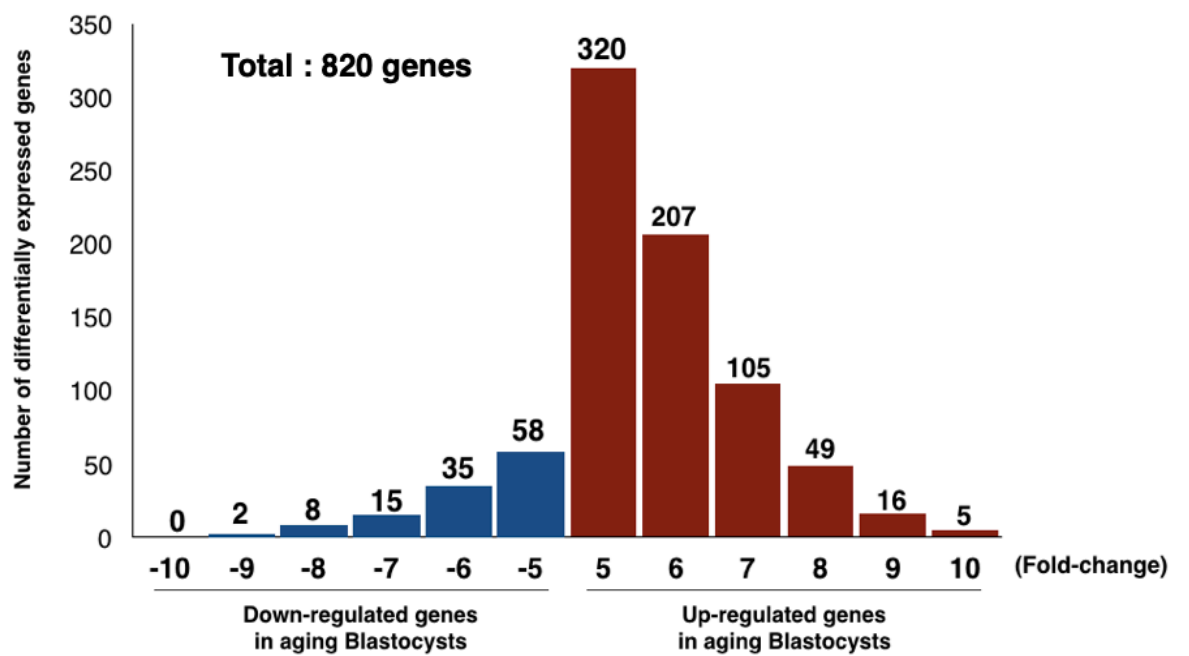


Fig. 1 - 3 Distribution of differentially expressed genes

Blue column indicate the number of down regulated genes (118) in aging embryo. Red column indicate the number of up regulated genes (720) in aging embryo. The numbers listed on top of each column indicates the number of genes.

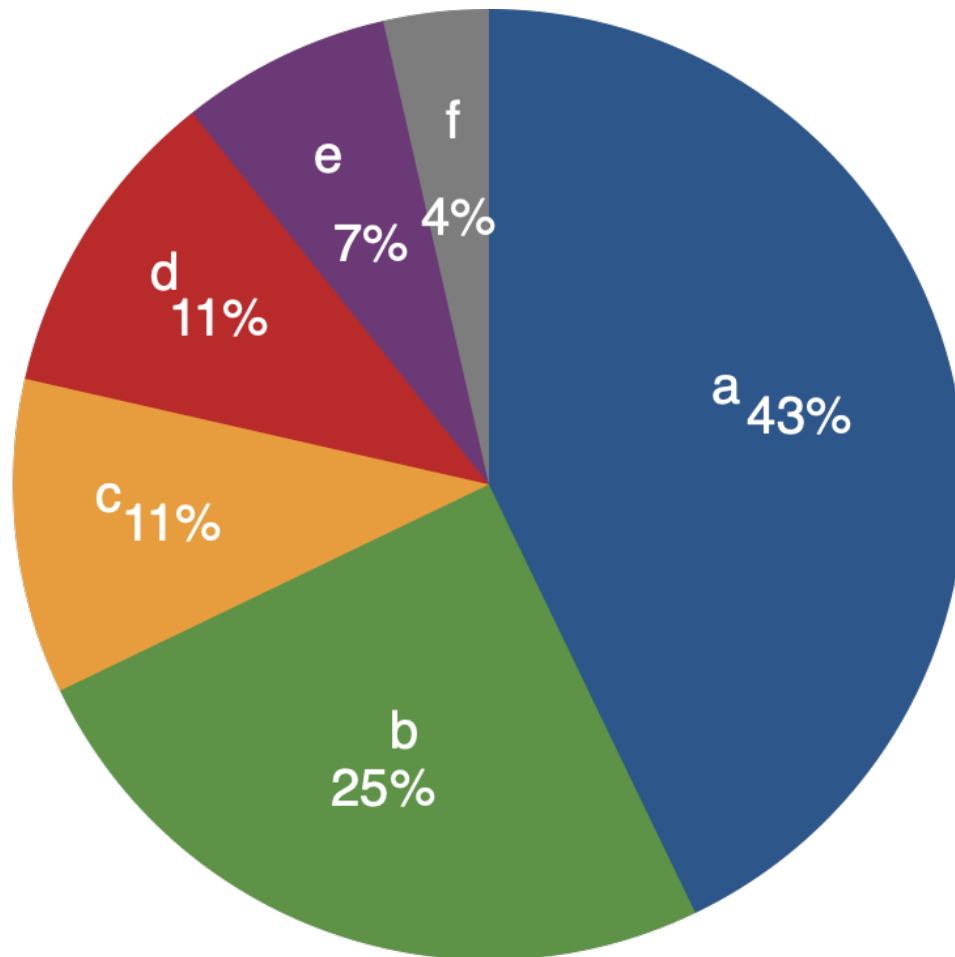


Fig. 1 - 4 Gene ontology analysis of differentially expressed genes ($P < 0.01$).

- a ● Cellular macromolecule metabolic process
- b ● Mitotic cell cycle process
- c ● G-protein coupled receptor signaling pathway
- d ● Mitochondrial respiratory chain complex I assembly
- e ● Regulation of immune response
- f ● Organelle organization

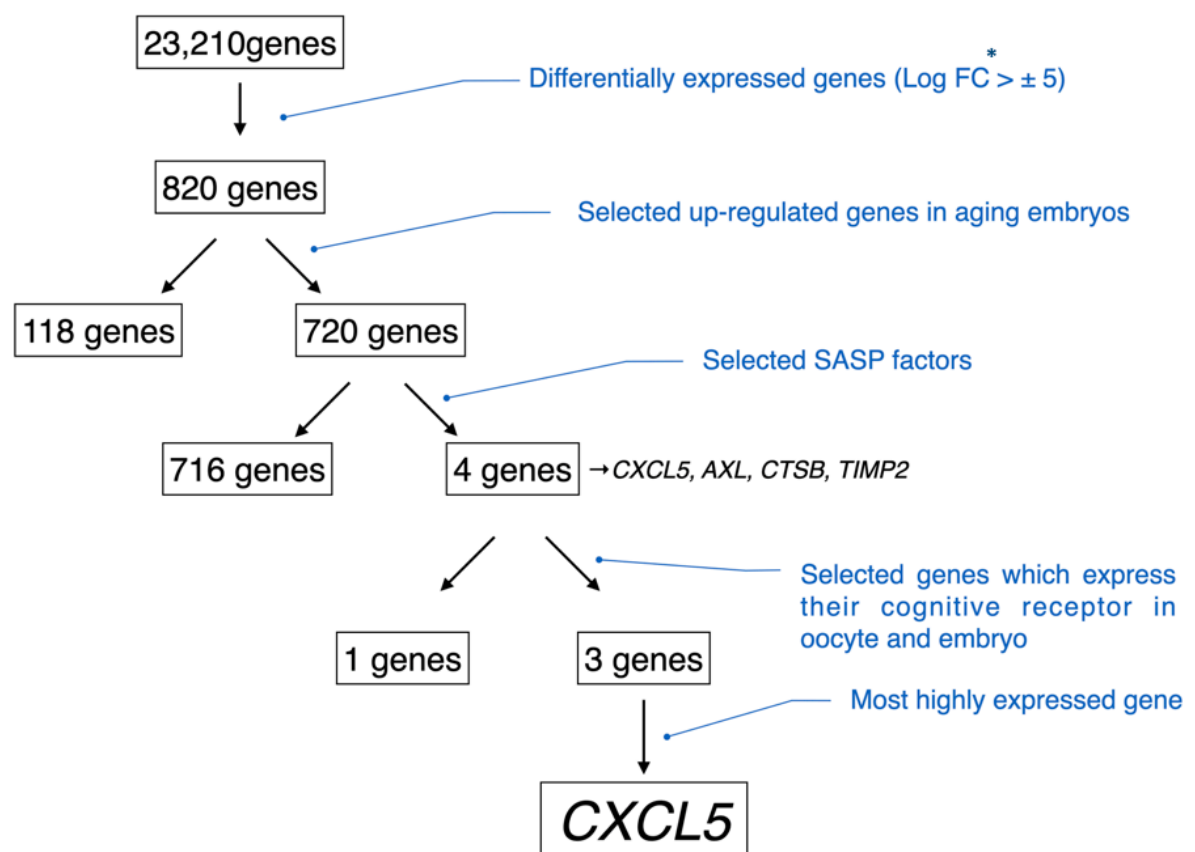


Fig.1 - 5 The process of selecting candidate factor causes for embryo aging

* Log FC: Log₂ Fold-change

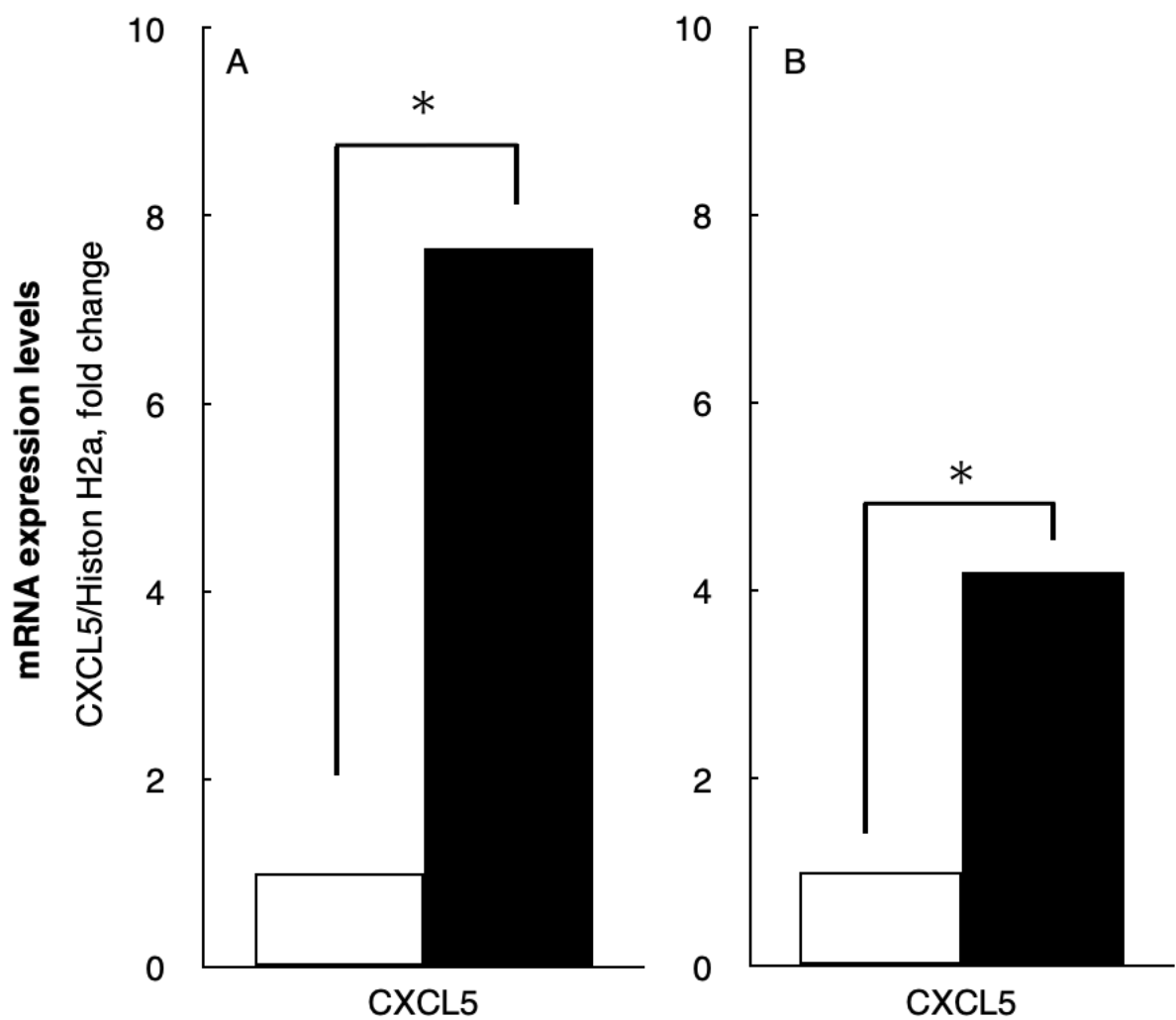


Fig.1 - 6 Validation of microarray data by Quantitative Realtime RT-PCR.

A : Microarray, B : Realtime quantitative RT-PCR,

Data of quantitative real-time RT-PCR were shown as mean \pm SE.

n=3 per group.

Statistical significance is indicated at *P<0.01.

□ : Young, ■ : Aging

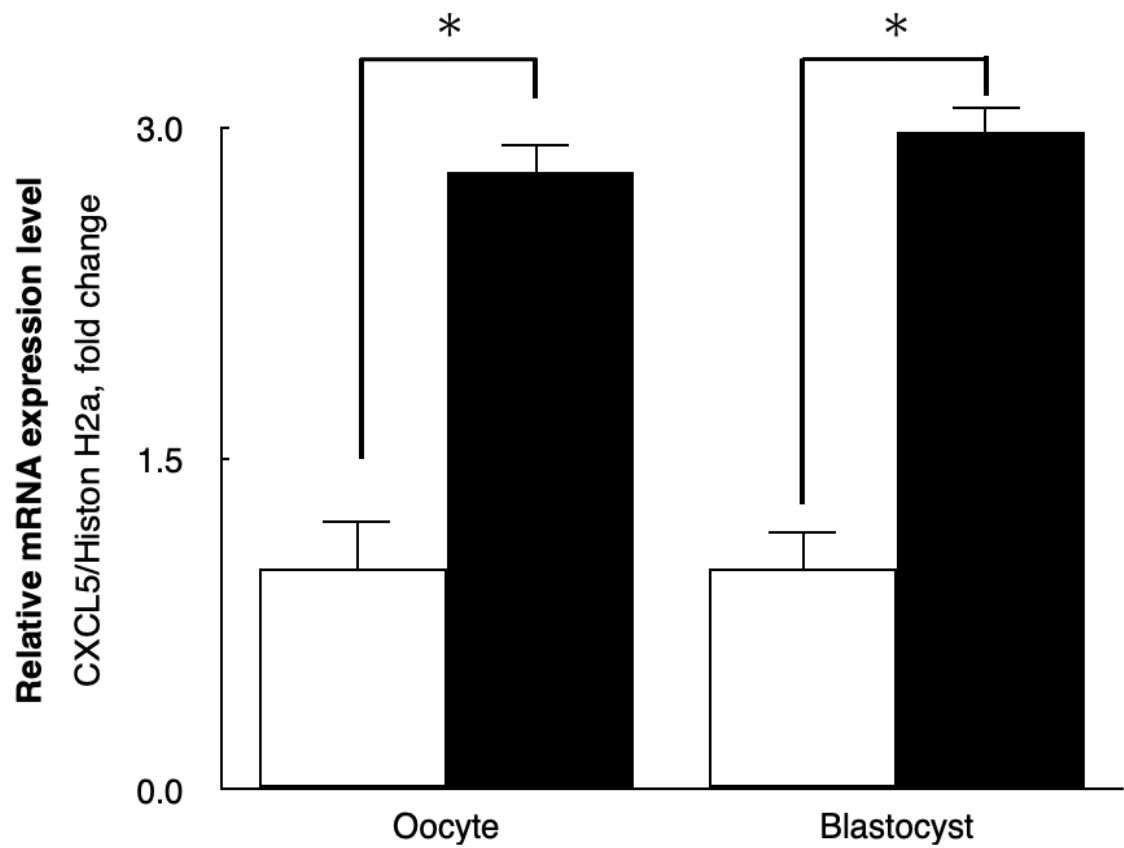


Fig.1 - 7 mRNA expression levels of CXCL5 in mouse oocyte and blastocyst.

Statistical significance is indicated at * $P < 0.01$

Data were shown as mean \pm SE. $n=3$ per group.

□ : Young, ■ : Aging

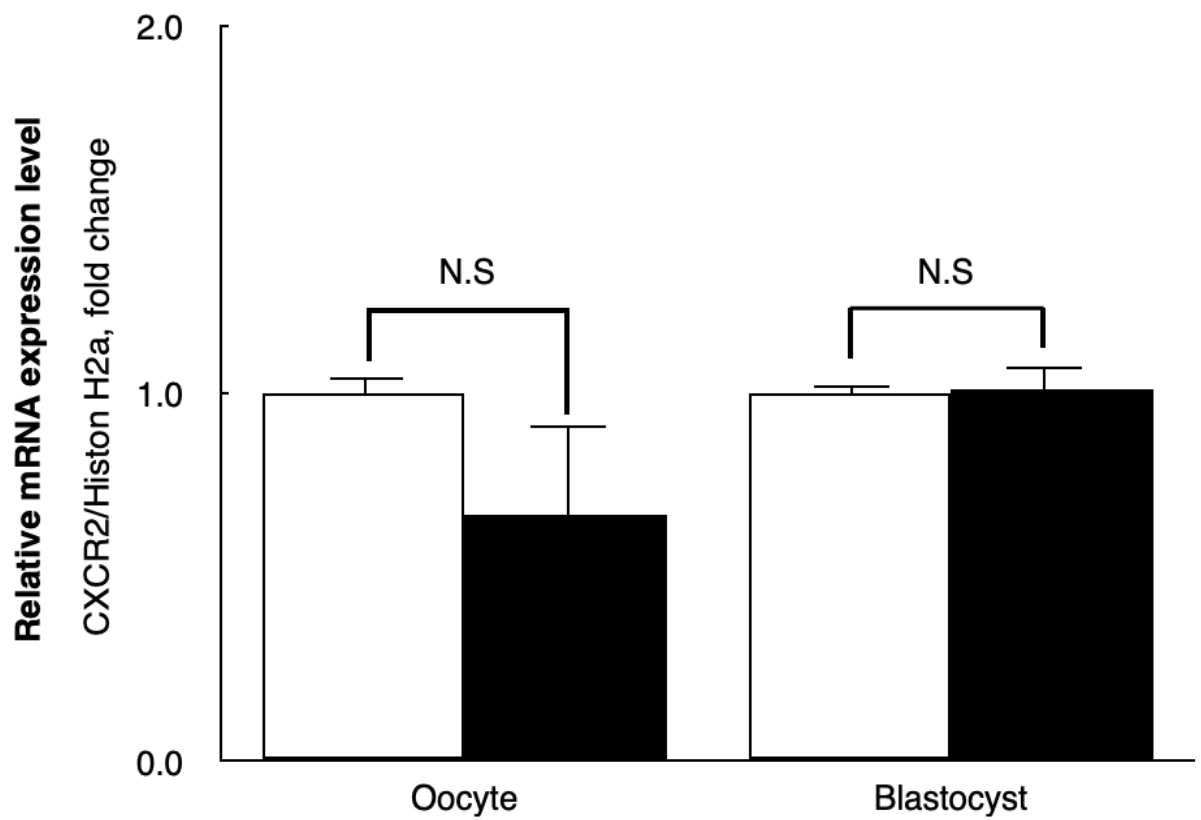


Fig.1 - 8 mRNA expression levels of CXCR2 in mouse oocyte and blastocyst.

No statistical significance is indicated at N.S

Data were shown as mean \pm SE. n=3 per group.

□ : Young, ■ : Aging

4. 考 察

本研究におけるヒト胚を用いた遺伝子発現の網羅的な比較解析によって、老化したヒトの胚盤胞では820個の遺伝子が大きく発現変動していることが確認された。これは、脳、脂肪、筋細胞、リンパ球などの他の老化した細胞の変動遺伝子数と比較して多い (89-92)。これらの変動遺伝子数の差は、各組織によって「老化の影響の受けやすさ」に差があり、通常は40歳代では老化しない脳細胞や筋細胞などでは、さほど遺伝子発現に影響を受けないが、40歳代の生殖細胞では既に多くの遺伝子が影響を受けるため、他の組織の細胞より早期に老化している可能性が考えられる。これらの発現変動遺伝子に対して、Gene Ontologyによる機能解析を行ったところ、特に細胞内代謝機能、細胞周期、ミトコンドリア機能、DNA損傷応答のような細胞内プロセスにおいて、発現変動遺伝子の出現頻度が有意に上昇していた。これらの老化の影響を受けている細胞内プロセスは生殖細胞特異的なものではなく、他の多くの細胞でも同様の細胞内プロセスが影響を受けている (90,91,93,94)。また、そのプロファイルを詳細に解析すると、老化で発現が上昇する遺伝子には炎症関連遺伝子の他にも、細胞周期抑制遺伝子や、アポトーシス抑制関連遺伝子などの遺伝子発現の亢進が認められた。他の老化細胞と同様に、本来であれば、老化した細胞はアポトーシスにより排除され癌化するのを防いでいるが、アポトーシス抑制遺伝子の発現が上昇することによってその機構が破綻し、胚でも老化細胞が生存し続け、SASP因子の放出により自らの老化を促進している可能性が考えられる。また、そのような因子を恒常的に放出することで着床へもネガティブな影響を及ぼし、それが高齢患者の妊娠率低下の一因になっている可能性が考えられる。一方、老化した胚で遺伝子発現が低下する遺伝子として、ミトコンドリア機能に関係している遺伝子、DNAダメージ応答に関係する遺伝子、リボソームの構成に必要な遺伝子などに発現低下が見られた。老化した細胞ではミトコンドリアの機能が低下し、細胞内の代謝に必要なエネルギーが不足すること、リボソーム構成因子が低下することによりタンパク質翻訳機能が低下し、それに

伴って細胞周期などに必要なタンパク質が不足し、発生能や着床能が低下することが推察された。一般的に、細胞が老化すると炎症性のサイトカインであるSASP因子を放出し、それがオートクライン、パラクライン作用によりさらに老化を促進することが報告されている (34, 35)。特に、Acostaら (40, 41)はCXCR2を介したシグナル伝達により細胞の老化が促進されることを報告しており、本研究でもそのような炎症性の分泌因子に着目し、老化の候補因子の絞り込みを行った。その結果、高齢患者の胚盤胞では炎症性の分泌因子であるCXCL5が7.7倍高発現していることを確認した。また、そのほかの炎症性の分泌因子の発現はCXCL5ほど高発現ではなかった。ヒトは40歳前後で卵巣機能が低下し、50歳を迎えるあたりで閉経 (Menopause) する。したがって、卵巣はほかの臓器に比べて非常に早い段階でその機能を失うことから、卵巣が体内の臓器の中で最も早く老化する臓器の1つとも考えられる。また、その構成細胞である卵子あるいは、受精した胚でCXCL5だけが5倍以上の高発現を認め、他の代表的なSASP因子の発現はCXCL5ほど高い発現でなかったことを考えると、SASP因子の中でも特にCXCL5は早期の老化に関わっている可能性が考えられ、非常に重要な因子であることが示唆される。そこで、CXCL5と胚の老化の関連性を究明するために、マウスにおける発現の変化を検討した。その結果、高齢マウスでもCXCL5の発現量はヒトほど高くはないが有意に上昇することが確認された。以上のことから、マウスを用いた動物モデルによってCXCL5と老化の関連性を検証することは可能と推察された。

第Ⅲ章 CXCL5シグナル制御による若齢マウス由来生殖細胞の老化誘導

1. 緒 言

細胞老化とは、従来は細胞分裂の限界に向かって進行していく現象のことを指していたが、最近になって明らかに分裂限界に到達する前の細胞でも、細胞老化に似た分裂停止を示す細胞が観察され、それらが環境によって引き起こされる細胞老化であることが明らかになってきた (34)。このような細胞老化の誘導は、酸化ストレスや紫外線などの様々なストレスによりDNAダメージが引き起こされることが原因となり、細胞周期を停止させることで癌化の可能性のある細胞の増殖を防ぐ意義があると考えられる。細胞老化はアポトーシスと同様に異常な細胞の増殖を防ぎ、生体内の恒常性を保つための機構であるが、アポトーシスとの相違点として老化細胞がすぐには除去されずに体内に留まるという点が挙げられる (95)。老化によりこのような老化細胞が蓄積していくことがYamakoshiら (32)により明らかにされた。本来はこの機構は癌化抑制機構として働いているはずである。以前から老化した細胞では、炎症性のサイトカインやケモカインなどのタンパク質が分泌されることが知られており、これらはSASPと呼ばれている (35)。老化細胞からSASP因子が分泌され、それらがオートクライン、パラクラインに作用して細胞の老化を促進することが報告されている。SASPの影響は、体内の様々な組織で見られることから、細胞老化の機序は普遍的なものと考えられる。また最近では、幹細胞でも同様の機構により細胞の老化が進み、その結果、細胞のターンオーバーができなくなり組織の老化に繋がっていることが考えられている (96)。当然、生殖細胞も同様の機構で老化が進行すると考えられるが、老化した胚の細胞老化についての報告はあまり見受けられない。第Ⅱ章では、若齢患者と高齢患者の胚盤胞の遺伝子発現の網羅的な比較解析を行い、発現変動遺伝子の中から高齢患者胚で高発現している分泌因子を、胚の老化に伴う質低下を促進している因子として抽出し、その中から最も高発現を示すCXCL5に着目した。

CXCL5は炎症性のサイトカインで、本来は細胞増殖や細胞の遊走、細胞の接着などに関与している遺伝子である (97)。また、CXCL5はそのレセプターであるCXCR2を介してシグナルを伝達するSASP因子の1つであり、細胞老化に関与していることが考えられる。CXCR2を介してNF Kappa Bなどの炎症に関連している転写因子を活性化し、その下流の遺伝子の転写を促進する (98)。それらの転写因子の下流にはCXCL5も含まれており、この遺伝子の発現が増加するとオートクライン作用により自らがさらなる炎症を引き起こし、細胞の老化を促進していると考えられている (40,41)。さらに、周囲の細胞も同様の作用により細胞老化を促進していると考えられる (37, 41)。したがって、卵子や胚などの生殖細胞の老化に伴う質の低下が、CXCL5により促進されている可能性が考えられた。

一方、第Ⅱ章で用いたヒト胚は形態学的には良好であるため、CXCL5は形態以外の遺伝子発現などに影響を与え、それが着床率の低下に繋がっていることが推察される。しかし、CXCL5がどのようにして着床に関与しているのかは未だに良く分かっていない。老化した細胞では、細胞周期に関する遺伝子や細胞増殖関連の遺伝子の発現が変化し、細胞増殖が抑制されることが分かっており、老化した受精卵でも同様の現象が起きると考えられる (99)。

そこで本章では、マウスを用いてCXCL5と老化による胚の質の低下の関連性を検討することを目的とした。CXCL5を作用させた若齢マウス胚を培養し、胚盤胞まで発生させた後、着床能を検討する目的で*in vitro*で培養用ディッシュに接着させ、その接着能力を評価した。また、接着した胚の栄養外胚葉 (Trophoblast)の面積の測定と、栄養膜巨大細胞 (Trophoblastic giant cell)の数を測定し、細胞の伸展と、増殖への影響について評価を行なった。さらに、その影響が老化によるものなのかを検討するため、老化マーカーと呼ばれている遺伝子群の発現量を測定し対照群と比較した。

2. 実験材料および実験方法

1) 若齢マウス卵子を用いた老化誘導胚の作製

(1) 供試動物および供試試料

供試動物は、若齢マウスとして3～6週齢のICRマウスを、高齢マウスとして43～53週齢のICRマウスを用いた。また、移植用の若齢マウスは6～8週齢のICRマウスを用い、精子採取用の雄マウスは6～8週齢のICRマウスを用いた。これらのマウスはクレアジャパンおよびSLCジャパンから購入した。マウスは通常のコントロールされた環境下で飼育した (室温; 22°C、湿度; 55～65%、明暗サイクル; 12時間ごと)。全ての動物実験は聖マリアンナ医科大学 (承認番号 No.1606008)および国際医療福祉大学 (承認番号 No.18029)の実験動物委員会の動物実験ガイドラインに則って実施した。

(2) マウス卵子の体外受精

卵子を採取するため雌マウスに過排卵刺激を行なった。PMSG 7 IUを腹腔内投与し、48時間後にhCG 10 IUを腹腔内投与して排卵を促した。hCG投与14～16時間後に頸椎脱臼により屠殺したマウスから卵管を採取し、35mmディッシュのミネラルオイル中に静置した。顕微鏡下で卵管を切開し、ミネラルオイル中に卵丘細胞卵子複合体 (Cumulus cell-Oocyte complex : COCs)を採取した。採取した10～15個のCOCsをミネラルオイルで覆った100 μ lのTYHメディウム (LSI Medience Corporation)中に移し、37°C、5%CO₂の環境下で媒精まで前培養した。全てのマウスの卵管からCOCsを採取した後、雄マウスを頸椎脱臼により屠殺し、精巣上体のみを採取した。精巣上体の血管から血液を完全に除去し21Gの針で穿刺し、精巣上体を狭窄することで精子を採取した。採取した精子は1.5mlエッペンドルフチューブに入れた600 μ lのTHYメディウム中に静置し、30分間Swim upを行い良好運動精子のみを採取した。採取した良好運動精子をCOCsが入った各ドロップ中に、 5.0×10^4 個/mlの濃度になるように調製し媒精した。媒精6時間後に卵子のみを回収し前核を確認した。受精している卵子のみをミネラルオイルで覆った30 μ lのKSOM中に静置し、37°C、5%CO₂の環境下で96時間培養した。

(3) CXCL5添加による*in vitro*での老化誘導

受精した前核期胚をCXCL5のペプチド (Recombinant human CXCL5 protein; abcam, ab9803)を添加したKSOM中で培養し老化の誘導を試みた。若齢マウスの前核期胚をミネラルオイルで覆った30 μ lのKSOM中で培養した。KSOMにCXCL5を濃度が100、300、1000nMになるように調製して添加した。48時間ごとに新しいメディウムに交換し、96時間培養した。コントロール群はCXCL5非添加とした。ネガティブコントロール群として、95°Cで5分間ボイルし失活させたCXCL5を1000nMで添加した群と、CXCL5 1000nMにCXCL5の中和抗体 (abcam, ab12089 or R&D systems, Anti-Mouse Lix Monoclonal Antibody-MAB433)10 μ g/mlおよびレセプターであるCXCR2のアンタゴニスト (TOCRIS, SB225002)10nMを添加しCXCL5を抑制した群を用いた。

(4) 老化誘導胚の胚盤胞到達率の測定

CXCL5添加による胚の発育に影響が出るか否かを検討するため、各実験群で96時間胚の培養を行い胚盤胞に到達した胚の割合を算出した。

(5) 老化誘導胚からのmRNAの抽出とcDNAの精製

各実験群の胚盤胞30個を1サンプルとして、mRNAの抽出を行なった。mRNAの抽出はRNeasy micro kitを用い、キットのプロトコルに基づいて行なった。抽出したtotal RNAは、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kitを用いて直ちにcDNAに転写した。転写したcDNAは測定まで-80°Cで保存した。

(6) Quantitative Realtime RT-PCRによる老化のバイオマーカーの発現量測定

老化のバイオマーカーとして5つの遺伝子 (*P16*, *P21*, *P53*, *PAI-1*, *IL-6*) の遺伝子発現量を測定した。転写したcDNAを融解しテンプレートとした。qRT-PCRはLight Cycler 480 SYBR Green I Masterを用いて、Light cycler® 96にて測定を行なった。各遺伝子のmRNAの発現量の比較は、コントロール遺伝子である*Histone H2a*の発現量で正規化したCt値をベースに $\Delta\Delta Ct$ 法により

比較した。測定に用いたプライマーの塩基配列は第2章で使用したものと同一配列のプライマーを使用した (Table 1-2)。各群間の比較は、Dunnett法により統計的な有意差を求めた。

2) 老化誘導胚の着床能の評価

(1) 供試動物および供試試料

上述した供試動物および供試試料を使用した。

(2) マウス卵子の体外受精

上述した方法で同様に行なった。

(3) CXCL5添加による*in vitro*での老化誘導

上述した方法で同様に行なった。

(4) *in vitro*での着床能評価試験

CXCL5が着床に及ぼす影響を評価するため、*in vitro*における着床能の評価試験を行なった。若齢マウス由来胚をCXCL5を添加したKSOMで胚盤胞まで培養し、全ての拡張期胚盤胞を3%FBS添加M16メディウム (SIGMA)で満たしたチャンバー付きスライドガラス (Melck millipore, German)に静置し、スライドガラスへの胚の接着の割合と、接着後のTrophoblastの増殖の評価を行なった。胚の接着能の評価は、72時間培養後の胚でスライドガラスに接着しているものを接着陽性として、陽性の胚の割合を算出し各群で比較して評価した。Trophoblastの増殖能の評価は伸展面積の比較と細胞数の比較により行なった。伸展面積の比較は、72時間培養後にスライドガラスに接着している胚のうち、着床能の指標とされるTrophoblastic giant cell (100)が確認できるものを対象として、各胚の写真をとり画像編集ソフト Image J (Ver. 1.52d)を用いて伸展面積を測定し比較した。また細胞数の比較は、チャンバースライドのM16メディウムを全て吸引した後、PBSで2回洗浄した後に4%PFAで固定した。その後DAPI (Vector laboratories Inc., USA)で核染色を行い、それぞれの胚の全てのTrophoblastic giant cellの

数を顕微鏡下でカウントして各群間で比較して評価した。コントロール群はCXCL5非添加とした。ネガティブコントロール群として、95°Cで5分間ボイルし失活させたCXCL5を1000nMで添加した群を用いた。

(5) 老化誘導胚の偽妊娠若齢マウスへの胚移植

6～8週齢の雌ICRマウスを移植用レシピエントとして使用した。スメアをチェックし発情期であることを確認した雌マウスを、精管結紮を行なった雄のICRマウスと同じケージ内で16時間同居させ、翌朝プラグチェックを行なった。膣栓が確認されたマウスを偽妊娠マウスとしてレシピエントに用いた。移植日に、腹腔麻酔（3種混合麻酔薬：塩酸メデトミジン 0.3mg/kg+ミダゾラム4mg/kg+ 酒石酸ブトルファノール 5mg/kg）下で後ろ足の付け根あたりを切開し、子宮を体外に露出させた。31Gの針で子宮の卵巢側に胚移植用の穴をあけ、胚を吸ったピペットをその穴から子宮内に挿入し、静かに胚を子宮腔内に戻した。各レシピエントマウスの片側の子宮に5～8個の胚盤胞を移植した。移植後、子宮を腹腔内に戻し切開部分を縫合した。移植した偽妊娠マウスは妊娠19.5日目に頸椎脱臼により屠殺し、速やかに腹腔内から子宮を取り出し、子宮内の胎仔と胎盤を摘出し、形態学的な異常の有無を確認した。

(6) 着床率、産仔獲得率、流産率の測定

着床率は、移植した胚数に対する生産仔の数と流産した胎仔の数の合計で算出し各群で比較した。産仔獲得率は移植した胚の数に対する生産仔数で算出し比較した。流産率は着床した数に対する流産した胎仔数で算出し比較した。各群間の比較は、Dunnett法により統計的な有意差を求めた。

3. 結 果

1) 若齢マウス卵子を用いた老化誘導胚の作製

若齢マウス胚をCXCL5を添加した培養液で胚盤胞まで培養し、老化が誘導できるか否かの

評価を行なった。それぞれの実験群の胚の発生に及ぼす影響を観察したところ、胚盤胞到達率はそれぞれ、若齢群で $84.2 \pm 2.1\%$ (507/602)、Boiled-CXCL5添加群で $86.7 \pm 4.0\%$ (300/346)、CXCL5 100nM添加群で $83.3 \pm 3.9\%$ (169/203)、300nM添加群で $84.4 \pm 5.7\%$ (130/154)、1000nM添加群で $81.9 \pm 3.0\%$ (547/668)、CXCL5 1000nM+中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ +アンタゴニスト10nM添加群で $76.1 \pm 8.2\%$ (70/92) で、各群間で差は認められなかった (Fig. 2-1)。

CXCL5添加による老化の誘導を評価する目的で、各実験群の胚盤胞における老化マーカーの発現量をQuantitative Realtime RT-PCRで測定した (Fig. 2-2)。P16はCXCL5添加群で若齢群より若干高い値を示したが、有意な差は認められなかった。高齢群では若齢群とCXCL5添加群に対して有意に高い値であった ($P < 0.01$)。P21はCXCL5添加群および高齢群で若齢群に対して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。P53はCXCL5添加群で若齢群に対して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。また高齢群も若齢群に対して高値を示した ($P < 0.05$)。PAI-1はCXCL5添加群および高齢群で若齢群に対して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。IL-6はCXCL5添加群および高齢群で若齢群に対して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。

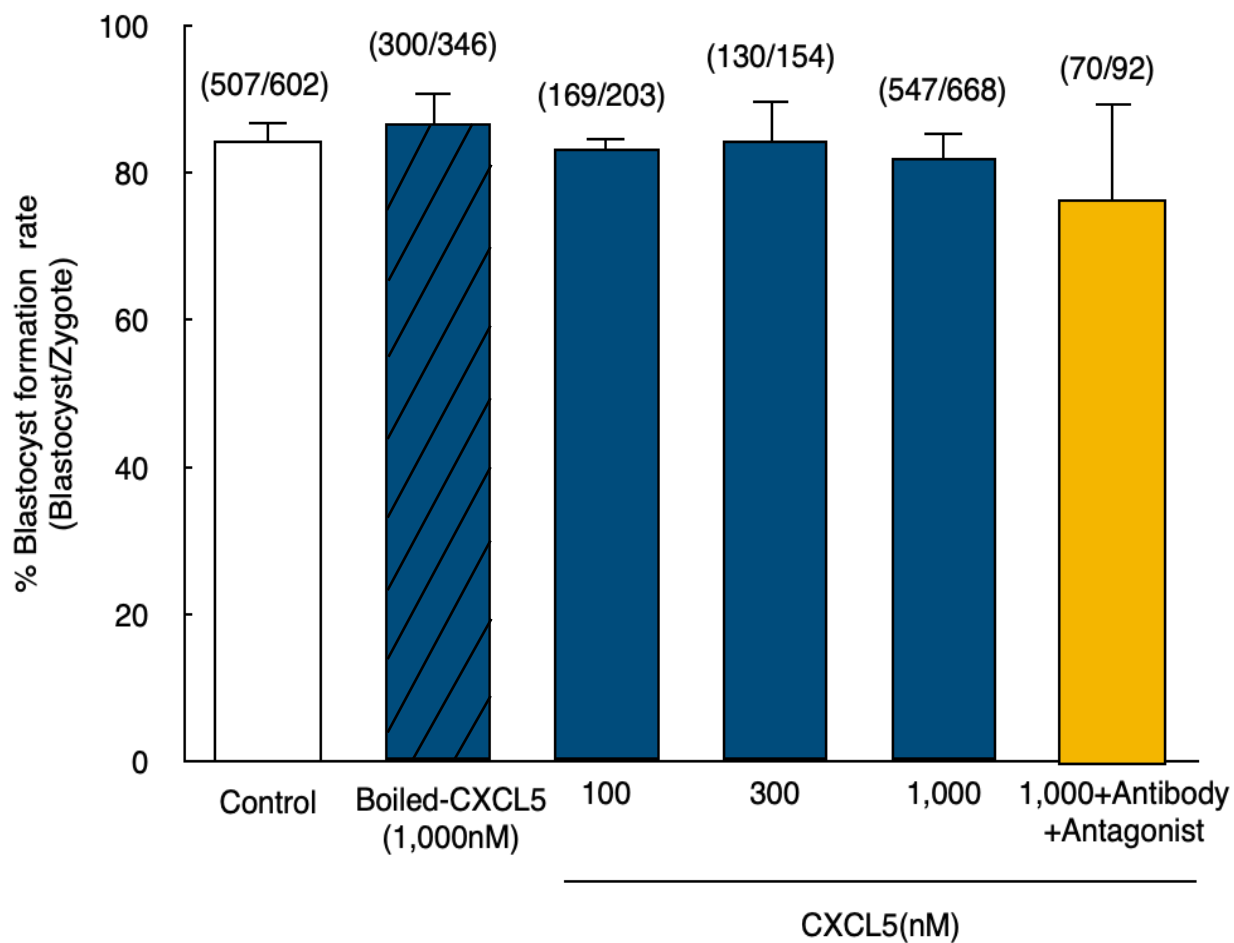


Fig.2 - 1 Blastocyst formation rate of young embryos treated with CXCL5 peptide.

□ : Young, ■ : Young + CXCL5, ■ : Young + CXCL5 1,000nM + CXCL5 antibody 10 µg/ml + CXCR2 antagonist 10 nM

The number of embryos developed to blastocyst vs. total number of embryos are listed on the top of each column.

Data were shown as mean \pm SE. n=10-15 per group.

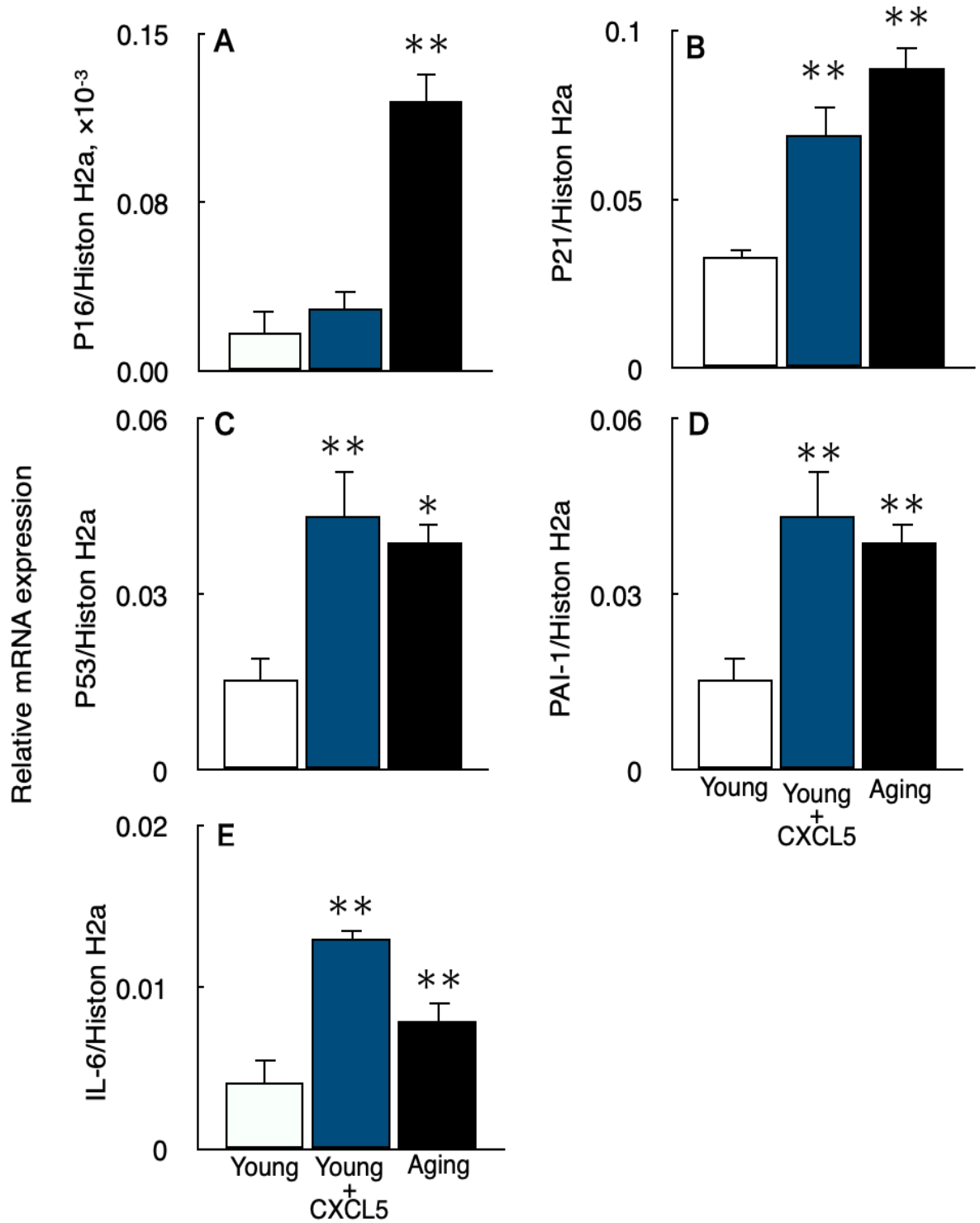


Fig.2 - 2 Expression levels of aging marker (*P16*, *P21*, *P53*, *IL-6*, *PAI-1*) in young embryos treated with CXCL5 peptide.

Statistical significance vs. young control are indicated at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$
Data were shown as mean \pm SE. $n = 5-7$ per group.

A : *P16* expression level, B : *P21* expression level, C : *P53* expression level,
D : *PAI-1* expression level. E : *IL-6* expression level

□ : Young, ■ : Young + CXCL5 1,000nM, ■ : Aging

2) 老化誘導胚の着床能の評価

CXCL5を添加培養した若齢マウス由来胚を偽妊娠マウスに移植したところ、着床率はそれぞれ若齢群で $84.0 \pm 6.3\%$ (49/59)、Boiled-CXCL5添加群で $79.8 \pm 7.0\%$ (39/49)、CXCL5 100nM添加群で $61.9 \pm 12.2\%$ (36/62)、300nM添加群で $53.3 \pm 23.3\%$ (16/30)、1000nM添加群で $35.0 \pm 7.2\%$ (22/64)、CXCL5 1000nM+中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ +アンタゴニスト10nM添加群で $76.7 \pm 23.3\%$ (24/31) であり、CXCL5 1000nMを添加した実験群でのみ有意 ($P < 0.01$)に妊娠率は低下した (Fig. 2-3)。産仔獲得率はそれぞれ若齢群で $65.4 \pm 5.9\%$ (39/59)、Boiled-CXCL5添加群で $49.3 \pm 8.3\%$ (24/49)、CXCL5 100nM添加群で $24.8 \pm 10.1\%$ (15/62)、300nM添加群で $26.7 \pm 14.5\%$ (8/30)、1000nM添加群で $20.7 \pm 8.2\%$ (13/64)、CXCL5 1000nM+中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ +アンタゴニスト10nM添加群で $51.5 \pm 11.6\%$ (16/31) であり、CXCL5を添加した全ての群は若齢群に対して有意 ($P < 0.01$) に低い値を示した (Fig. 2-4)。なお、Fig. 2-3と2-4において、CXCL5 1000nM+中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ +アンタゴニスト10nM添加群ではCXCL5 1000nM添加群と比較して有意 ($P < 0.01$) に高い値を示した。流産率に関してはそれぞれ若齢群で $18.6 \pm 4.2\%$ (10/59)、Boiled-CXCL5添加群 $30.4 \pm 2.8\%$ (15/49)、CXCL5 100nM添加群で $37.1 \pm 16.1\%$ (21/62)、300nM添加群で $26.7 \pm 16.7\%$ (8/30)、1000nM添加群で $14.3 \pm 2.2\%$ (9/64)、CXCL5 1000nM+中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ +アンタゴニスト10nM添加群で $25.2 \pm 13.3\%$ (8/31)であり、全てにおいて有意な差は認められなかった (Fig. 2-5)。

*in vitro*での着床能評価試験の結果、72時間後のディッシュへの胚の接着率に関しては各群間で差は認められなかった (Fig. 2-6)。しかし、Trophoblastの伸展面積は各群でそれぞれ、若齢胚群で $12363.7 \pm 690.6 \mu\text{m}^2$ 、Boiled-CXCL5添加群で $11794.6 \pm 922.1 \mu\text{m}^2$ 、CXCL5 100nM添加群で $8435.8 \pm 704.9 \mu\text{m}^2$ 、300nM添加群で $7973.3 \pm 181.5 \mu\text{m}^2$ 、1000nM添加群で $6752.8 \pm 458.5 \mu\text{m}^2$ であり、CXCL5 100nM添加群 ($P < 0.05$)、300nMと1000nM添加群 ($P < 0.01$)の3群が有意に低い値であった (Fig. 2-7)。Trophoblastic giant cellの数はそれぞれ

若齡胚群で 39.3 ± 1.9 個、Boiled-CXCL5添加群で 41.3 ± 2.9 個、CXCL5 100nM添加群で 30.6 ± 4.7 個、300nM添加群で 26.4 ± 4.1 個、1000nM添加群で 20.3 ± 1.5 個であり、CXCL5 300nMと1000nM添加の両群が有意 ($P < 0.01$) に低い値であった (Fig. 2-8)。なお、各群のTrophoblastの伸展面積状況とTrophoblastic giant cellの染色像はFig. 2-9に示した。

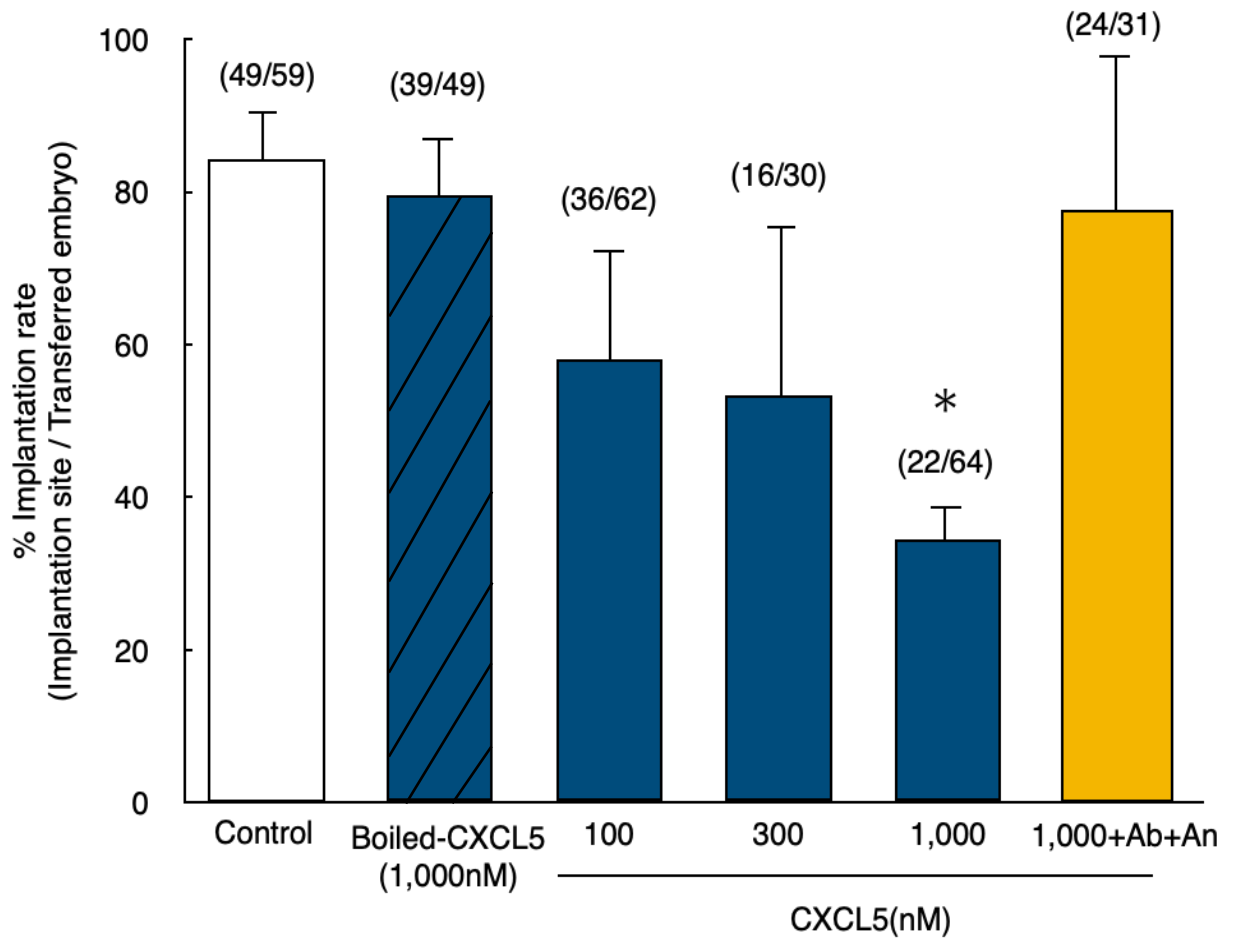


Fig. 2 - 3 Implantation rate of young embryos treated with CXCL5 peptide.

Statistical significance vs. young control is indicated at *P<0.01

□ : Young, ■ : Young + CXCL5, ■ : Young + CXCL5 1,000nM + CXCL5 antibody 10 µg/ml + CXCR2 antagonist 10 nM

The numbers listed on top of each column indicates the number of implantation site/total number of blastocyst transferred.

Data were shown as mean ± SE. n=10-15 per group.

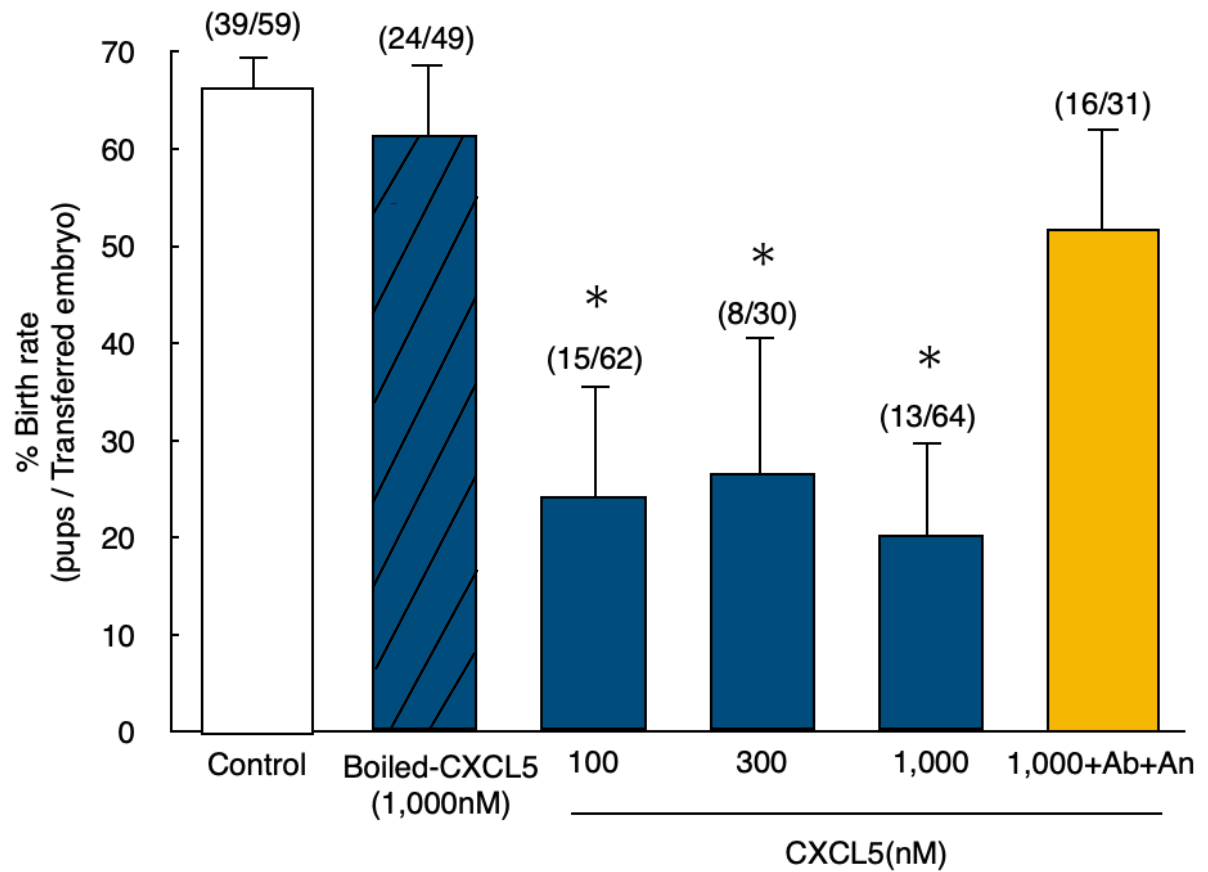


Fig. 2 - 4 Birth rate of young embryos treated with CXCL5 peptide.

Statistical significance vs. young control is indicated at * $P < 0.01$

□ : Young, ■ : Young + CXCL5, ■ : Young + CXCL5 1,000nM + CXCL5 antibody 10 μ g/ml + CXCR2 antagonist 10 nM

The numbers listed on top of each column indicates the number of pups/total number of blastocyst transferred.

Data were shown as mean \pm SE. n=10-15 per group.

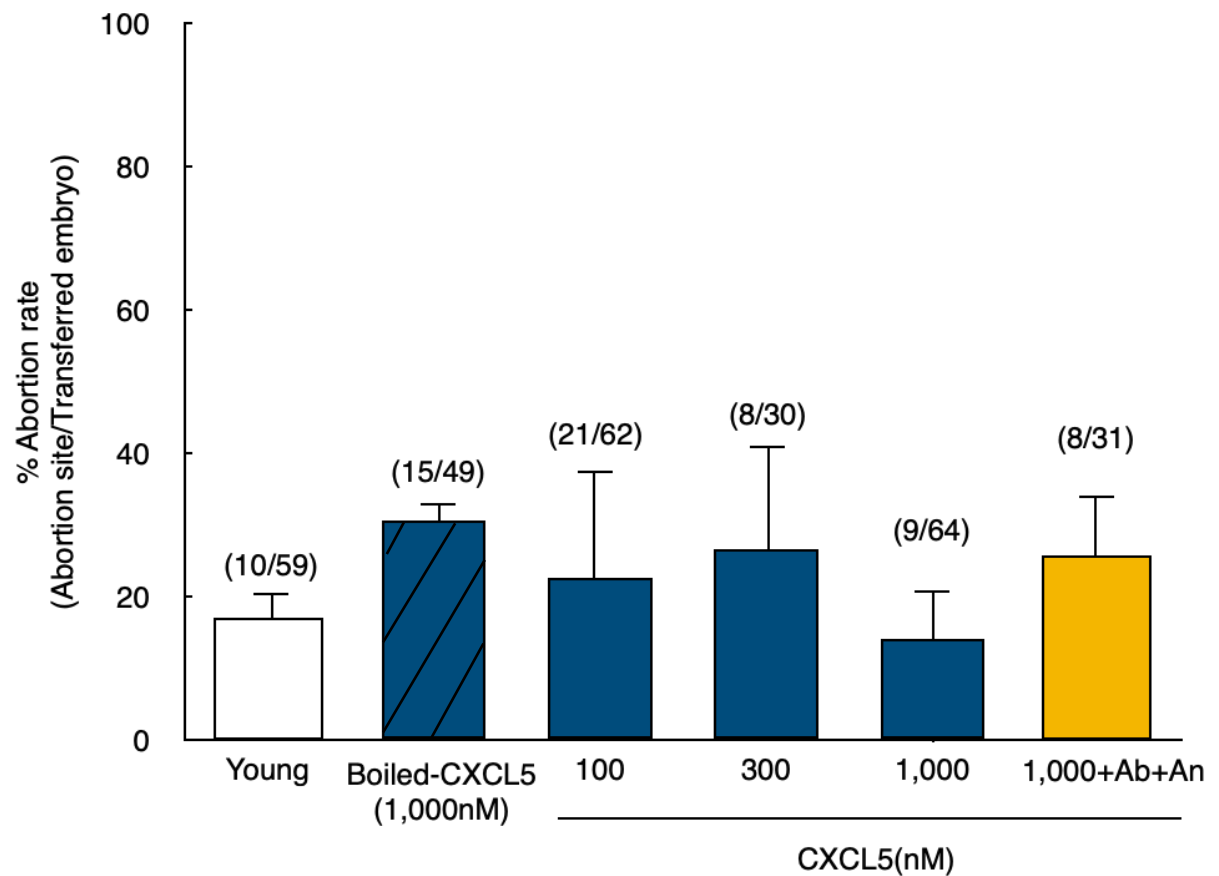


Fig. 2 - 5 Abortion rate of young embryos treated with CXCL5 peptide.

□ : Young, ■ : Young + CXCL5, ■ : Young + CXCL5 1,000nM + CXCL5 antibody 10 µg/ml + CXCR2 antagonist 10 nM

The numbers listed on top of each column indicates the number of abortion site/the number of blastocysts transferred.

Data were shown as mean ± SE. n=10-15 per group.

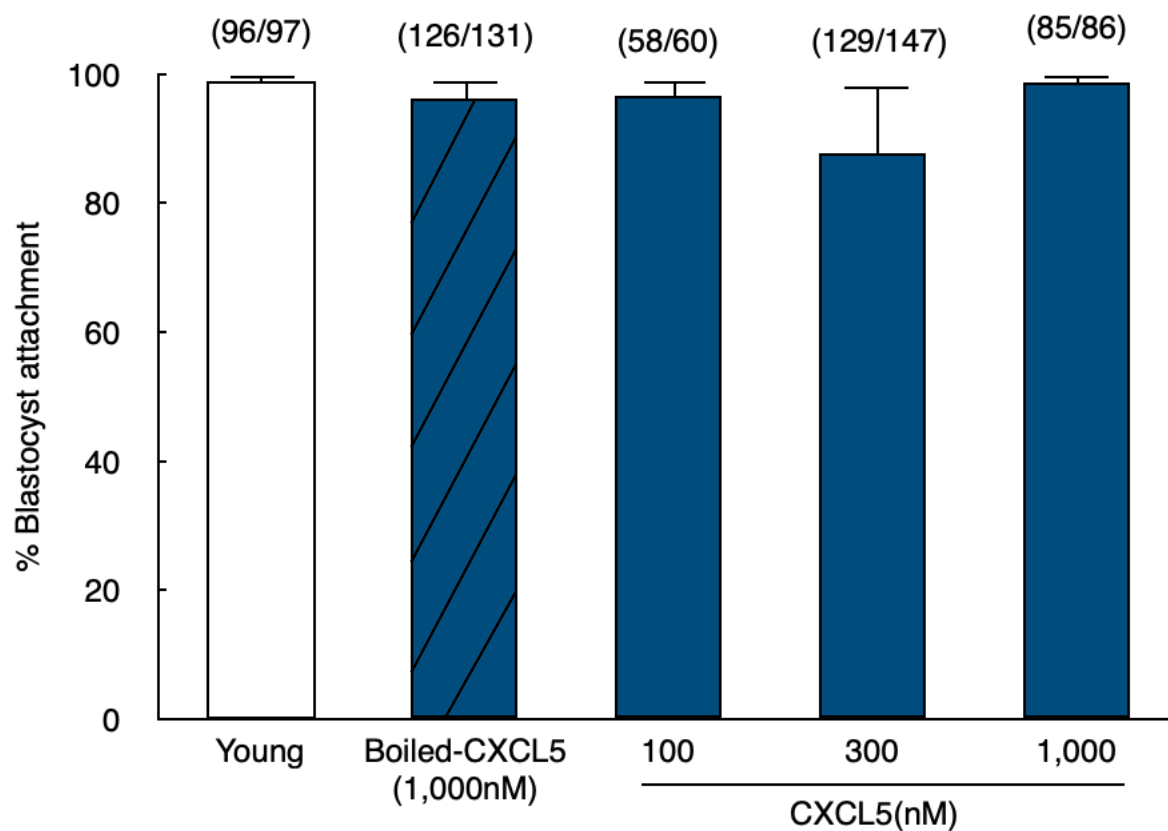


Fig. 2 - 6 Blastocyst attachment rate in *in vitro* implantation assay.

□ : Young, ■ : Young + CXCL5

The numbers listed on top of each column indicates the number of attached embryos/total number of blastocysts cultured.

Data were shown as mean \pm SE. n=5-8 per group.

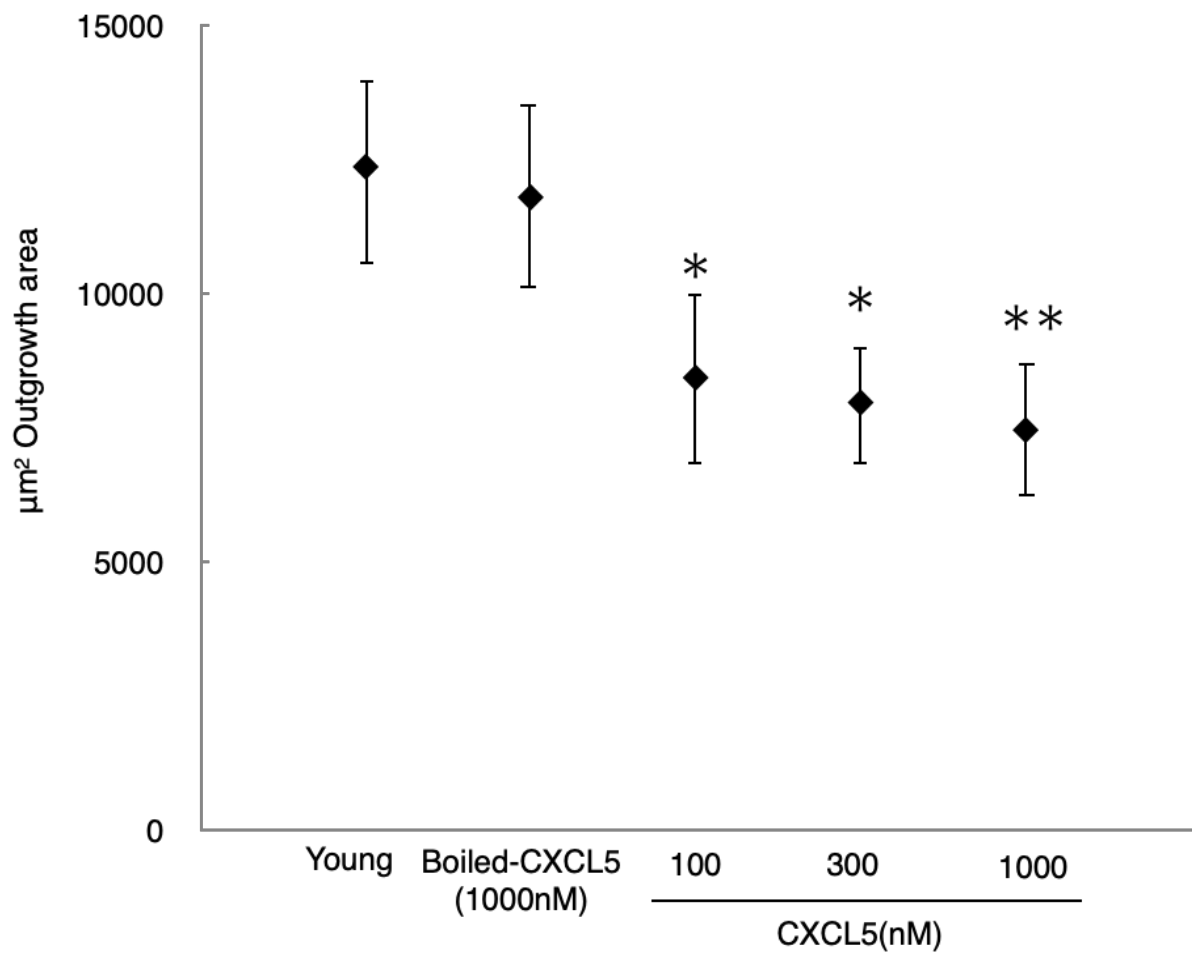


Fig. 2 - 7 Outgrowth area of embryo which was treated by CXCL5.

Statistical significance vs. young control are indicated at *P<0.05 and **P<0.01

Data were shown as mean \pm SE. n=5-8 per group.

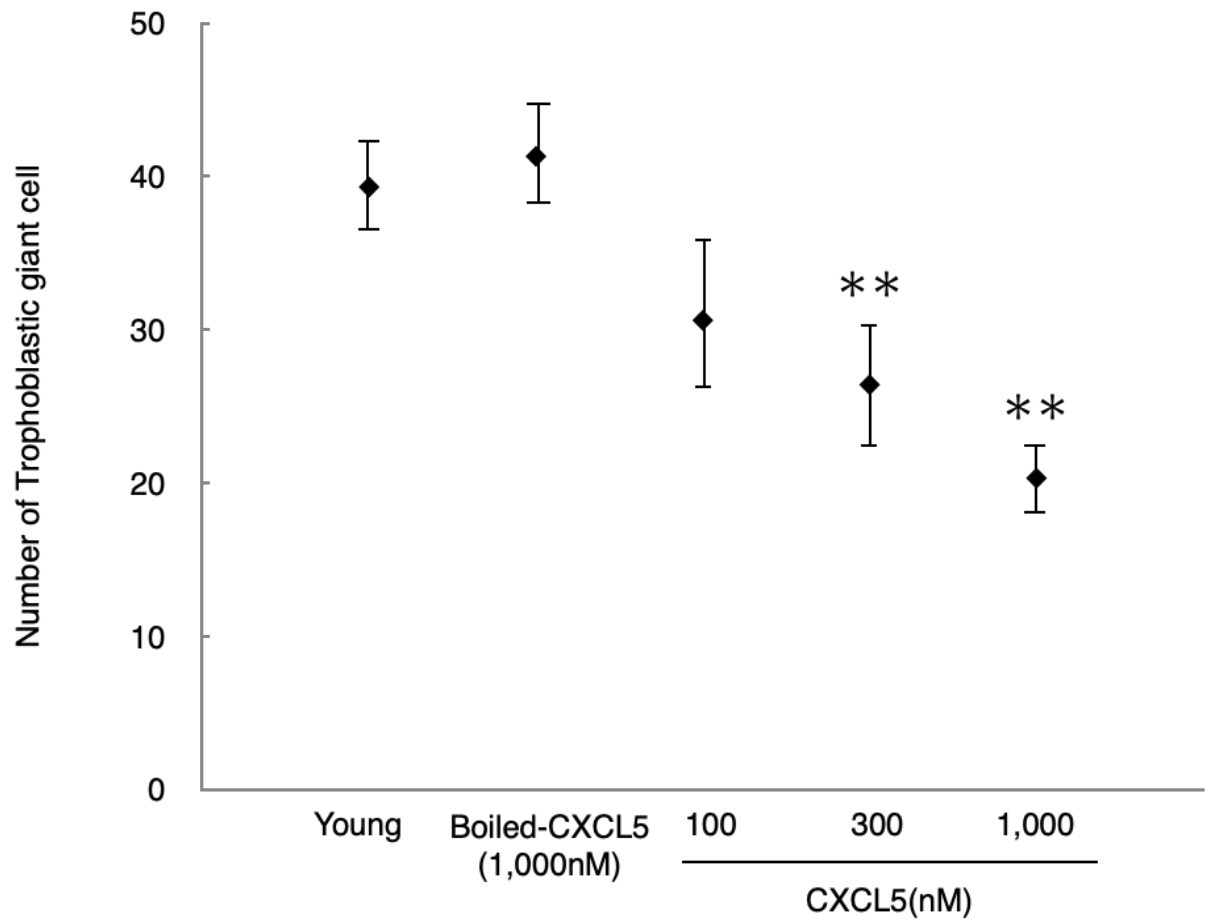


Fig. 2 - 8 The number of trophoblastic giant cells which were treated by CXCL5.

Statistical significance vs. young control is indicated at ** $P < 0.01$
 Data were shown as mean \pm SE. $n=5-8$ per group.

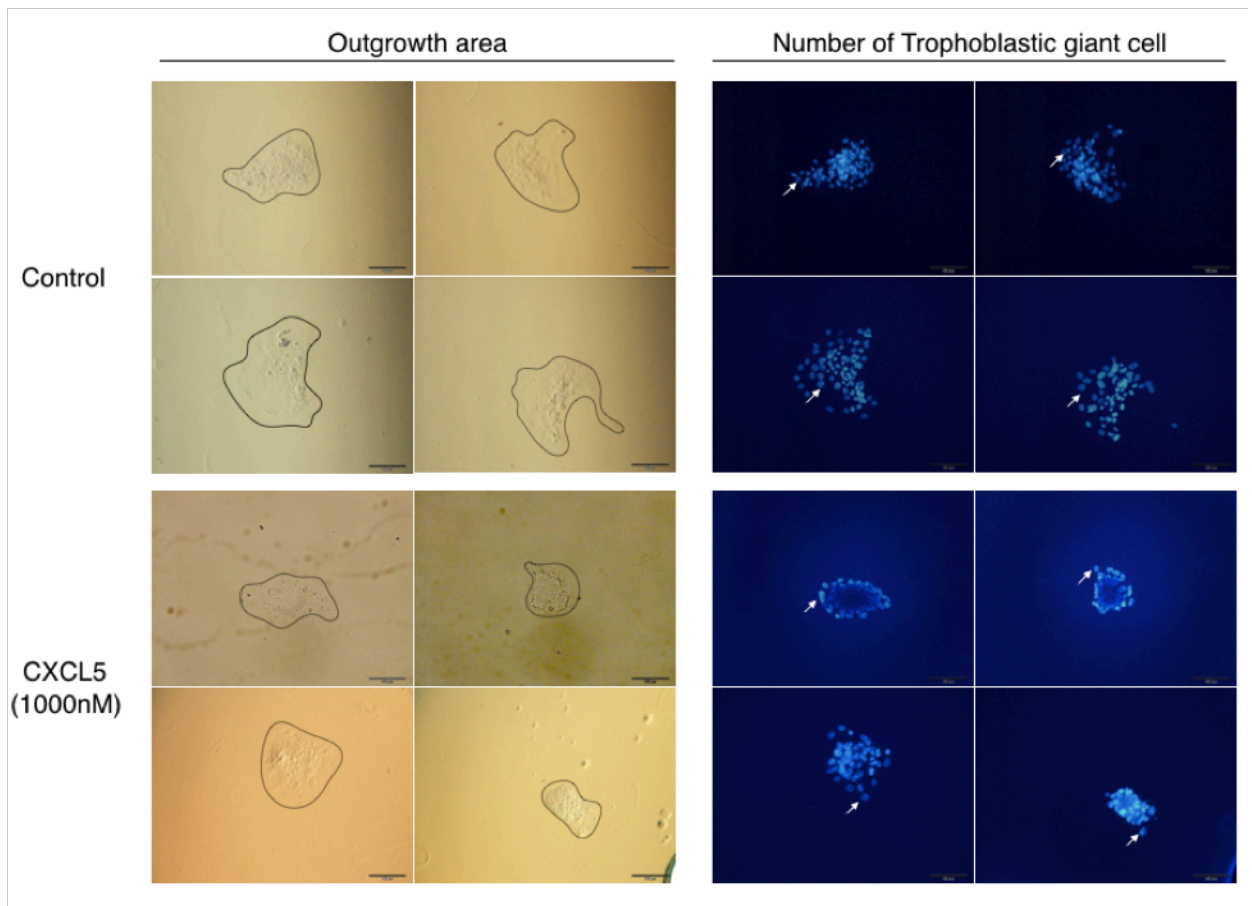


Fig. 2 - 9 Representative image of the outgrowth embryo which was treated by CXCL5.

The enclosed area indicates outgrowth area for each group.

Arrows indicates trophoblastic giant cell.

All embryos were observed under x200 magnification.

4. 考 察

マイクロアレイを用いてヒト胚の遺伝子発現を網羅的に比較解析した結果、抽出した老化誘導候補因子であるCXCL5の老化誘導効果が第II章で示唆された。そこで本章では、CXCL5の添加の影響をマウス胚を用いた動物実験で詳細に解析した。前述したように、細胞老化は炎症性サイトカインであるSASP因子を放出し、それがオートクライン、パラクライン作用により、自らおよび周囲の細胞の老化を促進すると考えられている。特にAcostaら (40)は、CXCR2遺伝子を介した炎症性シグナル伝達が細胞の老化促進に重要であることを体細胞株を用いた研究により解明している。CXCL5のレセプターもCXCR2でありSASP因子の1つとして老化の促進に関与していることが考えられる。本章では、CXCL5を作用させた若齢マウス胚では、老化マーカーとされている代表的な遺伝子のうち、*P21*、*P53*、*PAI-1*、*IL-6*の4つの遺伝子の発現が有意に上昇することを確認した。また、CXCL5の添加は胚盤胞の発生に関して影響を及ぼさなかったものの、着床率は濃度依存的に低下した。したがって、マウス胚ではCXCL5によって老化に伴う胚の質の低下が誘導され、その結果、着床率が低下したことが示唆される。さらに、着床の影響と妊娠率の低下の原因を解明するために、*in vitro*で着床能評価を行なった。CXCL5を作用させた胚を培養ディッシュ上に静置し追加培養し、ディッシュ底面への接着率を観察した結果、若齢マウスの対照群とCXCL5添加群間で差は認められなかった。しかし、接着した後のTrophoblastの伸展面積はCXCL5を添加した胚で有意に縮小した。また、*in vitro*の着床能の指標となるTrophoblastic giant cellの細胞数を比較したところ、CXCL5を添加した胚では細胞数に有意な減少が見られた。したがって、老化によるCXCL5の発現亢進がTrophoblastの細胞増殖抑制と、老化マーカーの1つである*PAI-1*の発現上昇を引き起こすと、子宮内膜に胚は接着するが、内膜に浸潤する際に分泌されるMMP (Matrix metalloproteinase) タンパク質の活性が抑制され、その後の子宮内膜筋層への浸潤と浸潤後の細胞増殖はさらに抑制され、妊娠率の低下につながったと推察された。

先行研究により、SASP因子が老化細胞から分泌され、それがオートクライン、パラクライン作用によりさらなる老化を誘導することは報告されている (40, 101)。特に*IL-8*や*CXCL1*などの細胞老化促進効果についての報告 (40, 41, 99)が多くなされているが、本研究では第II章に示したように、ヒト老化胚の遺伝子発現プロファイルでは*CXCL5*の発現は上昇していたが、*IL-8*や他のケモカインなどの炎症性分泌因子の発現は*CXCL5*ほど高発現ではなかった。体内の臓器の中で最も早く老化する臓器の1つと考えられている卵巣の中でも、特に初期段階から高発現していると思われる*CXCL5*が、老化を誘導する因子の中でも重要な因子であることが推察される。

老化は生物が抗うことができない現象であり、どのような生物においてもその機構は保存されていると考えられている。最近では、生物の老化は組織幹細胞の老化による自己増殖能力の低下が大きな要因であり、新たな細胞を供給できないために組織が老化し、その結果個体老化に進行することが示唆されている (102)。また、幹細胞の増殖能力の低下は細胞周期を制御する遺伝子の発現変動が主な原因であることが報告 (103)されているが、その原因は未だに良く分かっていない。哺乳類の卵子と胚は幹細胞の集合体であり、胚盤胞の段階では胎児(仔)に分化する内部細胞塊と胎盤形成の基となるTrophoblastになり分化と発生が進んで行く。本章では、*CXCL5*を胚に作用させるとTrophoblastの細胞増殖能が低下することを確認した。しかし、マウスの胎仔には特に影響が見られなかった。したがって、高い未分化能を有する内部細胞塊のような細胞では*CXCL5*添加による細胞増殖能低下は見られず、ある程度分化が進んだTrophoblastのような段階の細胞には*CXCL5*が顕著に影響を及ぼした可能性がある。しかし本章の研究だけでは、*CXCL5*の幹細胞老化に関する影響については仮説の域を出ない。今後老化のメカニズムを解き明かす上でさらなる研究が必要である。

体性幹細胞はある程度限定された種類の細胞に分化する幹細胞であり、各臓器に分化する細胞の供給を担っている (104)。*CXCL5*の添加によって胚内部の幹細胞の老化が促進したと

考えると、卵子や胚の質の低下という限定された効果だけではなく、CXCL5は生物の老化そのものに影響を及ぼしている可能性も考えられる。

本章では胚に限定して炎症性サイトカインであるCXCL5を作用させその効果を検証したが、CXCL5のノックインマウスを作出し、全身性に恒常的にCXCL5を発現させた場合の種々の細胞や組織への影響を検討する必要がある。

第IV章 CXCL5シグナル制御による高齢マウス由来生殖細胞の質の改善

1. 緒 言

老化による妊娠率低下の主な原因として、染色体の異数性卵子の増加が指摘されている。ヒトでは、40歳以上の高齢不妊患者の約50%の卵子が染色体異数性であることが報告されており、妊娠率の低下と流産率の増加が認められる (105)。最近では、染色体の異数性スクリーニングテスト (Preimplantation genetic test for aneuploidy: PGT-A)を行い、染色体異常の胚を移植対象から外すことによる流産率と着床率の改善が試みられている (106)。また、マウスの卵子でも老化に伴う染色体の異数性卵子の増加が見られるが、ヒトと比較してマウスではその割合は少なく、40週齢以上の老化したマウスでは約20%と言われている (105)。しかし、ヒトと同様に着床率自体は低下する。このように、老化に伴い染色体の異数性卵子は増加するが、その割合が低いマウスでも老化に伴う妊娠率の低下が見られる。また、ヒトでも染色体数が正常な胚でも老化に伴い妊娠率が低下することから、染色体の異数性以外のなんらかの原因が老化卵子の着床率の低下を招いていると推察される。

高齢不妊症患者の治療法として最も臨床成績の良い方法は、若齢患者のドナー卵子を用いた体外受精であるが、倫理問題や免疫不適合による妊娠合併症の増加などの問題があるため優れた治療法とは言い難い (107)。したがって、現在は患者自身の卵子の質を改善させることが極めて重要である。これまでに、老化による胚の質の低下を改善する方法として、卵子細胞質中へのミトコンドリアの移植 (108, 109)や、培養液への成長因子の添加 (110)、抗酸化作用のあるサプリメントの摂取 (73, 111)など様々な方法が試みられている。しかし、その効果について懐疑的な見解も多く (70, 112)、未だに確立された方法がないのが現状である。これまでに試みられてきた多くの方法では、胚に悪影響を及ぼす酸化ストレスや培養環境などの外的要因に対してほとんど満足のいく結果は得られていない。そこで本研究では、胚が自ら産

生する内在性の因子 (SASP)が老化を促進する可能性に着目して、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行なった。その結果、炎症関連分泌因子であるCXCL5をその候補因子として抽出した。第Ⅲ章では、若齢マウス胚にCXCL5を作用させ老化の促進を試みた結果、いくつかの老化マーカーの増加と着床率の低下が見られたことから、CXCL5が胚の老化を誘導しそれに伴って質が低下することが示唆された。*in vitro*における着床能評価では、Trophoblastの細胞数の減少と伸展面積の縮小が観察されたため、CXCL5が胚に作用して特に着床後の胚の細胞増殖に影響を及ぼし、それが着床率の低下の原因になっていると考えられた。実際の高齢個体由来胚においてもCXCL5が胚の質の低下を促進し、着床率低下が引き起こされていると推察される。

これまでに、細胞や個体の老化を抑制するためにさまざまな研究が試みられている。Watrobaら (113)は、細胞のヒストン脱アセチル化を行う酵素である*Sirtuin*遺伝子を活性化すると、生物の寿命の延長が見られると報告をしている。*Sirtuin*の活性化には、Imaiら (114)が報告しているように、細胞内に存在している酸化還元反応の補酵素であるニコチンアミドチアンジヌクレオチド (NAD⁺)の濃度を上昇させると、NAD⁺依存性脱アセチル化酵素である*Sirtuin1*および3の活性化がみられる。またBhullarら (115)は、スチルベノイドポリフェノールの一種で抗酸化物質として知られるレスベラトロールの摂取により、*Sirtuin*を活性化すると抗老化作用がみられることを報告している。さらに、Blagosklonnyら (116)が報告しているように、細胞内のシグナル伝達に関わっているmammalian Target of Rapamycin (*mTOR*) シグナルの阻害による抗老化作用によりマウスの寿命が伸びるという報告もある。*mTOR*シグナル経路と*Sirtuin*シグナルのクロストークも報告 (117)されているように、一つのシグナルの抑制および活性化が他のシグナル経路にも影響を与えることを考えると、制御するシグナルによっては広範囲に生物学的機能に影響する場合があります、十分にその安全性を確認する必要がある。

このように、細胞内シグナル経路を制御することによって、老化に伴う細胞の質の低下を

改善する試みは生殖細胞でも当然行われているが、効果的な方法は未だに確立されていない。そこで本章では、高齢マウスの胚を用いて、老化を促進していると考えられるCXCL5シグナルの抑制による胚の質の改善効果を評価した。CXCL5の中和抗体やCXCR2のアンタゴニストを添加した培地で、高齢マウスの胚を培養してCXCL5シグナルを抑制し、それらの老化胚を偽妊娠レシピエントマウスに移植して、着床率と産仔獲得率および流産率に対する影響を検討した。また、生殖細胞の種々のシグナル制御によるアンチエイジングは、体細胞へのアンチエイジングとは違い次世代への影響も考慮する必要がある。そこで、本章ではCXCL5シグナル経路を抑制した高齢マウス由来胚の遺伝子発現を、若齢マウスおよび高齢マウス由来胚と比較して、CXCL5シグナルの抑制が胚の遺伝子発現にどの程度影響を与え、若齢マウス胚の遺伝子発現プロファイルに近づいていくかを検討した。さらに、これらのシグナルを抑制した場合、高齢マウス由来胚の産仔および胎盤に影響があるかを形態学的に評価した。

2. 実験材料および実験方法

1) 高齢マウス由来胚を用いたCXCL5シグナル抑制胚の作製と着床能の評価

(1) 供試動物および供試試料

供試動物は、若齢マウスとして3～6週齢のICRマウスを、高齢マウスとして43～53週齢のICRマウスを用いた。また、移植用の若齢マウスは6～8週齢のICRマウスを用い、精子採取用の雄マウスは6～8週齢のICRマウスを用いた。これらのマウスはクレアジャパンおよびSLCジャパンから購入した。マウスは通常のコントロールされた環境下で飼育した (室温; 22℃、湿度; 55～65%、明暗サイクル; 12時間ごと)。全ての動物実験は聖マリアンナ医科大学 (承認番号 No.1606008)および国際医療福祉大学 (承認番号 No. 18029)の実験動物委員会の動物実験ガイドラインに乗っ取って行なった。

(2) マウス卵子の体外受精

第Ⅲ章と同様の方法で行なった。

(3) 体外培養における*CXCL5*シグナルの抑制

受精した前核期胚を*CXCL5*の中和抗体 (abcam, ab12089 or R&D systems, MAB433) と *CXCR2* のアンタゴニスト (TOCRIS, SB225002) を添加したKSOM中で培養し、*CXCL5*シグナルの抑制を試みた。高齢マウスの前核期胚をミネラルオイルで覆った30 μ lのKSOM中で培養した。KSOMに*CXCL5*の中和抗体を濃度が0.1、1.0、10 μ g/mlに、*CXCR2*のアンタゴニストを濃度が10、30nMになるように調製して、それぞれ単体で添加した群と、中和抗体とアンタゴニストを同時に添加した群に分けて培養した。48時間ごとに新しいメディウムに交換し、96時間培養した。コントロール群は*CXCL5*シグナル非抑制高齢マウス胚とした。

(4) *CXCL5*シグナル抑制胚の胚盤胞到達率の測定

*CXCL5*シグナルの抑制による胚の発育への影響を評価するため、各実験群で96時間胚の培養を行い胚盤胞に到達した胚の割合を算出した。

(5) シグナル抑制胚の偽妊娠若齢マウスへの移植

第Ⅲ章と同様の方法で胚移植を行なった。

(6) 着床率、産仔獲得率、流産率の測定

第Ⅲ章と同様の方法で算出した。

(7) *CXCL5*シグナル抑制胚由来産仔の形態学的評価

胚移植により移植した偽妊娠マウスは妊娠19.5日目に頸椎脱臼により屠殺し、速やかに子宮を取り出し子宮内の胎仔と胎盤を摘出した。摘出した胎仔と胎盤の重量を測定し、形態学的な異常の有無を確認した。

2) *CXCL5*シグナル抑制による高齢マウス由来胚の遺伝子発現への影響

(1) 供試動物

上述した実験動物と同様のものを用いた。

(2) マウス卵子の体外受精

第Ⅲ章と同様の方法で行なった。

(3) *CXCL5*シグナル抑制高齢マウス胚の作出

上述した方法で行なった。

(4) DNAマイクロアレイを用いた各胚盤胞間の遺伝子発現解析

第Ⅱ章と同様の方法でRNA抽出とアレイプラットフォームへのハイブリダイゼーション、蛍光シグナルの定量を行なった。マイクロアレイのプラットフォームは、Agilent Sure Print G3 Mouse GE v2 8x60K Microarray (Agilent)を用いた。

(5) 主成分分析による各胚盤胞間における遺伝子発現の類似性

それぞれの群の胚の遺伝子発現プロファイルの類似性を比較するために、主成分分析によって、各遺伝子発現プロファイルの類似度を測定した。主成分分析は統計ソフトR (v. 3.5.3)のパッケージ (prcomp)を用いて行なった。

3) *CXCL5*シグナル抑制による若齢マウス由来胚への副作用の有無

(1) 供試動物

上述した実験動物と同様のものを用いた。

(2) マウス卵子の体外受精

第Ⅲ章と同様の方法で行なった。

(3) 体外培養における*CXCL5*シグナルの抑制

上述した方法で行なった。

(4) CXCL5シグナル抑制胚の胚盤胞到達率の測定

上述した方法で行なった。

(5) シグナル抑制胚の偽妊娠若齢マウスへの移植

第Ⅲ章と同様の方法で胚移植を行なった。

(6) 着床率、産仔獲得率、流産率の測定

第Ⅲ章と同様の方法で算出した。

3. 結 果

1) 高齢マウス由来胚を用いたCXCL5シグナル抑制胚の作製および着床能の評価

高齢マウス胚のCXCL5シグナルを、中和抗体およびレセプターのアンタゴニストのそれぞれ単独の添加、あるいは中和抗体およびアンタゴニストの両方を混合添加した培養液で培養し、老化に伴う胚の質の低下が改善できるかを評価した。それぞれの実験群の胚の発生への影響を観察した結果、各群で胚盤胞到達率に差は認められなかった (Fig. 3-1)。次に、CXCL5シグナルを抑制した高齢マウス由来胚を偽妊娠マウスに移植し、妊娠率への影響を検討した。その結果、着床率はそれぞれ、高齢群で $27.3 \pm 14.1\%$ (12/30)、CXCL5の中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加群で $68.7 \pm 13.8\%$ (38/55)、CXCR2アンタゴニスト 10nM 添加群で $77.1 \pm 11.4\%$ (27/35)、中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ とアンタゴニスト 10nM 混合添加群で $85.5 \pm 5.5\%$ (46/54)であり、中和抗体およびアンタゴニスト単独添加群、あるいは中和抗体とアンタゴニスト混合添加群は、高齢群と比較して有意 ($P < 0.01$) な着床率の改善が見られた (Fig. 3-2)。産仔獲得率はそれぞれ、高齢群で $10.0 \pm 6.9\%$ (5/30)、CXCL5の中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加群で $24.6 \pm 9.7\%$ (14/55)、CXCR2アンタゴニスト 10nM 添加群で $29.2 \pm 4.8\%$ (10/35)、中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ とアンタゴニスト 10nM 混合添加群で $40.8 \pm 9.2\%$ (22/54) であり、中和抗体とアンタゴニスト混合添加群が高齢群と比較して有意 ($P < 0.01$) に高い値を示した (Fig. 3-3)。なお、若齢群と中和抗体とアン

タゴニスト混合添加群間に有意な差は認められなかった（データは示していない）。流産率はそれぞれ、高齢群で $63.5 \pm 19.2\%$ (7/12)、CXCL5の中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加群で $44.2 \pm 11.0\%$ (24/38)、CXCR2アンタゴニスト 10nM 添加群で $42.5 \pm 11.6\%$ (17/27)、中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ とアンタゴニスト 10nM 混合添加群で $44.7 \pm 7.9\%$ (24/46) であり、これらは高齢群と比較して差は認められず、流産率の改善は認められなかった (Fig. 3-4)。

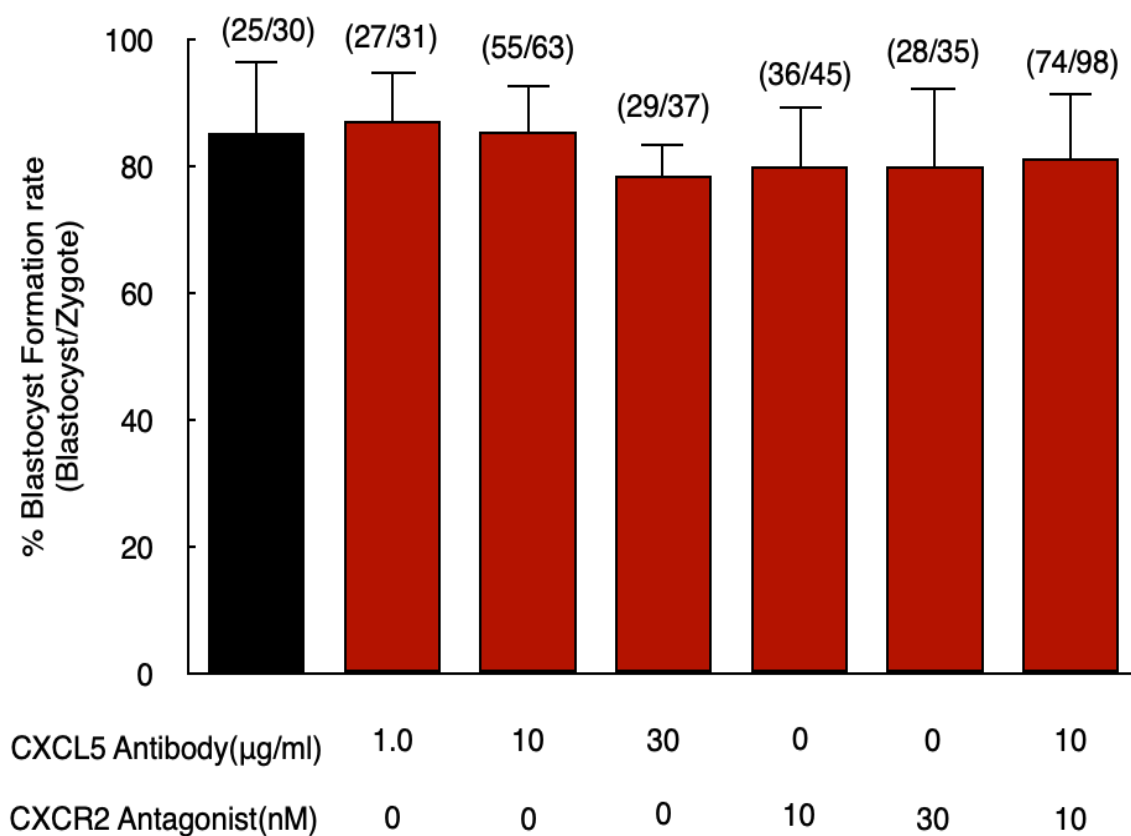


Fig. 3 - 1 Blastocyst formation rate of aging embryos with suppression of *CXCL5-CXCR2* signaling.

■ : Aging, ■ : Aging + *CXCL5* signal suppression

The number of embryos developed to blastocyst vs. total number of embryos are listed on the top of each column.

Data were shown as mean \pm SE. n=10-15 per group.

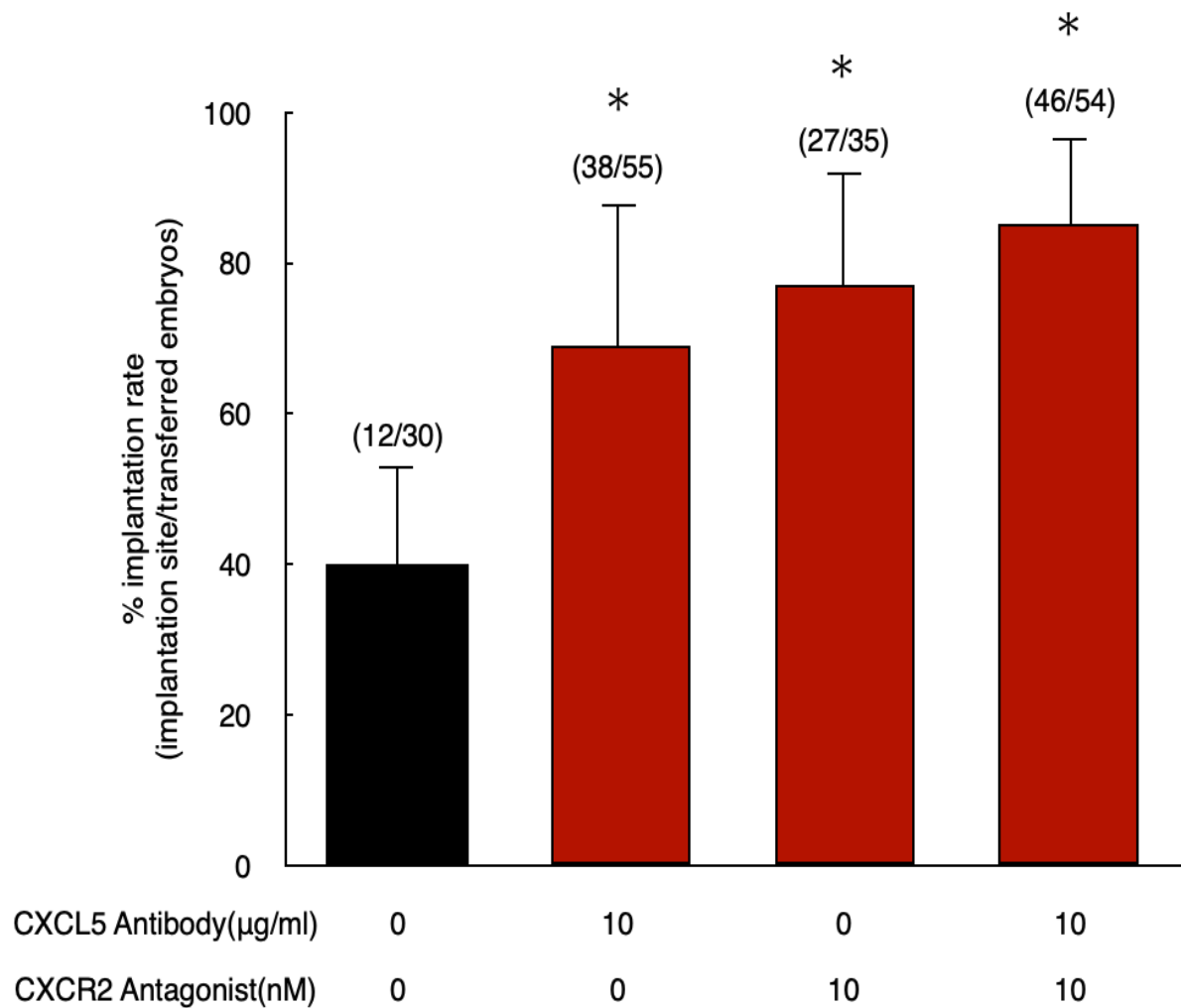


Fig. 3 - 2 Implantation rate of aging embryos which was inhibited *CXCL5* signal.

Statistical significance vs. young control is indicated at * $P < 0.01$

The numbers listed on top of each column indicated the number of implantation sites/total number of blastocysts transferred.

Data were shown as mean \pm SE. $n = 10-20$ per group.

■ : Aging, ■ : Aging + *CXCL5* suppression

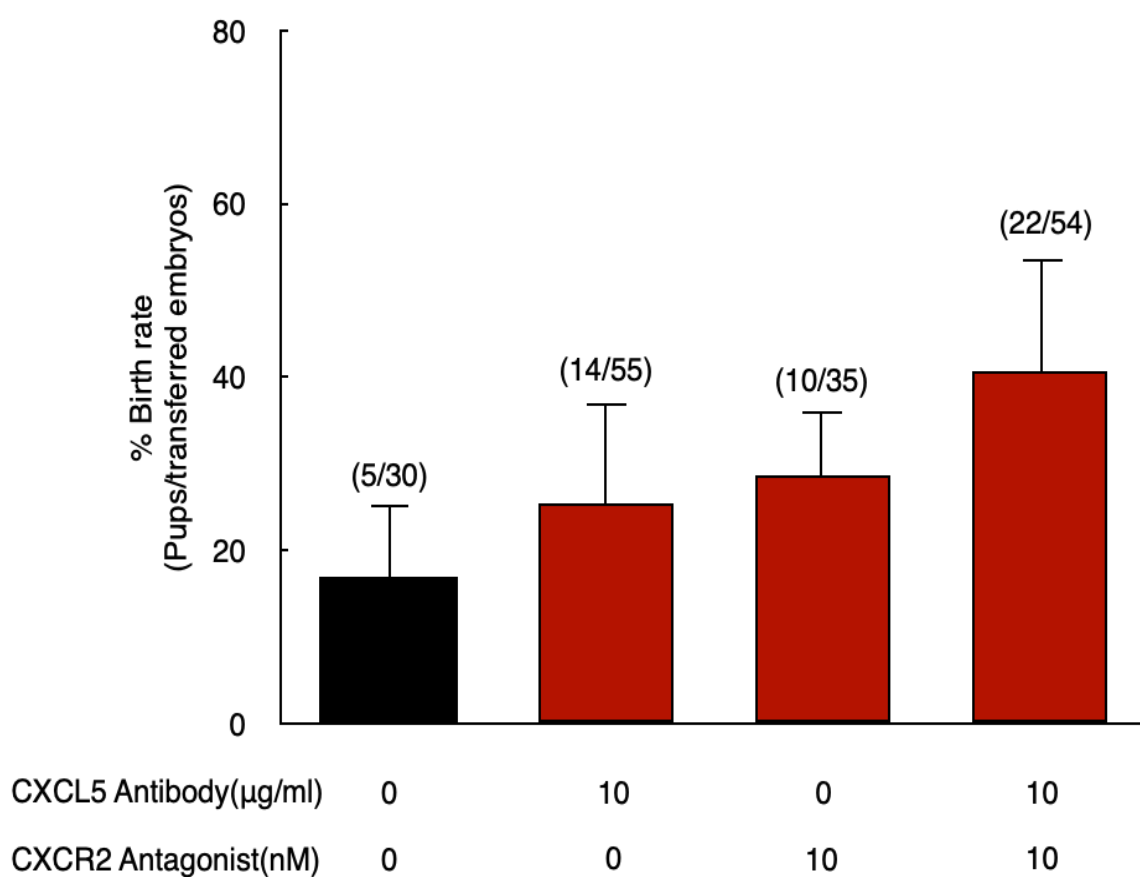


Fig. 3 - 3 Birth rate of aging embryos which was inhibited *CXCL5* signal.

The numbers listed on top of each column indicated the number of pups/total number of blastocysts transferred.

Data were shown as mean \pm SE. n=10-20 per group.

■ : Aging, ■ : Aging + *CXCL5* suppression

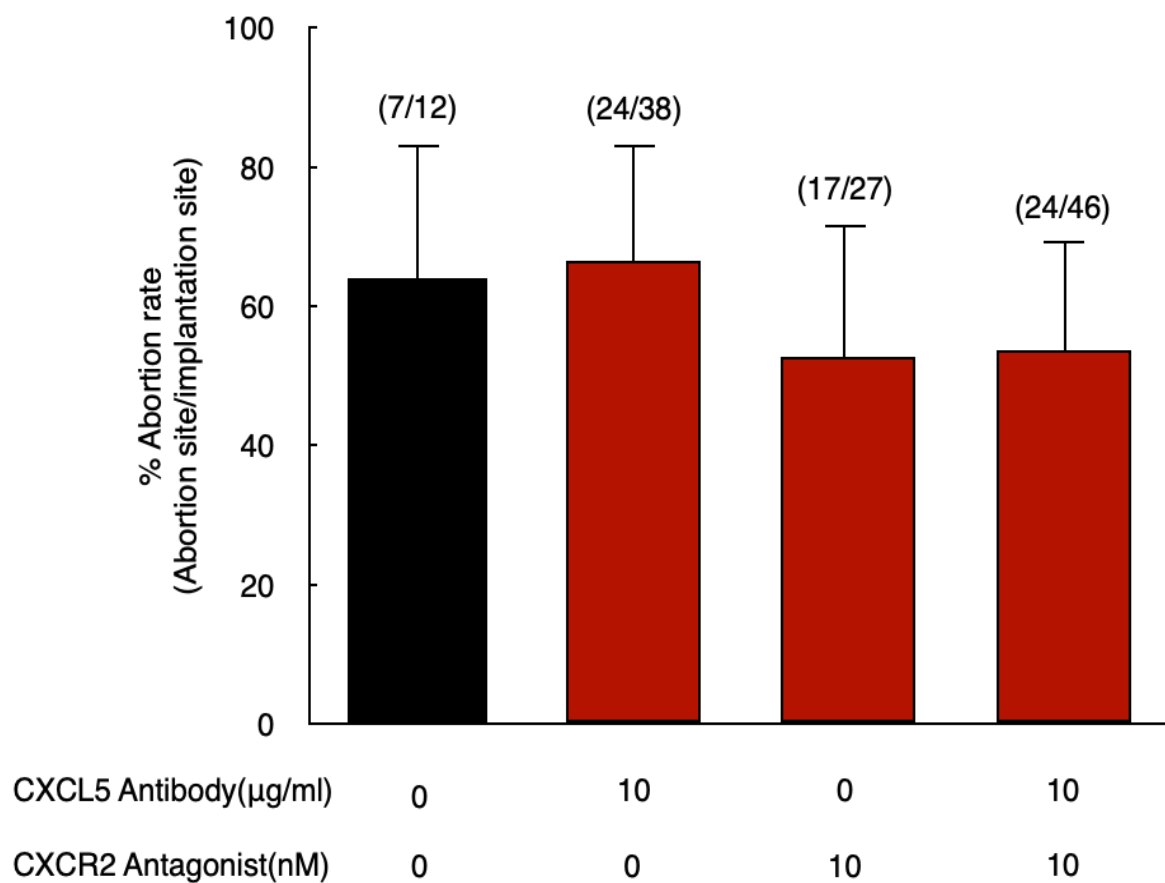


Fig. 3 - 4 Abortion rate of aging embryos which was inhibited *CXCL5* signal.

The numbers listed on top of each column indicated the number of abortion site/total number of blastocysts transferred.

Data were shown as mean \pm SE. n=10-20 per group.

■ : Aging, ■ : Aging + *CXCL5* suppression

得られた産仔と胎盤の外見的な異常の有無を観察した結果、特に異常は認められなかった (Fig. 3-5)。また、産仔と胎盤の重量を測定したところ、産仔の重量はそれぞれ若齢群で 1.43 ± 0.08 g (N=13)、高齢群で 1.89 ± 0.05 g (N=10)、*CXCL5*シグナル抑制群で 1.59 ± 0.11 g (N=8)であり、高齢群で有意 ($P < 0.01$)に高い値を示し、中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ とアンタゴニスト 10nM を混合添加した*CXCL5*シグナル抑制群は若齢群と差は認められなかった。さらに、胎盤重量はそれぞれ若齢群で 174.6 ± 12.9 mg (N=13)、高齢群で 159.5 ± 5.6 mg (N=10)、*CXCL5*シグナル抑制群で 181.0 ± 16.2 mg (N=8)であり、各群間で差は認められなかった (Fig. 3-6)。

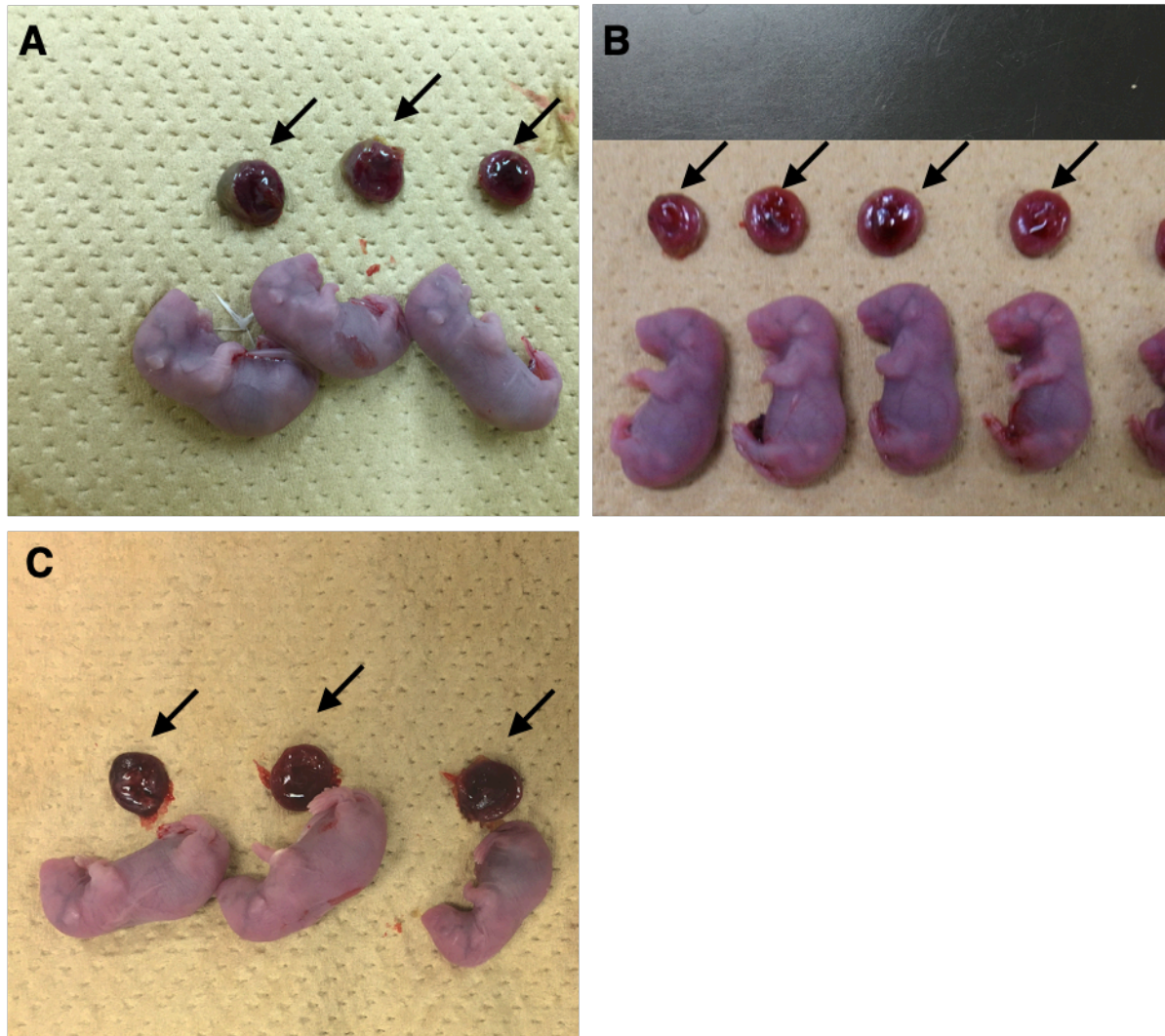


Fig.3 - 5 Pups and placentas derived from aging embryos which was suppressed *CXCL5* signal (19.5dpc).

A: Young embryo, B: Aging embryo, C: Aging embryo suppressed with *CXCL5* signal, Arrows indicates placenta.

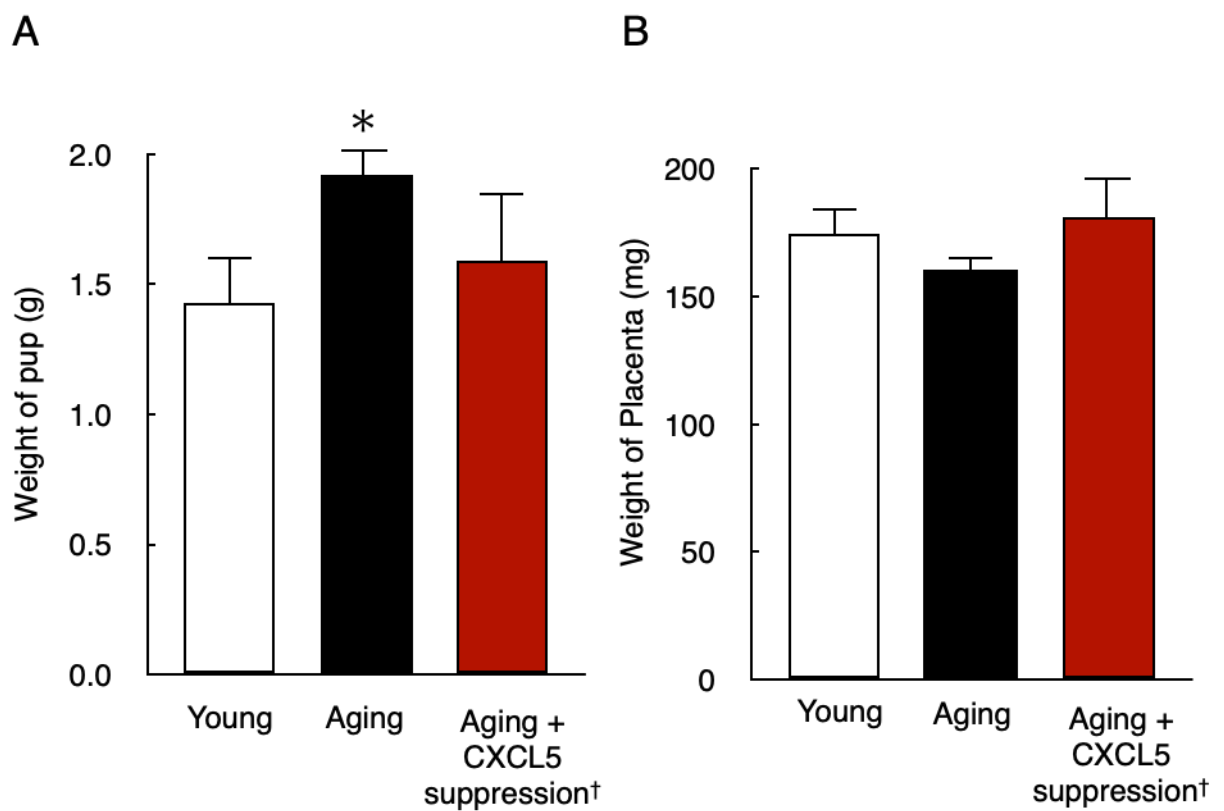


Fig.3 - 6 Comparison of the weight of pups and placenta which was derived from various embryos

Statistical significance vs. young control is indicated at * $P < 0.01$

A: Weight of pups, B: Weight of placenta

†: CXCL5 antibody 10 $\mu\text{g/ml}$ + CXCR2 antagonist 10 nM

2) *CXCL5*シグナル抑制による高齢マウス由来胚の遺伝子発現への影響

*CXCL5*シグナルの抑制が胚の遺伝子発現にどのように影響するかを評価するため、*CXCL5*シグナルを抑制した高齢マウス胚の遺伝子発現を若齢マウス胚、高齢マウス胚と比較し、遺伝子発現プロファイルの変化を評価した。それぞれの胚の遺伝子発現をマイクロアレイで解析した結果、*CXCL5*シグナルを抑制した高齢マウス由来胚の遺伝子発現プロファイルは若齢マウス胚のものに類似していくことが示唆された (Fig. 3-7)。

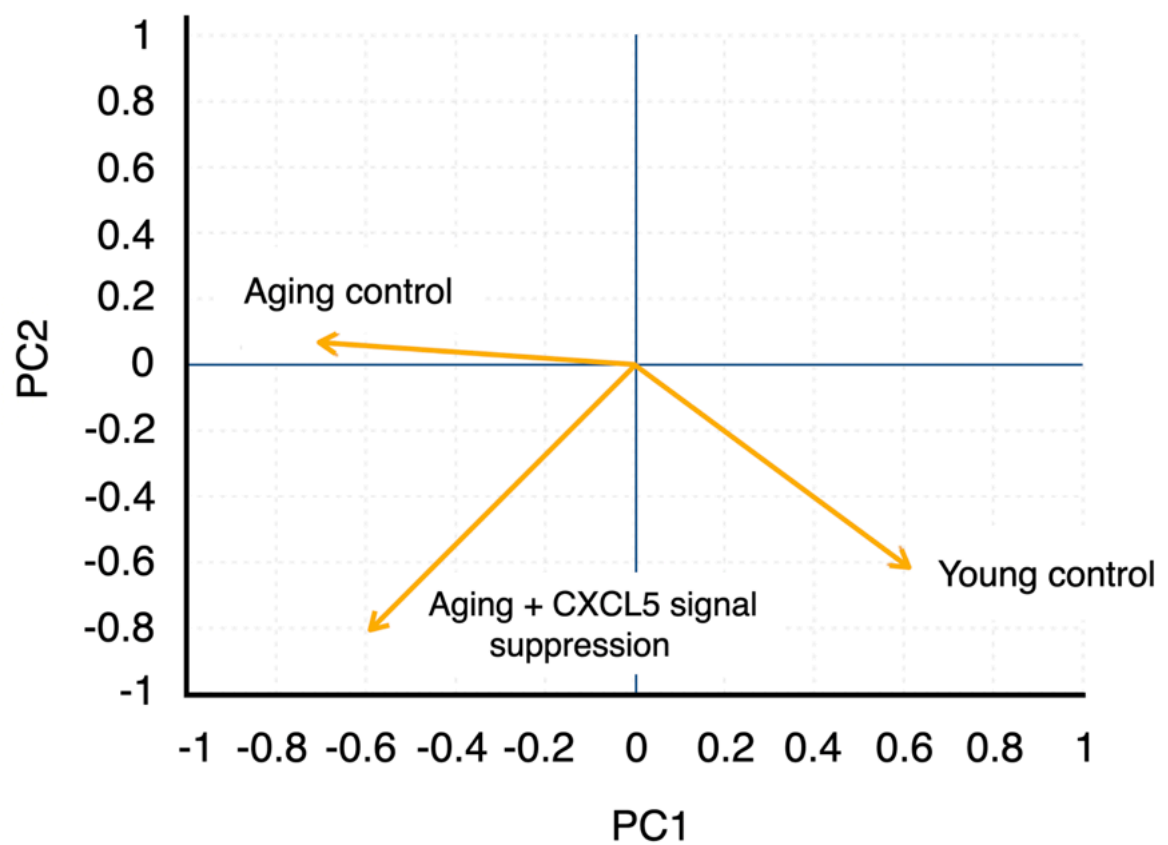


Fig.3 - 7 PCA analysis of gene expression profile between three groups.

3) CXCL5シグナル抑制による若齢マウス由来胚への悪影響の有無

CXCL5シグナルの過剰な抑制が胚の発生および妊娠に何らかの悪影響を示すか否かを評価するため、若齢マウス由来胚のCXCL5シグナルを、中和抗体およびレセプターのアンタゴニストのそれぞれを単独添加、あるいは中和抗体およびアンタゴニストの両方を混合添加した培養液で培養し、発生に対する影響を評価した。それぞれの実験群の胚の発生に対する影響を観察した結果、各群で胚盤胞到達率に差は認められなかった (Fig. 3-8)。次に、CXCL5シグナルを抑制した若齢マウス由来胚を偽妊娠マウスに移植し、着床率の影響を検討した。その結果、着床率はそれぞれ、若齢群で $84.0 \pm 6.3\%$ (49/59)、CXCL5の中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加群で $80.3 \pm 11.4\%$ (26/32)、CXCR2アンタゴニスト 10nM 添加群で $79.2 \pm 8.1\%$ (29/24)、中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ とアンタゴニスト 10nM 混合添加群で $81.0 \pm 10.6\%$ (17/21)であり、各抑制群と若齢群間で差は認められなかった (Fig. 3-9)。産仔獲得率はそれぞれ、若齢群で $65.4 \pm 5.9\%$ (39/59)、CXCL5の中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加群で $61.8 \pm 6.4\%$ (20/32)、CXCR2アンタゴニスト 10nM 添加群で $60.1 \pm 7.4\%$ (13/24)、中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ とアンタゴニスト 10nM 混合添加群で $62.2 \pm 7.8\%$ (12/21)であり、各抑制群と若齢群間で差は認められなかった (Fig. 3-10)。流産率はそれぞれ、若齢群で $22.0 \pm 8.9\%$ (10/49)、CXCL5の中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加群で $23.1 \pm 6.5\%$ (6/26)、CXCR2アンタゴニスト 10nM 添加群で $31.6 \pm 10.8\%$ (6/19)、中和抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ とアンタゴニスト 10nM 混合添加群で $29.4 \pm 12.4\%$ (5/17)であり、各抑制群と若齢群間で差は認められなかった (Fig. 3-11)。

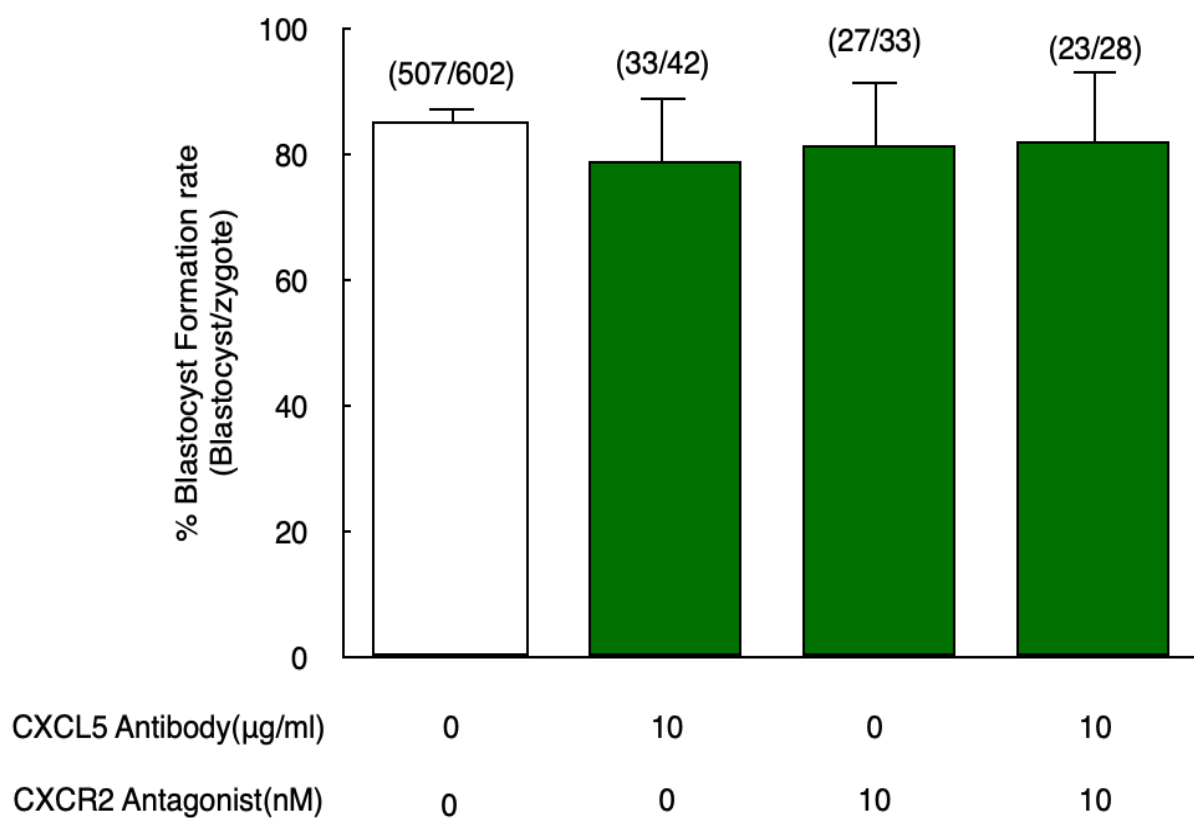


Fig. 3 - 8 Blastocyst formation rate of young embryos which was suppressed with *CXCL5* signal.

The number of embryos developed to blastocyst vs. total number of embryos are listed on the top of each column.

Data were shown as mean \pm SE. n=3-5 per group.

□ : Young, ■ : Young + *CXCL5* suppression

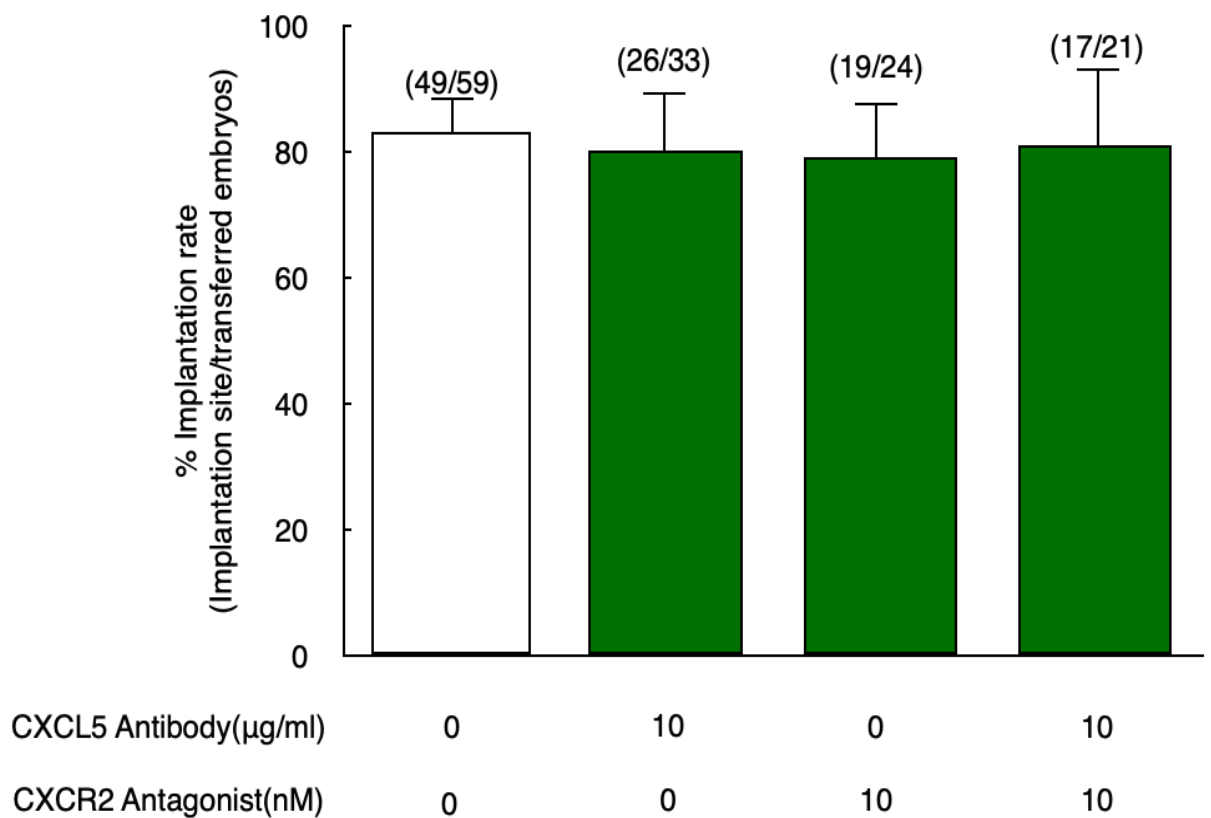


Fig. 3 - 9 Implantation rate of young embryos which was suppressed with *CXCL5* signal.

The numbers listed on top of each column indicated the number of implantation sites/total number of blastocysts transferred.

Data were shown as mean \pm SE. n=3-5 per group.

□ : Young, ■ : Young + *CXCL5* suppression

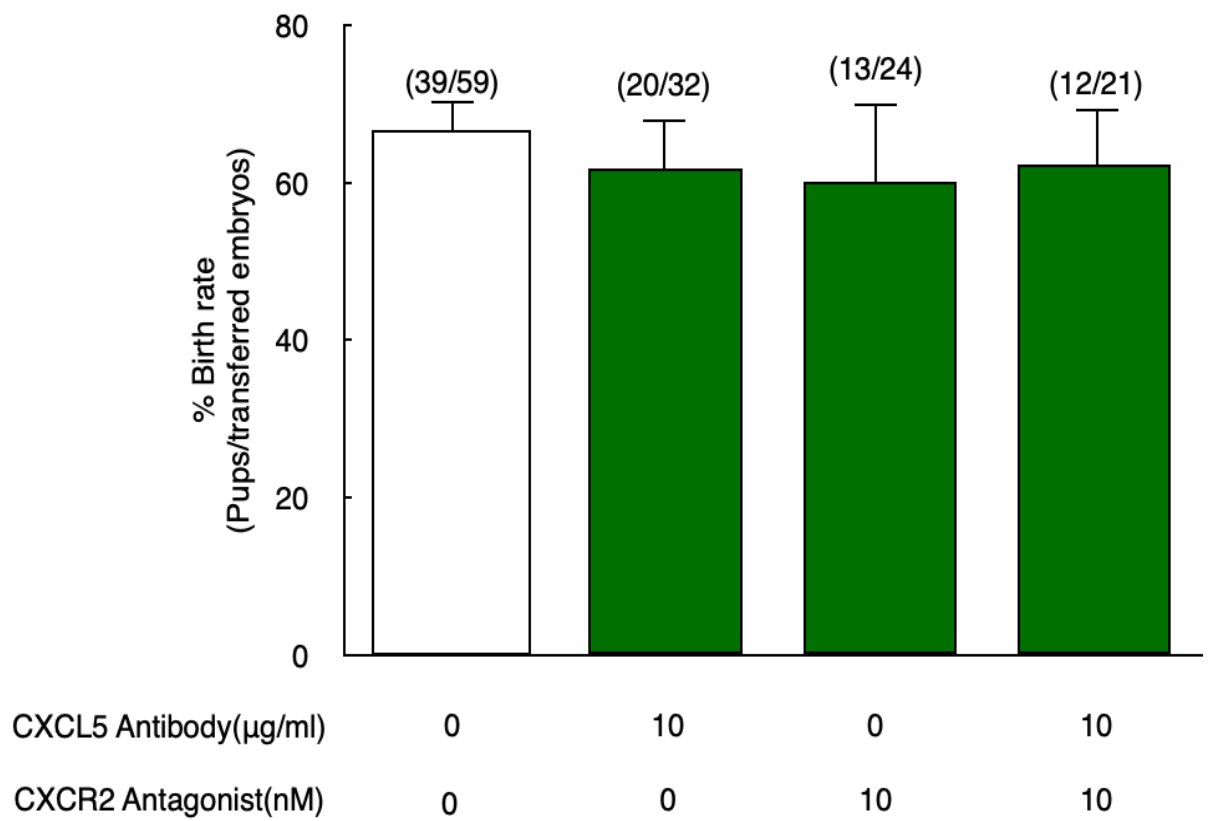


Fig. 3 - 10 Birth rate of young embryos which was suppressed with *CXCL5* signal.

□ : Young, ■ : Young + *CXCL5* suppression

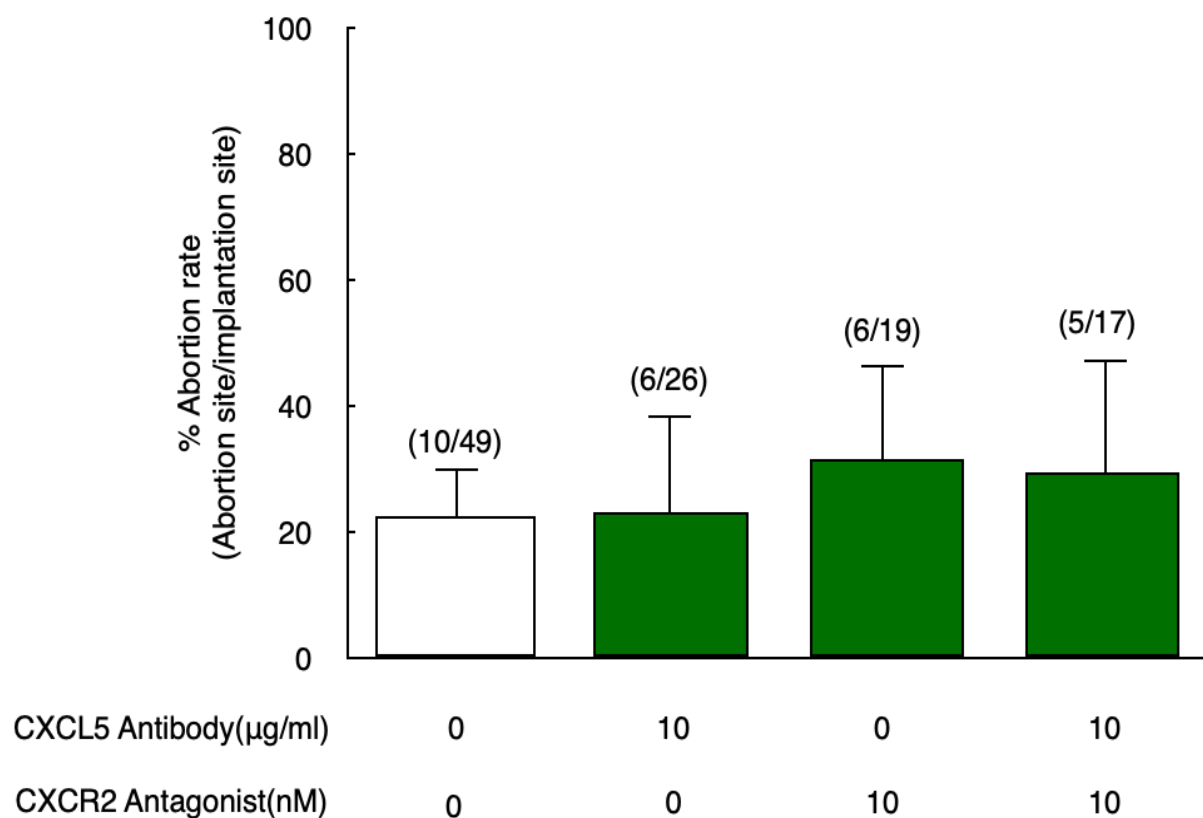


Fig. 3 - 11 Abortion rate of young embryos which was suppressed with *CXCL5* signal.

The numbers listed on top of each column indicated the number of abortion sites/total number of implantation site.

Data were shown as mean \pm SE. n=3-5 per group.

□ : Young, ■ : Young + *CXCL5* suppression

4. 考 察

本章の実験により、老化の誘導因子であるCXCL5を胚の培養期間中にCXCL5中和抗体とアンタゴニスト混合添加により抑制すると、高齢マウス個体由来胚の着床率と産仔獲得率の改善が認められた。一般的に、老化した細胞から分泌されるSASP因子が細胞の老化をさらに促進する効果があることは知られている。CXCL5はその1つであり、第III章の実験により生殖細胞の老化を引き起こすことが確認された。そこで、本章では培養中に胚から分泌されるCXCL5を中和抗体あるいはレセプターのアンタゴニストを用いて、そのシグナルを抑制して胚の質の改善を試みた。受精直後の老化胚のCXCL5シグナル抑制では、CXCL5中和抗体単独添加、CXCR2アンタゴニスト単独添加のどちらにおいても改善効果が認められた。また、中和抗体とアンタゴニストを混合添加した場合には、さらなる抑制効果が観察された。さらに、それに伴って移植胚数に対する産仔獲得率も改善したため、総産仔数は増加した。本章では、体外培養中に胚から分泌されるCXCL5を抑制するだけでも着床能の改善効果が見られた。この発見は、本研究が初めての報告である。高齢マウスの卵子でもCXCL5が高発現しているため、卵巣内ですでに老化が進んでいると考えられるが、体外培養中の短期間でCXCL5シグナルを抑制するだけで着床能が改善することは非常に興味深い現象である。これは、卵子自体の老化は着床関連遺伝子の発現に影響を及ぼさず、受精後に胚が産生するCXCL5によるオートクライン作用によって遺伝子発現が変動している可能性も考えられる。したがって、受精後の胚の発育ステージごとにCXCL5シグナルの抑制を行い、発育ステージのどの段階からCXCL5の抑制が着床能の低下を最も効率よく抑えることができるかを検討する必要がある。

本章では、老化マウス由来胚の着床率を大幅に改善することに成功した。しかし、染色体の異数性は卵子の減数分裂の段階ですでに始まっており、胚になってからの修正が困難であるため、流産率は改善できなかった可能性がある。老化した卵子では染色体分配のチェックポイントに関連するBub1, Bub3, Mad2などのタンパク質の発現が低下していることが異数性

増加の主な原因であると言われている (118, 119)。本章では、*in vivo*におけるCXCL5シグナルの抑制実験を行っていないため、卵巣内卵子のCXCL5シグナルと染色体分配チェックポイント関連遺伝子の関連性については不明である。したがって、臨床への応用と成績の向上のためには、今後さらに詳細に確認する必要がある。老化した個体由来の胚の染色体異数性の割合は、ヒトでは40歳以上の高齢不妊患者では異数性卵子が50%以上と言われているのに対して、マウスでは染色体の異数性はヒト胚ほど多くなく約20%程度であることが報告されている (105)。本章の結果では、老化マウス由来の胚に対して、CXCL5シグナルを抑制した老化胚ではおよそ2倍の着床率改善効果が認められた。本研究における老化マウスの着床率は約40%で、残りの60%が着床に失敗しているが、そのうちの約20%が染色体の異数性が原因で着床が失敗していると考えれば、他の約40%の染色体分配が正常に行われた胚に対して劇的な着床能改善効果を示したと考えられる。したがって、ヒト胚でも染色体の異数性以外で着床に失敗している老化胚に対して本法は有用な治療法になり得る。

本章のCXCL5シグナル抑制による着床能改善効果のさらなる調査のため、若齢マウス由来胚とCXCL5シグナル抑制胚の遺伝子発現プロファイルと比較し、CXCL5シグナルの抑制がどの程度遺伝子発現レベルに影響を与えるのかを評価した。若齢胚、高齢胚、CXCL5シグナルを抑制した高齢胚の3群の遺伝子発現をクラスター解析によりその類似度を求めた。その結果、CXCL5シグナルを抑制した老化胚の遺伝子発現プロファイルは、若齢胚の遺伝子発現プロファイルに類似していくことを確認した。本研究はヒト胚の遺伝子発現解析の結果から、高齢胚で最も発現量が高かったCXCL5遺伝子を候補とし、その抑制による胚の質の改善効果について研究を行った。しかし、卵子や胚の老化には様々な因子が関与しており、胚の老化を誘導する胚由来の分泌因子はCXCL5以外にもあると考えられるため、CXCL5単独の抑制では高齢マウス由来胚の遺伝子発現プロファイルを若齢マウス胚のものに一致させることは不可能である。しかし、1つの遺伝子の抑制だけで、高齢マウス由来胚の遺伝子発現プロファイルがあ

る程度若齢マウス由来胚のものに類似していくという報告はこれまでにない新たな発見である。今後はヒト胚のマイクロアレイ解析を行い、*CXCL5*以外に胚の老化に関係していると考えられる遺伝子を探索し、*CXCL5*遺伝子と共に制御することで更なる老化の抑制効果が見込まれると考えられる。

本章の*CXCL5*シグナル抑制による胚の質の改善は、将来的にはヒトへの臨床応用を念頭において研究しているため、抑制した胚になんらかの異常がでるような方法ではヒトには応用できない。そこで、本法の安全性を確認するため、*CXCL5*シグナル抑制胚由来の産仔や胎盤を形態学的に観察したところ、外見的に特に異常は見られなかった。それぞれの重量は、*CXCL5*シグナル抑制胚由来の産仔が高齢胚由来の産仔より重量は小さかった。これは、着床数が増加したためそれぞれの胎仔に行き渡る栄養分が分散された結果、重量が減少したと考えられる。同様に若齢マウス胚由来の産仔の重量も軽いため、特に異常はないと推察される。さらに、将来的な臨床応用を見据えて、*CXCL5*の過剰な抑制が胚発生および妊娠に対して悪影響があるか否かを、若齢マウス由来胚の*CXCL5*シグナルを抑制することで評価した。その結果、若齢マウス由来胚の*CXCL5*シグナルを抑制しても特に影響は認められなかった。また、Meiら(120)が作出した*CXCL5*のノックアウトマウスの表現系を見ると、胎仔期や産後直ぐの時期には特に異常はみられないことが報告されている。したがって、胚の*CXCL5*シグナルを抑制する本方法をヒトに応用しても、後代に悪影響を及ぼす可能性は低いことが示唆される。ただし、組織学的検討や出産後の発育および生殖毒性試験が今後必要と思われる。

以上の結果から、老化した胚の*CXCL5*シグナルを抑制する本方法は、不妊患者の高齢化という問題に対する革新的な治療法を提供できる可能性が示唆された。

第V章 新規老化バイオマーカーとしてのCXCL5の有用性

1. 緒 言

細胞の老化は様々な要因が複合的に作用して進む。近年は、医療技術の発達に伴いヒトの寿命が延長し、100年社会とまで言われるようにますます高齢化社会が進んでおり、老化に伴う疾患の予防と健康寿命の延長は大きな課題となっている。生殖医療の分野でも患者の高齢化は顕著であり、晩婚化傾向に伴って高齢が原因の不妊症患者数が増加している。高齢不妊患者では、老化に伴って生殖細胞の質が低下し妊娠することが困難になる。特に、母体の老化は胚の質を顕著に低下させることが報告されている。精子の場合、出生後も精子幹細胞から精子が複製されるため、老化による影響が出にくい。しかし、卵子は出生後は増殖することはないと考えられており、老化によるさまざまなストレスを蓄積していると考えられる。したがって、老化に伴う卵子や胚の質の低下を改善する治療法の確立が今後の生殖医療では必須である。

第IV章の実験により、細胞の老化を促進するCXCL5シグナルをマウス胚の培養中で抑制すると、高齢個体由来胚の着床率と産仔獲得率を改善できた。個体差が少ないICRマウスのような近交系の実験動物では比較的効果的に胚の質の改善効果が見られた。しかし、個体差が大きいヒトでは、CXCL5の発現量は患者により差が大きく、若齢患者であっても年齢の割にCXCL5が高発現し老化が進行している可能性も考えられる。また、同一患者から体外受精によって獲得した胚でも、形態学的には同程度の胚でも臨床成績に差が出ることを考慮すると、卵子自体の老化の程度にも差が出ている可能性もある。このように、CXCL5シグナル抑制による胚の質の改善に加えて、より妊娠しやすい胚を選択することも、高齢不妊患者のような時間的に限られた中で妊娠を目指すケースでは重要である。しかし、現状ではそれぞれの卵子自体の老化の程度を反映するバイオマーカーは存在せず、新たに検出感度が高い老化バイ

オマーカーを見出す必要がある。現在、老化マーカーとして用いられている遺伝子には代表的なものに*P16*や*P21*、*P53*などがあり、老化と相関して発現が上昇することが報告されている(11,26,32,121)。本研究でも、それらの老化マーカーを用いてCXCL5を添加した胚の老化の程度の測定を試み、老化の促進に伴って発現が増加することを確認した。特に、*P16*は若齢の細胞ではほとんど発現せず、老化細胞で急激に発現が上昇することから非常に有用な老化バイオマーカーとして利用されている(32)。しかし、これらの遺伝子は細胞内部で発現するため、人体に用いる際には侵襲的な細胞採取が必要である。また、ヒトの卵子や胚自体をサンプルに用いることは倫理上不可能であるため、卵子・胚の老化バイオマーカーとはなり得ない。最近では、細胞外小胞体であるエクソソームが内包するmiRNAやDNA断片などが老化に伴い変化することが報告されており、その発現量の違いにより老化の程度を測定できる可能性も報告されている(122,123)。本研究で見出したCXCL5は分泌因子であるため、血清中や細胞外に存在している(97)。したがって、検出が非常に容易であり、CXCL5の発現量と老化の程度の相関関係が判明すれば、非常に有用な新規のバイオマーカーとなり得る。

そこで本章では、CXCL5が新規老化バイオマーカーとして有用か否かを評価する目的で、マウスの各臓器の細胞と血清中のCXCL5の量をそれぞれ測定し、老化と発現量の関係を検討した。また、卵胞構成細胞を卵巣から単離し、それぞれの細胞のmRNAレベルの発現量の変化を測定した。さらに、若齢マウスおよび高齢マウスの卵巣を採取し、CXCL5の免疫染色を行い、タンパク質レベルの発現変化も検討した。次に、ヒトの卵巣でもCXCL5の発現がみられるとの報告(124)があることから、CXCL5と老化の程度の相関関係を、ヒトの卵丘細胞を採取しCXCL5の発現量を測定して評価した。

2. 実験材料および実験方法

1) 供試動物および供試試料

第Ⅲ章と同様の実験動物を用いた。*CXCL5*シグナルを測定する試料として、若齢マウス (3～6週齢)および高齢マウス (43～53週齢)の各臓器 (肺、腎臓、肝臓、脾臓、子宮、卵管、卵巢)の一部を採取した。血中の*CXCL5*の発現量を測定するため、それぞれのグループのマウスから心臓採血により血液を採取した。血液は4℃で30分放置後、3,000rpmで20分間遠心分離し、血清のみを回収した。さらに卵胞構成細胞の*CXCL5*の発現量を測定するため、卵丘細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞をそれぞれ卵巢から単離した。顆粒膜細胞と莢膜細胞はそれぞれ、卵巢から27Gの針を用いて卵胞を単離した後、卵胞を押しつぶすことによって卵胞外に排出した細胞を顆粒膜細胞、それ以外を莢膜細胞として使用した。

ヒトの卵巢内の*CXCL5*発現の検討のため、聖マリアンナ医科大学の倫理委員会の承認 (承認番号 No.3055)と患者の同意のもと、採卵時に単離した卵丘細胞をサンプルとして使用した。ヒトの卵丘細胞は、採卵時に卵子卵丘細胞複合体 (Cumulus-Oocyte complex: COCs)の一部を27Gの針で剥離して採取した。採取したサンプルはRNA抽出用のLysis buffer (QIAGEN)が入った1.5mlのエッペンドルフチューブ中に入れ、-80℃で保管した。また、各COCsから採取した卵丘細胞の*CXCL5*の発現量は、卵子の成熟率や受精率および各胚の形態学的評価の相関を検討した。なお、ヒトの初期胚の質の評価法は、Veeck分類 (81)に従って胚の形態学的な評価を行なった。

2) 各試料からのmRNA抽出とcDNA合成

第Ⅱ章と同様の方法でmRNA抽出とcDNAの合成を行った。

3) Quantitative Realtime RT-PCRを用いた*CXCL5*と*CXCR2*の発現量の測定

第Ⅱ章と同様の方法で測定した。各臓器における発現は若齢群、高齢群間の発現を比較した。使用したプライマーの塩基配列はTable 1-2に示した。

4) ELISAを用いた血清中CXCL5の発現量の測定

血清中のCXCL5の発現量はQuantikine ELISA Mouse Lix immunoassay kit (R&D systems)を用いて測定した。-80°Cに保存していた各血清サンプルを融解し、上述したimmunoassay kitのプレートにアプライし、プレートリーダー (BioRad)で吸光度 (A450nm)を測定した。測定方法はキットのプロトコルに従った。測定後、若齢マウス由来血清、高齢マウス由来血清それぞれの値の比較を行った。

5) 卵巣組織切片の作製とCXCL5の免疫染色

卵巣内でのCXCL5の発現変化をタンパク質レベルで評価するため、若齢マウスおよび高齢マウスの卵巣を採取し組織切片を作製した。若齢マウスおよび高齢マウスをそれぞれ頸椎脱臼により屠殺し卵巣を採取した。採取した卵巣は4%パラホルムアルデヒドで24時間固定した。固定後、70%、80%、95%の各エタノールにそれぞれ1時間浸漬し、その後100%エタノールに1時間の浸漬を3回繰り返し、徐々に脱水した。次に、キシレンに1時間の浸漬を3回繰り返し脱脂した。その後、パラフィンに1時間ずつ3回浸漬した。最後にパラフィンに包埋し、ミクロトームにより厚さ6 μ mの連続切片を作製した。

連続切片はCXCL5抗体 (abcam, Anti-Lix1 rabbit antibody: ab235524)を4°Cで16時間反応させた後、検出キット(Life Technologies, Histostain-Plus IHC Kit HRP BROADSPECTRUM)を使用し、CXCL5の検出を行った。染色後、生物顕微鏡下で組織切片を観察し、卵巣中のCXCL5のタンパク質レベルの局在と発現変化を評価した。

3. 結 果

各臓器のCXCL5の発現量を測定した結果、若齢マウスの発現量を1とした場合、高齢マウ

スのCXCL5の発現量は、肺で3.0倍、肝臓で5.0倍、脾臓で2.4倍、卵巣で5.5倍と有意 ($P<0.01$) に高い値を示した。しかし、卵管では1.1倍、子宮では0.61倍と、発現量の増加は認められなかった (Fig. 4-1)。次に、血清中のCXCL5の発現量を測定したところ、高齢マウスでは 403.9 ± 27.5 pg/mlで、若齢マウスの 242.8 ± 11.5 pg/mlと比較して約1.7倍有意 ($P<0.01$) に高い発現量を示した (Fig. 4-2)。

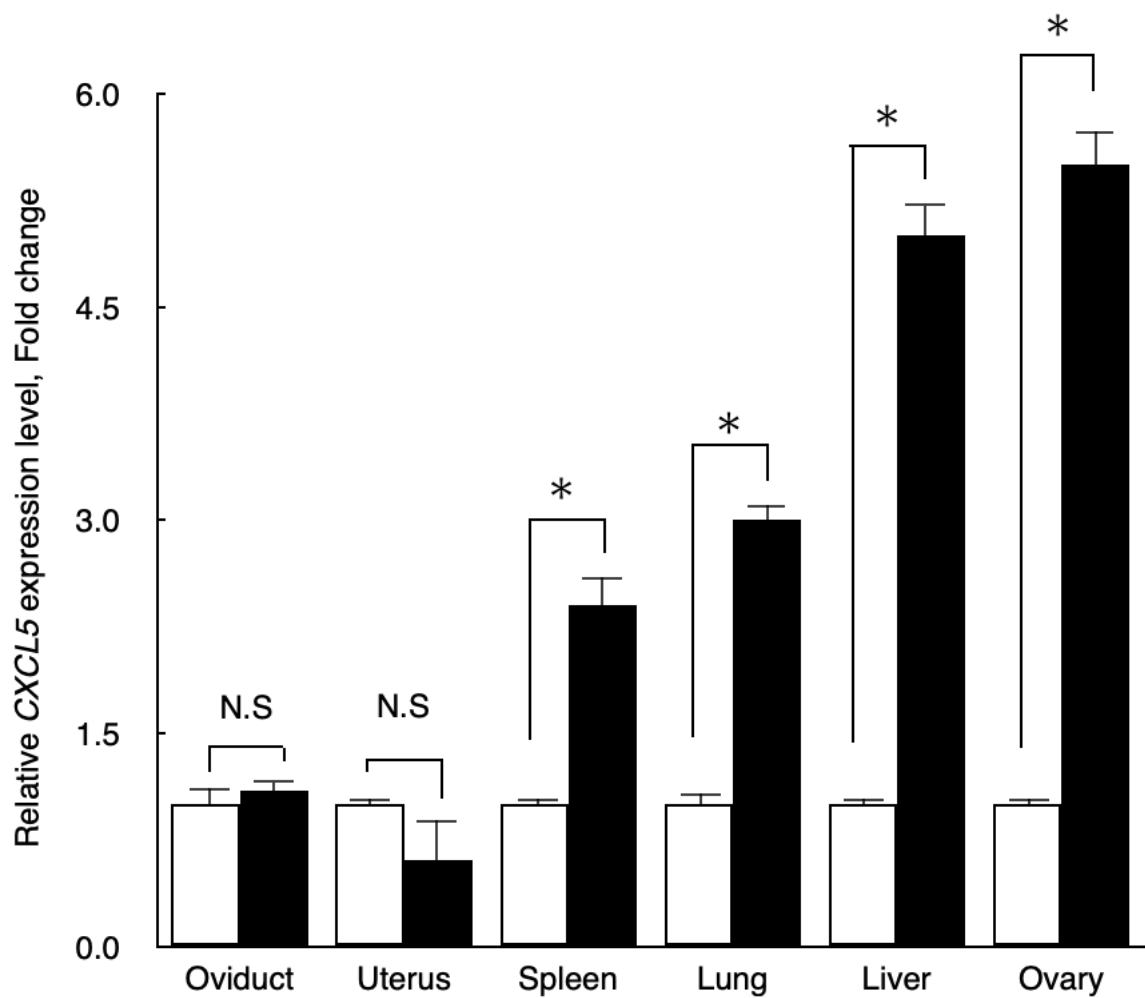


Fig. 4 - 1 Expression levels of *CXCL5* in various tissue of mouse.

Statistical significance is indicated at * $P < 0.01$.

N.S indicate no significant different.

All data were shown as mean \pm SE, $n=3$ per group.

□ : Young, ■ : Aging

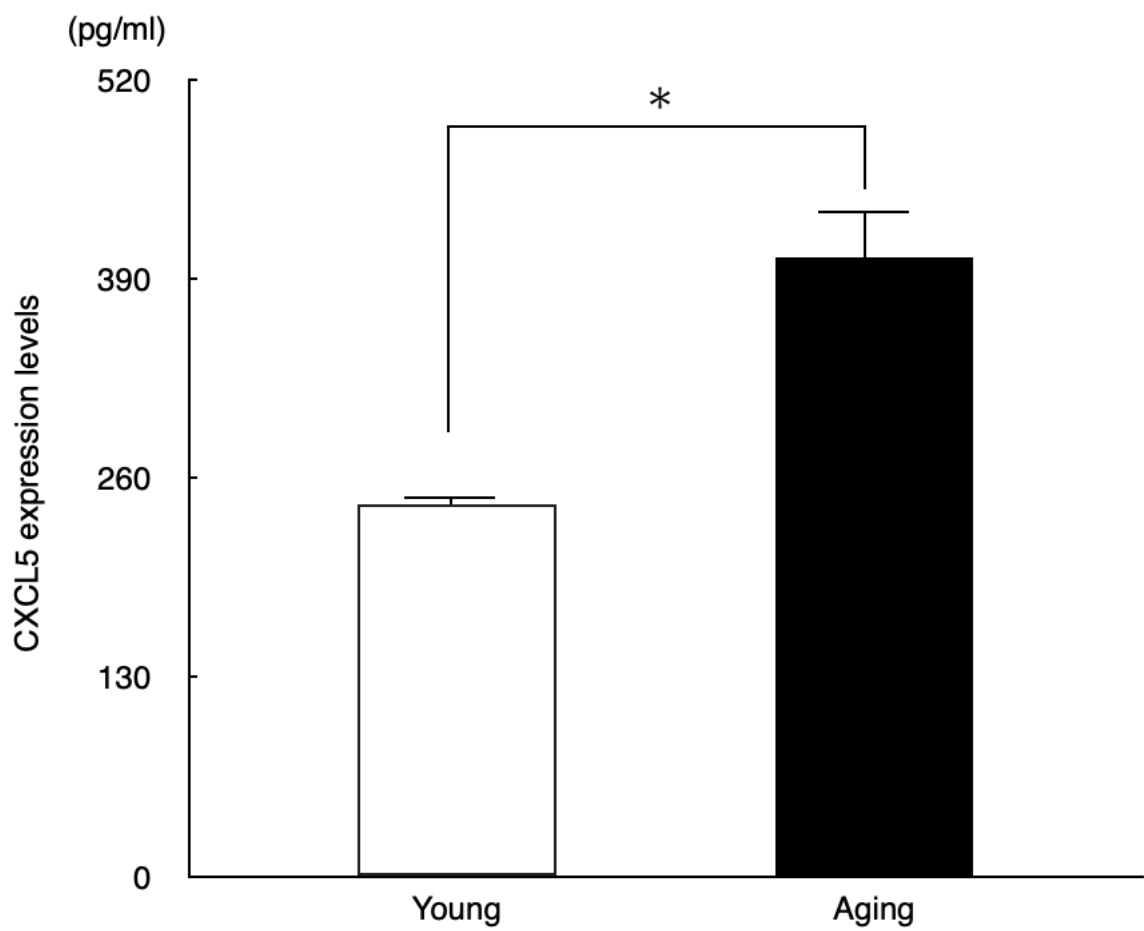


Fig. 4 - 2 Expression levels of CXCL5 in mouse serum sample.

Statistical significance is indicated at * $P < 0.01$.

All data were shown as mean \pm SE, $n=3$ per group.

□ : Young, ■ : Aging

卵胞構成細胞である卵丘細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞における*CXCL5*の発現量は、若齢マウスの発現量を1とした場合、高齢マウスでは卵丘細胞で2.7倍、顆粒膜細胞で1.6倍、莢膜細胞で1.9倍で、全ての細胞で有意 ($P<0.01$)に高い値を示した (Fig.4-3)。また、レセプターである*CXCR2*の発現量は卵丘細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞いずれにおいても2群間で差は見られなかった (Fig. 4-4)。それぞれの群の卵巣を組織切片にして*CXCL5*の免疫染色を行なったところ、卵巣内の黄体細胞をはじめとする各構成細胞で老化により*CXCL5*が強発現していることが確認された (Fig. 4-5)。

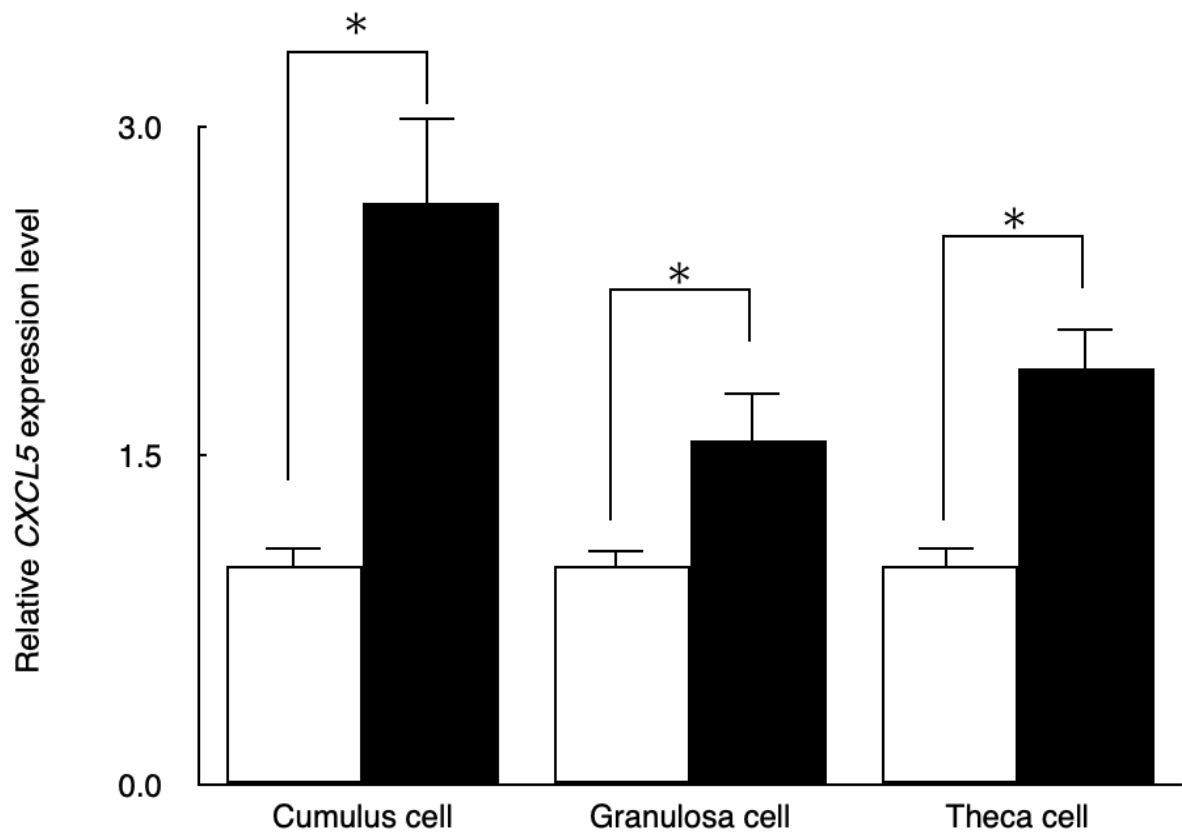


Fig.4 - 3 Expression levels of *CXCL5* in mouse Follicle cells.

Statistical significance is indicated at * $P < 0.01$

All data were shown as mean \pm SE, $n=3$ per group.

□ : Young, ■ : Aging

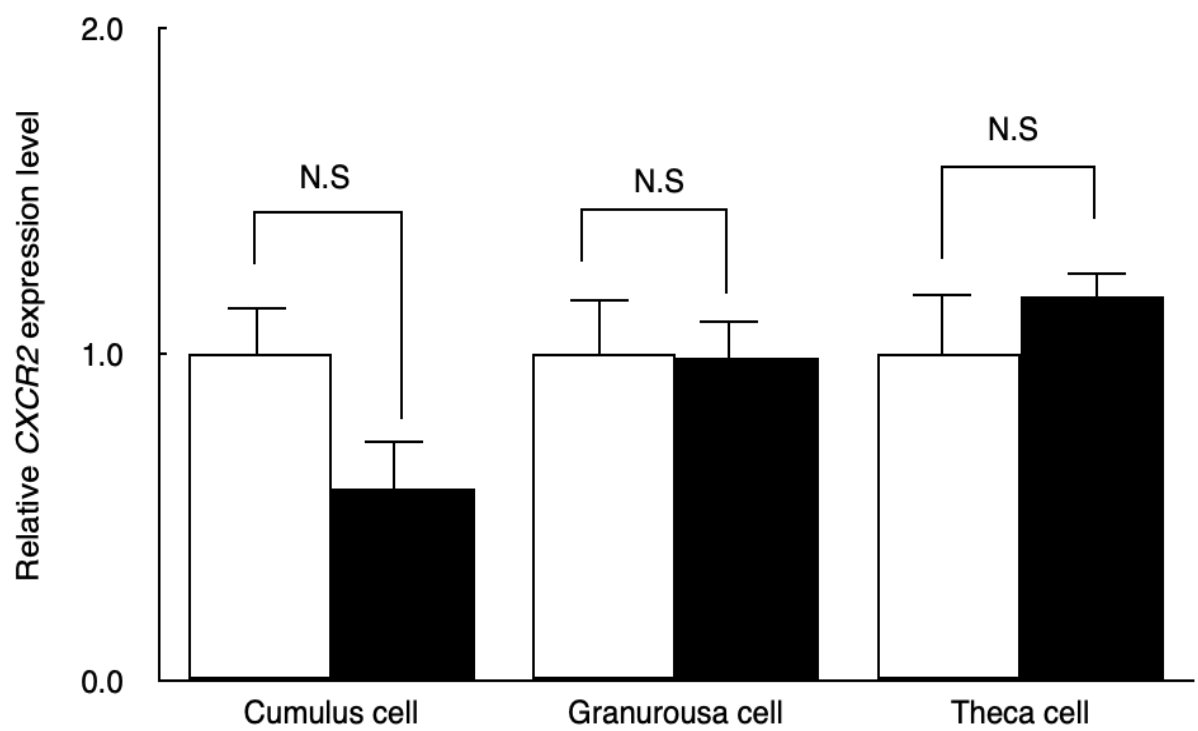
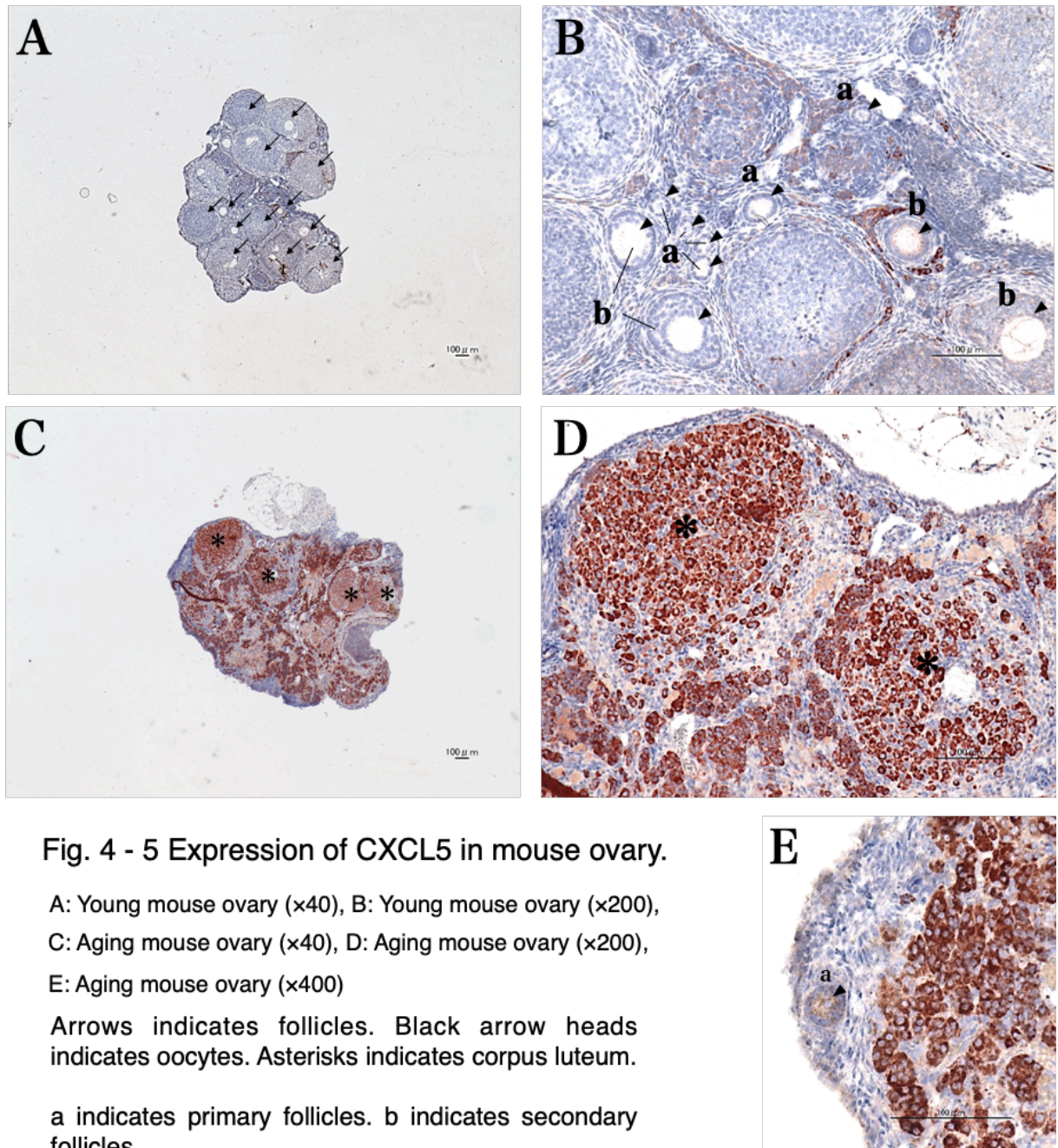


Fig. 4 - 4 Expression levels of *CXCR2* in mouse follicle cells.

N.S indicate no significant different.

All data were shown as mean \pm SE, n=3 per group.

□ : Young, ■ : Aging



次に、28～42歳のヒトの卵丘細胞をそれぞれのCOCsごとに採取し、各年齢における発現量を測定した。その結果、老化に伴って*CXCL5*の発現量が増加することを確認した (Fig. 4-6)。なお、相関係数は $R=0.8112$ であり正の相関が認められた。また、個々の卵丘細胞における*CXCL5*の発現量を個別に測定し、受精率や卵子成熟率、胚の形態学的評価との相関を解析した。その結果、*CXCL5*の発現量とそれらの間には相関関係は認められなかった (Table 3-1, 3-2)。

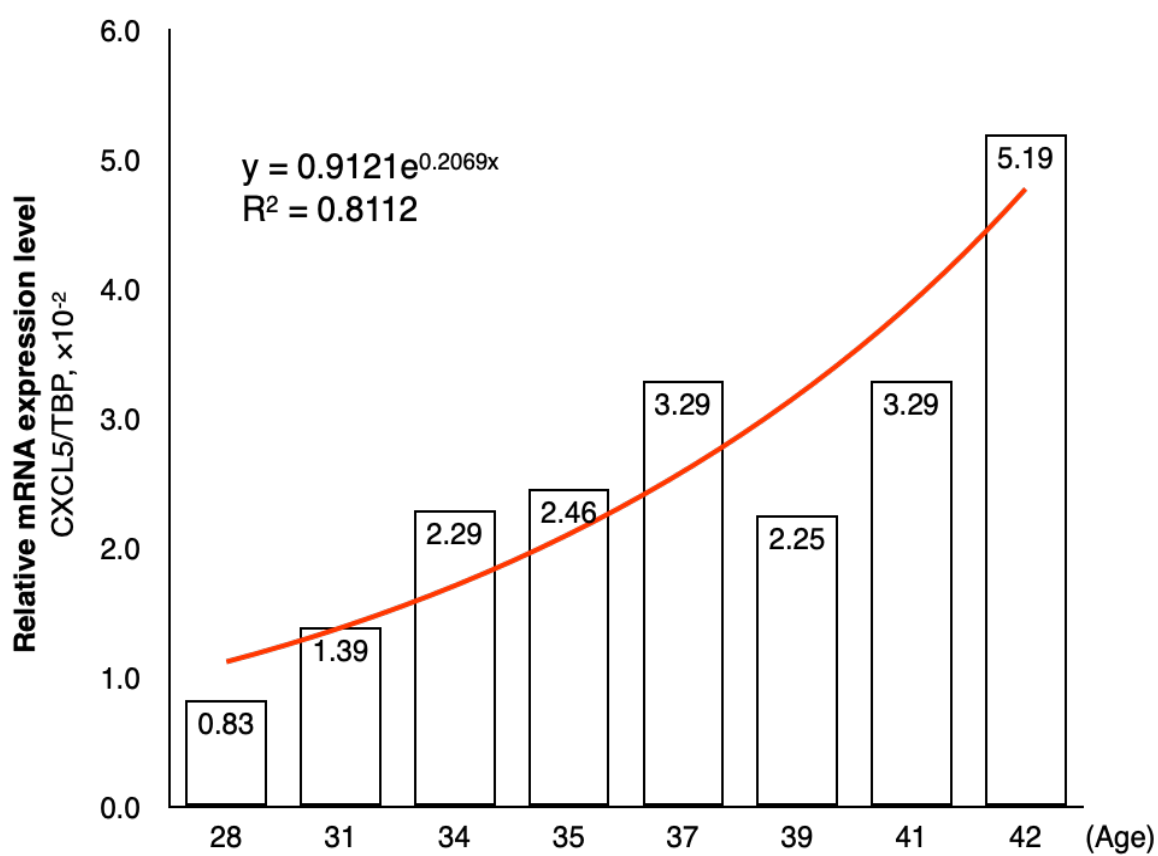


Fig.4 - 6 Expression level of *CXCL5* in human Cumulus cells.

Table 3 - 1 Comparison of expression levels of *CXCL5* and grade of each embryos

Patient No.	Age	Sample No.	<i>CXCL5</i> Expression level(<i>CXCL5/TBP</i>)	Day of Observation	Grade	Number of blastomere
1	28	1	0.001	2	3	3
		2	0.022	2	4	4
		3	0.008	2	4	6
2	31	1	0.01	2	3	4
		2	0.006	3	4	8
		3	0.015	2	3	3
		4	0.002	2	4	4
		5	0.003	2	3	3
3	34	1	0.005	3	4	7
		2	0.005	3	4	8
		3	0.002	3	4	9
		4	0.018	2	4	2
4	34	1	0.055	3	4	10
		2	0.026	3	3	8
		3	0.074	3	2	8
		4	0.039	3	3	7
5	34	1	0.023	2	4	2
		2	0.038	2	3	3
6	35	1	0.004	2	2	4
7	35	1	0.075	3	3	8
		2	0.016	3	3	8
8	37	1	0.02	3	4	8
9	37	2	0.027	3	4	8
		3	0.183	3	3	8
		4	0.02	3	4	6
		5	0.065	3	5	-
		6	0.003	3	1	8
		7	0.017	3	4	6
10	37	1	0.005	2	3	4
		2	0.003	2	1	4
12	39	1	0.005	2	3	4
13	39	1	0.005	2	3	4
14	39	1	0.002	2	2	4
		2	0.016	2	2	4
		3	0.004	2	3	4
		4	0.01	2	2	8
		5	0.027	2	3	4
		6	0.004	2	3	6

Table 3 - 2 Comparison of expression levels of *CXCL5* and grade of each embryos

Patient No.	Age	Sample No.	<i>CXCL5</i> Expression level(<i>CXCL5/TBP</i>)	Day of Observation	Grade	Number of blastomere
15	39	1	0.085	2	3	4
		2	0.066	2	3	2
		3	0.062	2	3	4
		4	0.016	2	3	4
16	41	1	0.005	2	3	7
		2	0.034	2	3	4
		3	0.012	2	4	3
17	41	1	0.003	2	3	4
		2	0.006	2	4	5
		3	0.006	2	3	5
		4	0.014	2	3	4
18	41	1	0.011	3	3	8
		2	0.015	3	2	8
		3	0.041	3	3	6
		1	0.044	3	3	6
		2	0.005	3	2	8
20	41	1	0.035	3	2	8
21	41	1	0.313	2	4	4
		2	0.098	2	4	4
22	42	1	0.0004	2	3	4
23	42	1	0.0015	2	2	7
24	42	1	0.001	2	3	4
		2	0.996	2	1	4
		3	0.84	2	1	4

4. 考 察

本章の実験により、*CXCL5*が老化したマウスの各臓器および血中で発現が上昇していることを確認した。特に脾臓、肺、肝臓、卵巢では若齢マウスに比べて高齢マウスは非常に高い値を示した。したがって、老化により全身の細胞で*CXCL5*の発現が増加することが示唆された。しかし、試料に用いた週齢の高齢マウスの卵管と子宮では*CXCL5*の有意な増加は認められなかった。一般的に、ドナー卵子を用いたヒトの体外受精では、ドナーの年齢が若ければ胚移植を受ける母体側の年齢がある程度高くても妊娠率は低下しない (125, 126)。これは、卵管・子宮は卵巢など他の臓器に比較して老化の進行が遅く、その結果、若齢患者の卵子のように妊娠性が高い卵子を使用した場合に、卵管・子宮からの*CXCL5*の分泌が少ないため、胚の老化の促進の程度が低いことにより妊娠率が維持されると推察される。若齢患者のドナー卵子を使用して体外受精-胚移植をしても、45歳以上の高齢患者では妊娠率の低下と流産率の増加が見られることが報告されている (127)。したがって、卵管や子宮は老化の進行速度が遅いため、本章の実験結果のように臓器間で差があることを考慮すると、*CXCL5*の発現量によってどの程度老化が進行しているかが推測可能と推察される。

また、マウス血清中の*CXCL5*の発現量を測定したところ、高齢マウスで有意に高い発現量が認められた。ヒトの血中でも*CXCL5*の発現量を測定し、血中の発現量と老化に相関関係があれば、最低限の侵襲性のみで検体採取できて非常に簡便であることから、*CXCL5*が卵巢を含む臓器の老化の新規バイオマーカーとして利用できる可能性がある。

本章では高齢マウスの血液は採取量の問題もあり、それぞれの個体別に測定することはできなかった。マウスより個体差が大きいヒトでは、個々の発現量が大きく異なることが予想され、老化の程度をどの程度反映しているかを判定するため、今後のさらなる解析が必要である。

本章の測定結果では、*CXCL5*の発現量の差は卵巢で最も大きかった。卵巢が特に早く老化

が進み発現量が大きく上昇したためと推察される。そこで、卵巣内のどの細胞で発現が変動しているかを検討するため、マウスの卵巣から卵胞構成細胞を単離して、それぞれの*CXCL5*およびそのレセプターである*CXCR2*の発現量を測定した。その結果、*CXCL5*は卵丘細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞の全てで有意な発現の上昇が認められたが、*CXCR2*は発現に差は認められなかった。他の細胞では老化に伴って*CXCR2*の発現が上昇することは報告されている (40, 128)が、本研究で用いた週齢のマウスの卵胞構成細胞では発現の上昇は認められなかった。これは、本研究で43～53週のマウスを高年齢マウスとして使用しているが、生殖年齢においては高年齢であるが、個体レベルでは*CXCR2*の発現が上昇するほどの高年齢ではなかった可能性が考えられる。また、免疫染色の結果から、タンパク質レベルでもそれぞれの細胞で発現が増加していることが確認され、間質細胞でも発現の増加が認められた。したがって、老化した卵巣全体で*CXCL5*の発現量が増加するため、常に卵子が*CXCL5*に暴露されて、それが老化に伴う卵子の質の低下の原因になることが推察される。

卵巣内の細胞では特に、卵丘細胞の*CXCL5*の発現量に大きな増加が認められた。卵丘細胞は卵子と複合体を形成して排卵されるため、それぞれの卵子と複合体を形成している卵丘細胞を採取し区別することは容易である。したがって、卵丘細胞の*CXCL5*の発現量が卵子の質を反映していれば、個々の卵子の老化の程度を診断できる新規バイオマーカーとして利用できると考えられる。しかし、マウスでは個々のCOCから得られる卵丘細胞の数が十分ではなく測定が困難であり、1個体から採取された全てのCOCsの卵丘細胞を1つの試料として使用したため、卵子個々の質を反映しているか否かは不明であった。そこで、臨床試験の同意が得られた患者の採卵時にそれぞれのCOCsから卵丘細胞を一部採取し、個別に*CXCL5*の発現量を測定して、年齢、胚の質、*CXCL5*の発現量それぞれに相関があるか否かを検討した。その結果、ヒトでも卵丘細胞で老化によって*CXCL5*の発現増加が認められた。しかし、本研究の結果では、39歳の患者で発現量は低下していた。これは、本実験を実施した期間内に対象とした

39歳の患者では年齢の割にCXCL5の発現量が低かった可能性があり、今後さらにサンプル数を増やして大規模な解析を行う必要がある。また、それぞれのCOCsから採取した卵丘細胞ごとの発現量は個々の細胞で大きな差が見られた。したがって、同一患者でも、卵子によって老化の程度が異なる可能性が示唆される。個々の卵丘細胞のCXCL5の発現量と、受精後の胚のグレードに関して、本章の解析では相関関係は認められなかった。CXCL5を見出したマイクロアレイ解析に使用した検体が、若齢患者、高齢患者の両群で形態学的には同等なものを使用して解析した結果抽出された遺伝子であるため、形態学的なグレードは発現量に反映されない可能性も考えられる。また、本研究の期間中に対象とした患者が胚移植を行わなかったため、卵丘細胞のCXCL5の発現量と妊娠率との相関関係については不明である。今後のさらなる解析が必要である。

以上のように、CXCL5シグナルは老化に伴ってマウスの各種細胞で発現が上昇し、なおかつ血中でもそのタンパク質濃度は亢進した。今後、検体数を増やしてCXCL5の発現量と老化の程度の相関関係を解明することで、新規バイオマーカーとして利用できる可能性がある。また、ヒトの卵胞構成細胞でもマウスと同様に発現の上昇が認められたが、本章ではヒト卵胞液中のCXCL5の発現量はELISAの測定感度の問題があり測定していない。卵胞構成細胞で発現が上昇していることを考えると、CXCL5が卵胞液中に分泌され、老化に伴って発現量が増加している可能性も十分考えられる。もし、卵胞液中のCXCL5の発現量の測定が可能であれば、非常に簡便に測定することが可能なためCXCL5はバイオマーカーとして有用である。

本章で解明したように、CXCL5は卵巣内で発現が上昇していたが、そのほかの組織でも発現の有意な上昇が見られた。したがって、特定の臓器・細胞だけでなく、将来的には様々な臓器の老化の程度、個体の老化の程度を示すバイオマーカーとしても利用できる可能性が示唆された。

第VI章 総合考察

本研究により、老化に伴う卵子・胚の質低下を促進する遺伝子として*CXCL5*を見出し、高齢マウス胚でそのシグナルを抑制することにより、着床率および産仔獲得数が改善することを見出した。一般的に、老化した細胞は炎症性サイトカインであるSASP因子を放出し、それがオートクライン・パラクライン作用により、自らおよび周囲の細胞の老化を促進すると考えられている (35,40,129)。特に、*CXCR2*を介して伝達されるSASP因子の炎症シグナルにより、細胞の更なる老化が促進することが体細胞株を用いた研究により明らかにされており(40)、本研究でもそのような炎症性の分泌因子に着目し老化の候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果、高齢患者の胚盤胞では炎症性の分泌因子である*CXCL5*が7.7倍高発現していることを確認した。*CXCL5*はSASP因子の1種で、*CXCR2*を介してシグナルを伝達するサイトカインであり、*CXCR2*を介した細胞内シグナルが細胞老化を促進するというAcostaら (40)の報告と本研究の結果は合致する。したがって、卵子や胚などの生殖細胞でも*CXCL5*-*CXCR2*シグナルの活性化により老化が引き起こされていることが推察された。これらのヒトの胚を用いた遺伝子発現解析から推察された結果を動物実験を用いて証明するため、マウスの卵子・胚でその発現量を定量したところ、マウスでも*CXCL5*の発現量が老化に伴い増加していた。そこで、培養条件下で若齢マウス胚に*CXCL5*のペプチドを作用させ、*CXCR2*を介したシグナルを活性化すると、*P21*、*P53*、*PAI-1*、*IL-6*の4つの老化マーカーの増加と妊娠率の低下が見られた。本研究において、一般的に老化のマーカーと考えられている*P16*の発現量が増加しない原因については不明であるが、*P16*以外の細胞老化のマーカーとして報告されている*P53*-*P21*シグナル経路 (101, 130)の活性化および、*P53*の下流のターゲット遺伝子として老化細胞で発現量が上昇することが確認されている*PAI-1* (121)の発現が増加しているため、*CXCL5*ペプチドの添加によるシグナル活性化によって胚の老化が引き起こされることが示唆された。また、43-53週齢の高齢マ

ウス胚において、培養中に*CXCL5*シグナルを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用いて抑制したところ、着床率の改善と移植胚数あたりの産仔獲得率の増加が認められた。したがって、*CXCL5*は生殖細胞の老化の一因であり、胚培養中の*CXCL5*シグナル抑制により、高齢不妊患者の治療成績を改善できる革新的な治療法の開発につながる可能性が示唆された。

本研究で見出した老化誘導因子である*CXCL5*により、生殖細胞でもSASP因子の作用により他の細胞と同様に老化が進むことを著者は初めて確認した。また、他の細胞や組織における*CXCL5*の発現量を測定したところ、卵子・胚と同様に老化に伴う発現上昇が認められた。特に肺、腎臓、肝臓、脾臓、卵巣では発現量が有意に増加した。さらに、血液中の*CXCL5*のタンパク質レベルの上昇も確認されたため、細胞種を選ばず、老化により発現量が亢進し老化を促進していることが考えられる。しかし、*CXCL5*シグナルの抑制による細胞の老化抑制効果についての報告は見られない。これまでに、ラパマイシンやレスベラトロールの摂取によりSASP因子の分泌を抑制すると、細胞老化が抑制されるという報告は見られる (131, 132)。しかし、本研究における高齢患者胚の遺伝子発現プロファイルでは、*CXCL5*の発現は上昇していたが、そのほかの炎症性分泌因子の発現は*CXCL5*ほど高発現ではなかった。

ヒトは40歳前後で卵巣機能が低下し、およそ50歳で閉経 (Menopause)を迎える。したがって、卵巣はほかの臓器に比べて非常に早い段階でその機能が低下することから、卵巣が体内の臓器の中で最も早く老化する臓器の1つとも考えられる。その構成細胞である卵丘細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞でも*CXCL5*の発現量増加が見られ、ほかの炎症関連因子の発現は*CXCL5*ほど高い発現ではなかったことを考えると、SASP因子の中でも特に*CXCL5*は老化の初期段階に関わっている可能性が考えられ、非常に重要な因子であることが示唆された。一方、卵管や子宮の*CXCL5*の発現量は本研究で使用したマウスの週齢では有意な発現上昇は見られなかった。したがって、受精後の胚は主に自ら産生する*CXCL5*のオートクライン作用によって質の

低下を引き起こし、着床率の低下につながっていることが推察された。本研究では、胚の体外培養中に分泌されるCXCL5を抑制するだけでも着床能の改善効果が見られた。老化マウスの卵巣内では、卵子が高濃度のCXCL5に晒されておりすでに老化が進んでいると考えられるが、体外培養中の短期間のCXCL5シグナル抑制だけで着床能が改善することは非常に興味深い現象である。

本研究のCXCL5シグナル抑制法によって、着床能の改善効果は認められたが、流産率は改善できなかった。これは、老化した卵子では染色体分配チェックポイントに関連するタンパク質の発現が低下しており、減数分裂の段階ですでに染色体異数性になっている卵子の割合が高く、受精後に正常な状態に戻すことが困難であるためと考えられる。また、卵巣内のCXCL5の上昇が卵子の染色体分配チェックポイント関連遺伝子の発現低下に影響している可能性も考えられる。本研究では、*in vivo*のCXCL5シグナルの抑制実験は行なっていないため、卵巣内卵子におけるCXCL5と染色体異常の関連性に関しては不明である。一方、本研究で行った若齢マウス胚のCXCL5添加実験では、染色体の異数性が少ないと考えられる若齢マウスを用いたために流産率の増加が見られなかったと考えられる。本研究ではCXCL5の濃度を1000nMまでと設定して添加を行なったが、生体内のCXCL5濃度に関しては検討していない。CXCL5が本実験の濃度より高濃度で暴露された場合、染色体異常を増加させる可能性もあるため、CXCL5と染色体分配チェックポイント関連遺伝子の発現の関係に関して今後確認する必要がある。

本研究におけるヒトの遺伝子発現の網羅的比較解析は、形態学的に良好な胚を用いて解析を行なっている。しかし、染色体の異数性の検査 (PGT-A) は行なっておらず、使用した胚の染色体の異数性に関しては考慮していない。一般的に、老化に伴って染色体の異数性卵子の数が増え、このような卵子から発生した胚はほとんど着床せず、着床しても流産するため、高齢不妊患者の妊娠率が低い主な原因となっている (133)。しかし、すべての着床不全が染色体

の異数性を原因としたケースではない。染色体が正常な胚でも老化に伴い妊娠率は低下することから (83, 134)、その他の要因が妊娠率低下に関与していると考えられ、*CXCL5*がその1つであると推察された。本研究では、高齢マウス由来胚の着床率を大幅に改善させることに成功した。しかし、染色体の異数性は卵子の第1減数分裂の段階ですでに始まっており、胚になってから回復が困難であることから流産率が改善できなかったと思われる。高齢個体由来卵子の染色体の異数性の割合は、ヒトでは40歳以上の高齢不妊患者で約50%以上と言われているのに対し、マウスでは染色体の異数性の卵子はヒトほど多くなく約20%程度であると報告されている (105)。本研究の結果では、高齢マウス由来の胚に対して、*CXCL5*シグナルを抑制した高齢個体由来胚ではおよそ2倍の着床率改善効果が見られた。マウスの染色体異数性の卵子の割合が約20%と考えると、高齢マウス胚で着床に失敗した約60%の胚のうちの染色体の異数性以外の胚、約40%の胚に対して劇的な着床能改善効果を示したと考えられる。したがって、ヒト胚においても染色体異数性が原因の着床不全以外に対する有用な治療法になると考えられる。

本研究では、*CXCL5*シグナル上昇が老化に伴う胚の質低下の原因の1つと考え、老化した胚で*CXCL5*シグナル経路を抑制すると胚の質改善に効果があることを初めて見出した。そこで、*CXCL5*シグナルによる胚の質低下がどのような機序により着床能の低下に影響しているかを、若齢マウス胚に*CXCL5*を作用させ、老化を誘導してその解明を試みた。*CXCL5*を作用させた若齢マウス胚では、老化マーカーとされている代表的な遺伝子のうち、4つの遺伝子の発現が増加することを確認した。また、胚盤胞への発生に関しては影響しなかったが、着床率は*CXCL5*の濃度依存的に低下した。したがって、マウス胚では*CXCL5*シグナルによって老化に伴う胚の質低下が誘導され、その結果着床率が低下したと考えられた。さらに、着床の機構のどの段階に影響が現れるかを解明するため、*in vitro*の着床能評価アッセイを用いて着床率低下の原因を探った。*CXCL5*を作用させた胚を細胞培養用のチャンバー付きスライドグラス

上に静置し追加培養し、スライドグラスへの接着率を観察したところ、若齢マウス群とCXCL5作用群で差は認められなかった。しかし、接着した後のTrophoblastの伸展面積はCXCL5を作用させた胚で有意に縮小した。また、*in vitro*のアッセイの着床能の指標となるTrophoblastic giant cellの細胞数を比較したところ、CXCL5を作用させた胚では細胞数の有意な減少が見られた。老化によるCXCL5の発現亢進が、Trophoblastの細胞増殖抑制と、老化マーカーの1つであるPAI-1の発現上昇を引き起こして、子宮内膜に接着はするが、胚が内膜に浸潤する際に分泌するMMPタンパク質の活性を抑制し、接着後の子宮内膜筋層への浸潤および、浸潤後の細胞増殖を抑制するため、妊娠率が低下することが推察された。

老化したヒトの胚盤胞では、発現が確認された遺伝子の約3.5%に当たる820個の遺伝子の発現が大きく変動していた。特に細胞内代謝機能、細胞周期、ミトコンドリア機能、DNA損傷応答のような生物学的プロセスにおいて、発現変動遺伝子の出現頻度は有意に上昇していた。また、そのプロファイルを詳細に解析すると、老化で発現が上昇する遺伝子には炎症関連遺伝子の他にも、細胞周期抑制遺伝子や、アポトーシス抑制関連遺伝子などの遺伝子発現の亢進が認められた。一般的に、老化した細胞はアポトーシスにより排除され癌化が防がれているが、アポトーシス抑制遺伝子の発現が上昇するとその機構が破綻し、生存し続けるとそれがSASP因子の放出につながることを報告されている (36,135)。胚でも同様の機構で自らが分泌したSASP因子により老化を促進している可能性がある。その結果、Trophoblastの増殖能が低下し、それが高齢患者の着床不全の増加の原因になっていると考えられる。一方、老化した胚で遺伝子発現が低下する遺伝子として、ミトコンドリア機能に関係している遺伝子、DNAダメージ応答に関係する遺伝子、リボソームの構成に必要な遺伝子などに発現低下が見られた。老化した胚ではミトコンドリア機能の低下により、細胞内の代謝に必要なエネルギーの不足、リボソーム構成因子の減少によるタンパク質翻訳機能の低下などが原因で、細胞周期、細胞増殖などに必要な因子が不足し、発生能や着床能が低下することが推察された。

将来的なヒトへの臨床応用を考えて、本シグナル抑制法の安全性の評価を行った。主成分分析の結果、*CXCL5*シグナルを抑制した高齢マウス胚の遺伝子発現は、若齢マウス胚の発現プロファイルに類似していくことが確認された。したがって、*CXCL5*シグナル抑制胚の遺伝子発現は正常であり、なおかつ*CXCL5*シグナルの制御により遺伝子発現レベルでもある程度老化を制御できることが示唆された。本研究はヒト胚の遺伝子発現解析の結果から、高齢胚で最も発現量が高かった*CXCL5*を候補とし、その抑制による胚の質の改善効果について研究を行った。しかし、卵子や胚の老化には様々な因子が関与しており、胚の老化を誘導する因子は*CXCL5*以外にもあると考えられるため、*CXCL5*単独の抑制では高齢マウス由来胚の遺伝子発現プロファイルを若齢マウス胚のものに一致させることは不可能である。しかし、1つの遺伝子の抑制だけで、高齢マウス由来胚の遺伝子発現プロファイルがある程度若齢マウス由来胚のものに類似していくという報告はこれまでにない新たな発見である。今後はヒト胚のマイクロアレイのさらなる解析を行い、*CXCL5*以外に胚の老化に関係していると考えられる遺伝子を探索し、*CXCL5*の抑制に加え、他の遺伝子も制御することで更なる老化の抑制効果が見込まれる可能性が考えられる。一方、*CXCL5*シグナル抑制胚由来の産仔や胎盤には外見的な異常は特に見られなかった。それぞれの重量は、*CXCL5*シグナル抑制胚由来の産仔は高齢胚由来の産仔より重量は小さかった。これは、着床数の増加によるものであり、それぞれの胎仔に行き渡る栄養分が分散された結果、重量が減少したと考えられる。同様に若齢マウス胚由来の産仔の重量も軽いため、特に異常はないと推察される。また、若齢マウス胚の*CXCL5*シグナルを抑制しても胚発生率、着床率、産仔獲得率、流産率には影響は見られなかった。さらに、*CXCL5*のノックアウトマウスの表現系を見ると、胎仔期や産後直ぐの時期には特に異常はみられないことが報告されている (120)。したがって、胚の*CXCL5*シグナルを抑制する方法をヒトに応用しても、後代に悪影響を及ぼす可能性は低いことが示唆される。ただし、組織学的検討や出産後の発育および生殖毒性試験が今後必要と思われる。

これら一連の結果から、*CXCL5*シグナルの抑制は特に胚の発育に影響を与えるものではないと考えられ、本抑制法がヒト胚への治療法として利用可能と考えられる。しかし、本研究期間中に*CXCL5*シグナルの抑制を行なって生まれた産仔の生殖機能および免疫系に関する実験を行うことは出来なかった。今後継続して検討を続ける必要がある。

本研究を遂行している中で、高齢マウスの各種の組織や卵巣内の構成細胞、血中の*CXCL5*の発現量を測定したところ、高齢マウスのほとんどの細胞で有意に発現が増加することを確認した。特に卵巣内では卵丘細胞や顆粒膜細胞などの卵胞構成細胞だけでなく、間質細胞などでも発現増加が見られた。そこで、*CXCL5*が老化の新規バイオマーカーになりうると考え、その有用性に関してヒトの検体を用いて検討した。各患者の卵丘細胞の*CXCL5*の発現量を測定したところ、老化により発現量は増加していた。しかし、個々の卵子の受精後の胚発生能と卵丘細胞の*CXCL5*の発現量には相関関係は認められなかった。卵丘細胞自体は卵子と複合体を形成して採卵されるため、個々の卵子との相関関係を評価する上では非常に優れた検体と考えられる。今後、卵丘細胞の*CXCL5*の発現量とそれぞれに対応する卵子から発生した胚の妊娠率の関係を検討することで、個々の卵子の老化の程度と妊娠率を予測可能な新規バイオマーカーとして*CXCL5*を利用できる可能性がある。本研究ではヒトの卵胞液中の*CXCL5*の発現量の測定は行っていない。卵胞液中にも*CXCL5*の分泌が考えられるため、卵胞液中の検出が可能であれば卵丘細胞の採取などの手間が必要無いことから最も簡便な方法になると考えられる。また、最近では老化により、non-coding RNAの一種であり、遺伝子発現に抑制的な作用を持っているmiRNAの発現の変化も調査されている (136-138)。特に、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞体がmiRNAを内包しており、それらの老化による変化が注目されており、将来有用なバイオマーカーとなる可能性を秘めている。エクソソームは様々なタンパク質やmiRNAなどを含み、血中や体液中を浮遊している (121, 122)。エクソソーム自体は血中にも存在することから、簡便に採取できる老化のバイオマーカーとして利用可能と考えられる。

da Silvaら (139)が報告しているように、卵胞液中にもエクソソームが存在しているため、それらを網羅的に解析し、老化のステージ毎の特異的な発現パターンを見いだすことができれば、CXCL5と合わせて複数の因子をマーカーに使用してさらに精度の高い診断ができる可能性がある。

以上のことから、CXCL5シグナルがマウスの卵子・胚の老化に重要な因子であることが本研究により初めて確認された。また、胚の培養中に当該シグナルを抑制することでマウス胚の着床率、胚移植数に対する生産率の改善が見られた。しかし、本研究はマウスの卵子および胚を用いた研究であり、ヒト胚に対する効果は未だ確認していない。今後の更なる研究で確認する必要がある。また、流産率に関しては老化した卵子では減数分裂の段階ですでに染色体が異数性の卵子になっているため、当該シグナルを体外培養中に抑制するだけでは改善できない。高齢個体では徐々に老化細胞が体内に蓄積しSASP因子などを放出する。したがって、卵子の質の低下を予防するために、ある程度若齢の段階から体内でCXCL5シグナルを抑制すれば、卵子の老化に伴う質の低下を予防し、染色体分配に関係している遺伝子の発現低下を防ぎ、さらに染色体異数性を抑制できる可能性も考えられる。本抑制法は胚の染色体分配は正常であるが妊娠しない高齢患者に対して有用な治療法となることが考えられる。

近年、世界的に高齢不妊患者が増加しているが、そのような患者に対する効果的な治療法はいまだに確立されていない。本方法は高齢を原因とした不妊症患者に対する革新的な治療法となる可能性を秘めている。晩婚化に起因する高齢不妊症患者の増加が続き出生児数の減少が進んでおり、それは既に進行している人口の減少がさらに加速する一因にもなり、日本の高齢化に拍車をかけることに繋がる。また、出生児が減少することで特に若い労働力が必要とされる地方の農業や畜産業の担い手が減り、それらの衰退の一因にもなる。一方、畜産業、特にウシの生産に目を向ければ、老齢ウシ胚の有効利用は産業上意味をなさない。しかし、本研究で行ったヒトの卵丘細胞でのCXCL5測定の結果のように、ウシでもヒトと同様に、

年齢の割にCXCL5の発現量が高い場合があれば、若齢ウシであっても生殖年齢としては高齢になっている可能性があり、そのようなウシの胚移植をしても妊娠率が低いことが予想される。本研究の結果をウシの生産に応用することによって、若齢ではあるが生殖年齢的には既に高齢であるウシを判別することができ、無駄な胚移植や無駄な飼育を削減することで飼育コストを抑えることが可能性である。

本研究で見出された生殖細胞の老化とCXCL5の関係性は、動物生殖学における生殖細胞の老化に関する新たな研究上のツールとなり得ると推察される。このように、生殖細胞の老化の原因究明とその治療法を確立することは、現在直面しているヒトの不妊治療分野だけの問題ではなく、今後の日本の発展を支えるためにも社会的に非常に重要な課題である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻動物生産学連合講座教授 松原和衛 博士、岩手大学附属施設寒冷フィールドサイエンス教育研究センター御明神牧場准教授 平田統一 博士、山形大学大学院農学研究科動物機能調整学分野教授 木村 直子 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、国際医療福祉大学医学部産科婦人科学教室教授 河村和弘 博士に多大なご支援、ご指導を賜りましたことをここに深く感謝いたします。また、国際医療福祉大学医学部産婦人科学教室助教 佐藤可野 博士、同大学客員研究員 岡本直樹 博士、同大学客員研究員 川島一公 博士には、多大なご協力を賜りましたことを深く感謝いたします。

米国 Stanford 大学医学部産婦人科学教室教授 Aaron J W Hsueh 博士には、研究の遂行に関して多大なるアドバイスを頂きましたこと、また、英文投稿論文の校閲を賜りましたことを深く感謝いたします。

要 約

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。

参考文献

1. Best, B.P. Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. *Rejuvenation Res*, 2009. 12: p. 199-208.
2. Trifunovic, A. and N.G. Larsson. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med*, 2008. 263: p. 167-178.
3. Hayflick, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*, 1965. 37: p. 614-636.
4. Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*, 2001. 11: p. S27-31.
5. Herbig, U., W.A. Jobling, B.P. Chen, D.J. Chen, and J.M. Sedivy. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*, 2004. 14: p. 501-513.
6. Cong, Y.S., W.E. Wright, and J.W. Shay. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002. 66: p. 407-425, table of contents.
7. Herranz, N. and J. Gil. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*, 2018. 128: p. 1238-1246.
8. Kipling, D. and H.J. Cooke. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 1990. 347: p. 400-402.
9. Starling, J.A., J. Maule, N.D. Hastie, and R.C. Allshire. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res*, 1990. 18: p. 6881-6888.
10. Zhang, F., D. Cheng, S. Wang, and J. Zhu. Human Specific Regulation of the Telomerase Reverse

Transcriptase Gene. *Genes (Basel)*, 2016. 7.

11. Serrano, M., A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, and S.W. Lowe. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997. 88: p. 593-602.
12. von Zglinicki, T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 908: p. 99-110.
13. Benard, G., N. Bellance, C. Jose, S. Melser, K. Nouette-Gaulain, and R. Rossignol. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1797: p. 698-709.
14. Starkov, A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1147: p. 37-52.
15. Srinivas, U.S., B.W.Q. Tan, B.A. Vellayappan, and A.D. Jeyasekharan. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*, 2019. 25: p. 101084.
16. Landis, G.N. and J. Tower. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev*, 2005. 126: p. 365-379.
17. Tolmasoff, J.M., T. Ono, and R.G. Cutler. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980. 77: p. 2777-2781.
18. Beckman, K.B. and B.N. Ames. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 1998. 78: p. 547-581.
19. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 2012. 24: p. 981-990.

20. Wei, Y.H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998. 217: p. 53-63.
21. Kudryavtseva, A.V., G.S. Krasnov, A.A. Dmitriev, B.Y. Alekseev, O.L. Kardymon, A.F. Sadritdinova, M.S. Fedorova, A.V. Pokrovsky, N.V. Melnikova, A.D. Kaprin, A.A. Moskalev, and A.V. Snezhkina. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 2016. 7: p. 44879-44905.
22. Rubinsztein, D.C., G. Mariño, and G. Kroemer. Autophagy and aging. *Cell*, 2011. 146: p. 682-695.
23. Agathangelou, K., Z. Apostolou, and G.A. Garinis. Nuclear DNA Damage and Ageing. *Subcell Biochem*, 2018. 90: p. 309-322.
24. Jackson, S.P. and J. Bartek. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009. 461: p. 1071-1078.
25. Lindahl, T. and D.E. Barnes. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2000. 65: p. 127-133.
26. Mirzayans, R., B. Andrais, G. Hansen, and D. Murray. Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochem Res Int*, 2012. 2012: p. 951574.
27. Korwek, Z. and O. Alster. [The role of the DNA damage response in apoptosis and cell senescence]. *Postepy Biochem*, 2014. 60: p. 248-262.
28. Goukassian, D., F. Gad, M. Yaar, M.S. Eller, U.S. Nehal, and B.A. Gilchrest. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *Faseb j*, 2000. 14: p. 1325-1334.

29. Intano, G.W., E.J. Cho, C.A. McMahan, and C.A. Walter. Age-related base excision repair activity in mouse brain and liver nuclear extracts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003. 58: p. 205-211.
30. Um, J.H., S.J. Kim, D.W. Kim, M.Y. Ha, J.H. Jang, D.W. Kim, B.S. Chung, C.D. Kang, and S.H. Kim. Tissue-specific changes of DNA repair protein Ku and mtHSP70 in aging rats and their retardation by caloric restriction. *Mech Ageing Dev*, 2003. 124: p. 967-975.
31. Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 2008. 319: p. 1352-1355.
32. Yamakoshi, K., A. Takahashi, F. Hirota, R. Nakayama, N. Ishimaru, Y. Kubo, D.J. Mann, M. Ohmura, A. Hirao, H. Saya, *et al.* Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol*, 2009. 186: p. 393-407.
33. Jeyapalan, J.C., M. Ferreira, J.M. Sedivy, and U. Herbig. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev*, 2007. 128: p. 36-44.
34. Coppe, J.P., P.Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 2010. 5: p. 99-118.
35. Coppe, J.P., C.K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D.P. Munoz, J. Goldstein, P.S. Nelson, P.Y. Desprez, and J. Campisi. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 2008. 6: p. 2853-2868.
36. Kirkland, J.L. and T. Tchkonina. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*, 2017. 21: p. 21-28.
37. Acosta, J.C., A. Banito, T. Wuestefeld, A. Georgilis, P. Janich, J.P. Morton, D. Athineos, T.W. Kang, F. Lasitschka, M. Andrulis, *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*, 2013. 15: p. 978-990.

38. Lee, J.Y., K.R. Yu, B.C. Lee, I. Kang, J.J. Kim, E.J. Jung, H.S. Kim, Y. Seo, S.W. Choi, and K.S. Kang. GATA4-dependent regulation of the secretory phenotype via MCP-1 underlies lamin A-mediated human mesenchymal stem cell aging. *Exp Mol Med*, 2018. 50: p. 1-12.
39. Lopes-Paciencia, S., E. Saint-Germain, M.C. Rowell, A.F. Ruiz, P. Kalegari, and G. Ferbeyre. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 2019. 117: p. 15-22.
40. Acosta, J.C., A. O'Loughlen, A. Banito, M.V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 2008. 133: p. 1006-1018.
41. Acosta, J.C., A. O'Loughlen, A. Banito, S. Raguz, and J. Gil. Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle*, 2008. 7: p. 2956-2959.
42. Adam, S.A., V. Butin-Israeli, M.M. Cleland, T. Shimi, and R.D. Goldman. Disruption of lamin B1 and lamin B2 processing and localization by farnesyltransferase inhibitors. *Nucleus*, 2013. 4: p. 142-150.
43. Ito, T., Y.V. Teo, S.A. Evans, N. Neretti, and J.M. Sedivy. Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep*, 2018. 22: p. 3480-3492.
44. Saito, H., S.C. Jwa, A. Kuwahara, K. Saito, T. Ishikawa, O. Ishihara, K. Kugu, R. Sawa, K. Banno, and M. Irahara. Assisted reproductive technology in Japan: a summary report for 2015 by The Ethics Committee of The Japan Society of Obstetrics and Gynecology. *Reprod Med Biol*, 2018. 17: p. 20-28.
45. Cohen, M.E. The "brave new baby" and the law: fashioning remedies for the victims of in vitro fertilization. *Am J Law Med*, 1978. 4: p. 319-336.
46. Suzuki, M. In vitro fertilization in Japan - early days of in vitro fertilization and embryo transfer

and future prospects for assisted reproductive technology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2014. 90: p. 184-201.

47. Tan, S.L., P. Royston, S. Campbell, H.S. Jacobs, J. Betts, B. Mason, and R.G. Edwards. Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilisation. *Lancet*, 1992. 339: p. 1390-1394.
48. Ginsburg, M., M.H. Snow, and A. McLaren. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 1990. 110: p. 521-528.
49. Bendel-Stenzel, M., R. Anderson, J. Heasman, and C. Wylie. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. 9: p. 393-400.
50. Molyneaux, K.A., J. Stallock, K. Schaible, and C. Wylie. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol*, 2001. 240: p. 488-498.
51. Jagarlamudi, K. and A. Rajkovic. Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. 356: p. 31-39.
52. Fujimoto, T., Y. Miyayama, and M. Fuyuta. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec*, 1977. 188: p. 315-330.
53. Baker, T.G. A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1963. 158: p. 417-433.
54. Forabosco, A., C. Sforza, A. De Pol, L. Vizzotto, L. Marzona, and V.F. Ferrario. Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec*, 1991. 231: p. 201-208.
55. Broekmans, F.J., M.R. Soules, and B.C. Fauser. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*, 2009. 30: p. 465-493.
56. Wang, T., M. Zhang, Z. Jiang, and E. Seli. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging. *Am J*

Reprod Immunol, 2017. 77.

57. Vollenhoven, B. and S. Hunt. Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Res*, 2018. 7.
58. Hamatani, T., G. Falco, M.G. Carter, H. Akutsu, C.A. Stagg, A.A. Sharov, D.B. Dudekula, V. VanBuren, and M.S. Ko. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet*, 2004. 13: p. 2263-2278.
59. Grondahl, M.L., C. Yding Andersen, J. Bogstad, F.C. Nielsen, H. Meinertz, and R. Borup. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum Reprod*, 2010. 25: p. 957-968.
60. Shomper, M., C. Lappa, and G. FitzHarris. Kinetochore microtubule establishment is defective in oocytes from aged mice. *Cell Cycle*, 2014. 13: p. 1171-1179.
61. Herbert, M., D. Kalleas, D. Cooney, M. Lamb, and L. Lister. Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. 7: p. a017970.
62. Cheng, J.M. and Y.X. Liu. Age-Related Loss of Cohesion: Causes and Effects. *Int J Mol Sci*, 2017. 18.
63. Lister, L.M., A. Kouznetsova, L.A. Hyslop, D. Kalleas, S.L. Pace, J.C. Barel, A. Nathan, V. Floros, C. Adelfalk, Y. Watanabe, R. Jessberger, T.B. Kirkwood, C. Höög, and M. Herbert. Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr Biol*, 2010. 20: p. 1511-1521.
64. Tsutsumi, M., R. Fujiwara, H. Nishizawa, M. Ito, H. Kogo, H. Inagaki, T. Ohye, T. Kato, T. Fujii, and H. Kurahashi. Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. *PLoS One*, 2014. 9: p. e96710.

65. Hayashi, K., H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki, and M. Saitou. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 2011. 146: p. 519-532.
66. Hayashi, K., S. Ogushi, K. Kurimoto, S. Shimamoto, H. Ohta, and M. Saitou. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 2012. 338: p. 971-975.
67. Liu, M., Y. Yin, X. Ye, M. Zeng, Q. Zhao, D.L. Keefe, and L. Liu. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod*, 2013. 28: p. 707-717.
68. Takeo, S., D. Sato, K. Kimura, Y. Monji, T. Kuwayama, R. Kawahara-Miki, and H. Iwata. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *J Reprod Dev*, 2014. 60: p. 92-99.
69. Tarín, J., J. Ten, F.J. Vendrell, M.N. de Oliveira, and A. Cano. Effects of maternal ageing and dietary antioxidant supplementation on ovulation, fertilisation and embryo development in vitro in the mouse. *Reprod Nutr Dev*, 1998. 38: p. 499-508.
70. Tarín, J.J., S. Pérez-Albalá, and A. Cano. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev*, 2002. 61: p. 385-397.
71. Song, C., W. Peng, S. Yin, J. Zhao, B. Fu, J. Zhang, T. Mao, H. Wu, and Y. Zhang. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 35165.
72. Truong, T. and D.K. Gardner. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Human Reproduction*, 2017. 32: p. 2404-2413.
73. Liu, J., M. Liu, X. Ye, K. Liu, J. Huang, L. Wang, G. Ji, N. Liu, X. Tang, J.M. Baltz, D.L. Keefe, and L. Liu. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC). *Hum Reprod*, 2012. 27: p. 1411-1420.

74. Wang, T., Y.Y. Gao, L. Chen, Z.W. Nie, W. Cheng, X. Liu, H. Schatten, X. Zhang, and Y.L. Miao. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging and promotes subsequent embryonic development in the pig. *Aging (Albany NY)*, 2017. 9: p. 1552-1564.
75. Battaglia, C., G. Regnani, T. Marsella, F. Facchinetti, A. Volpe, S. Venturoli, and C. Flamigni. Adjuvant L-arginine treatment in controlled ovarian hyperstimulation: a double-blind, randomized study. *Hum Reprod*, 2002. 17: p. 659-665.
76. Takasaki, A., Y. Nakamura, H. Tamura, K. Shimamura, and H. Morioka. Melatonin as a new drug for improving oocyte quality. *Reprod Med Biol*, 2003. 2: p. 139-144.
77. Tremellen, K., G. Miari, D. Froiland, and J. Thompson. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2007. 47: p. 216-221.
78. Tsukamoto, S., A. Kuma, M. Murakami, C. Kishi, A. Yamamoto, and N. Mizushima. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science*, 2008. 321: p. 117-120.
79. Tamura, H., M. Kawamoto, S. Sato, I. Tamura, R. Maekawa, T. Taketani, H. Aasada, E. Takaki, A. Nakai, R.J. Reiter, and N. Sugino. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. *J Pineal Res*, 2017. 62.
80. Selesniemi, K., H.-J. Lee, A. Muhlhauser, and J.L. Tilly. Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. 108: p. 12319-12324.
81. Veeck, L.L. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. 1999.
82. Gardner, D.K., M. Lane, J. Stevens, T. Schlenker, and W.B. Schoolcraft. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*, 2000. 73:

p. 1155-1158.

83. Reig, A., J. Franasiak, R.T. Scott, Jr., and E. Seli. The impact of age beyond ploidy: outcome data from 8175 euploid single embryo transfers. *J Assist Reprod Genet*, 2020. 10.1007/s10815-020-01739-0.
84. Franasiak, J.M., E.J. Forman, K.H. Hong, M.D. Werner, K.M. Upham, N.R. Treff, and R.T. Scott, Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*, 2014. 101: p. 656-663.e651.
85. Zhang, J.J., X. Liu, L. Chen, S. Zhang, X. Zhang, C. Hao, and Y.L. Miao. Advanced maternal age alters expression of maternal effect genes that are essential for human oocyte quality. *Aging (Albany NY)*, 2020. 12: p. 3950-3961.
86. Zhang, G.M., C.H. Gu, Y.L. Zhang, H.Y. Sun, W.P. Qian, Z.R. Zhou, Y.J. Wan, R.X. Jia, L.Z. Wang, and F. Wang. Age-associated changes in gene expression of goat oocytes. *Theriogenology*, 2013. 80: p. 328-336.
87. Jiao, Z.X., M. Xu, and T.K. Woodruff. Age-associated alteration of oocyte-specific gene expression in polar bodies: potential markers of oocyte competence. *Fertil Steril*, 2012. 98: p. 480-486.
88. Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 2000. 25: p. 25-29.
89. Hiratsuka, K., Y. Kamino, T. Nagata, Y. Takahashi, S. Asai, K. Ishikawa, and Y. Abiko. Microarray analysis of gene expression changes in aging in mouse submandibular gland. *J Dent Res*, 2002. 81: p. 679-682.

90. Cao, J.N., S. Gollapudi, E.H. Sharman, Z. Jia, and S. Gupta. Age-related alterations of gene expression patterns in human CD8+ T cells. *Aging Cell*, 2010. 9: p. 19-31.
91. Glass, D., A. Vinuela, M.N. Davies, A. Ramasamy, L. Parts, D. Knowles, A.A. Brown, A.K. Hedman, K.S. Small, A. Buil, *et al.* Gene expression changes with age in skin, adipose tissue, blood and brain. *Genome Biol*, 2013. 14: p. R75.
92. Liu, D., M.A. Sartor, G.A. Nader, E.E. Pistilli, L. Tanton, C. Lilly, L. Gutmann, H.B. IglayRager, P.S. Visich, E.P. Hoffman, and P.M. Gordon. Microarray analysis reveals novel features of the muscle aging process in men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013. 68: p. 1035-1044.
93. Lener, T., P.R. Moll, M. Rinnerthaler, J. Bauer, F. Aberger, and K. Richter. Expression profiling of aging in the human skin. *Exp Gerontol*, 2006. 41: p. 387-397.
94. Shafiee, G., Y. Asgari, A. Soltani, B. Larijani, and R. Heshmat. Identification of candidate genes and proteins in aging skeletal muscle (sarcopenia) using gene expression and structural analysis. *PeerJ*, 2018. 6: p. e5239.
95. Zhu, Y., J.L. Armstrong, T. Tchkonja, and J.L. Kirkland. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014. 17: p. 324-328.
96. Yang, Y.K., C.R. Ogando, C. Wang See, T.Y. Chang, and G.A. Barabino. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 2018. 9: p. 131.
97. Chang, M.S., J. McNinch, R. Basu, and S. Simonet. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *J Biol Chem*, 1994. 269: p. 25277-25282.
98. Chen, C., Z.Q. Xu, Y.P. Zong, B.C. Ou, X.H. Shen, H. Feng, M.H. Zheng, J.K. Zhao, and A.G. Lu. CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the

AKT/NF- κ B pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 2019. 10: p. 178.

99. Begley, L.A., S. Kasina, J. MacDonald, and J.A. Macoska. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine*, 2008. 43: p. 194-199.
100. Kawamura, K., N. Kawamura, W. Sato, J. Fukuda, J. Kumagai, and T. Tanaka. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology*, 2009. 150: p. 3774-3782.
101. Chandeck, C. and W.J. Mooi. Oncogene-induced cellular senescence. *Adv Anat Pathol*, 2010. 17: p. 42-48.
102. Fehrer, C. and G. Lepperdinger. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol*, 2005. 40: p. 926-930.
103. Cheung, T.H. and T.A. Rando. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14: p. 329-340.
104. Ding, D.C., W.C. Shyu, and S.Z. Lin. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 2011. 20: p. 5-14.
105. Jones, K.T. and S.I. Lane. Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs. *Development*, 2013. 140: p. 3719-3730.
106. Kemper, J.M., B.J. Vollenhoven, and A.J. Talmor. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy: A Review. *Obstet Gynecol Surv*, 2019. 74: p. 727-737.
107. Englert, Y. and I. Govaerts. Oocyte donation: particular technical and ethical aspects. *Hum Reprod*, 1998. 13 Suppl 2: p. 90-97.
108. Cohen, J., R. Scott, T. Schimmel, J. Levron, and S. Willadsen. Birth of infant after transfer of

- anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet*, 1997. 350: p. 186-187.
109. Kristensen, S.G., S.E. Pors, and C.Y. Andersen. Improving oocyte quality by transfer of autologous mitochondria from fully grown oocytes. *Hum Reprod*, 2017. 32: p. 725-732.
 110. Richter, K.S. The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2008. 20: p. 292-304.
 111. Giannubilo, S.R., P. Orlando, S. Silvestri, I. Cirilli, F. Marcheggiani, A. Ciavattini, and L. Tiano. CoQ10 Supplementation in Patients Undergoing IVF-ET: The Relationship with Follicular Fluid Content and Oocyte Maturity. *Antioxidants (Basel)*, 2018. 7.
 112. Youssef, M.A., H.I. Abdelmoty, H.A. Elashmwi, E.M. Abduljawad, N. Elghamary, A. Magdy, M.N. Moheesen, R.M. Abdella, M.A. Bar, H.M. Gouda, *et al.* Oral antioxidants supplementation for women with unexplained infertility undergoing ICSI/IVF: randomized controlled trial. *Hum Fertil (Camb)*, 2015. 18: p. 38-42.
 113. Wątroba, M. and D. Szukiewicz. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci*, 2016. 61: p. 52-62.
 114. Imai, S. and L. Guarente. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol*, 2014. 24: p. 464-471.
 115. Bhullar, K.S. and B.P. Hubbard. Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1852: p. 1209-1218.
 116. Blagosklonny, M.V. Rapamycin for longevity: opinion article. *Aging (Albany NY)*, 2019. 11: p. 8048-8067.
 117. Pan, Y.R., J.Y. Song, B. Fan, Y. Wang, L. Che, S.M. Zhang, Y.X. Chang, C. He, and G.Y. Li. mTOR may interact with PARP-1 to regulate visible light-induced parthanatos in photoreceptors. *Cell*

118. Steuerwald, N., J. Cohen, R.J. Herrera, M. Sandalinas, and C.A. Brenner. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 2001. 7: p. 49-55.
119. Zhou, P., H.Y. Lian, W. Cui, D.L. Wei, Q. Li, Y.X. Liu, X.Y. Liu, and J.H. Tan. Maternal-restraint stress increases oocyte aneuploidy by impairing metaphase I spindle assembly and reducing spindle assembly checkpoint proteins in mice. *Biol Reprod*, 2012. 86: p. 83.
120. Mei, J., Y. Liu, N. Dai, M. Favara, T. Greene, S. Jeyaseelan, M. Poncz, J.S. Lee, and G.S. Worthen. CXCL5 regulates chemokine scavenging and pulmonary host defense to bacterial infection. *Immunity*, 2010. 33: p. 106-117.
121. Kortlever, R.M., P.J. Higgins, and R. Bernards. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*, 2006. 8: p. 877-884.
122. Machida, T., T. Tomofuji, D. Ekuni, T. Maruyama, T. Yoneda, Y. Kawabata, H. Mizuno, H. Miyai, M. Kunitomo, and M. Morita. MicroRNAs in Salivary Exosome as Potential Biomarkers of Aging. *Int J Mol Sci*, 2015. 16: p. 21294-21309.
123. Kim, K.M., K. Abdelmohsen, M. Mustapic, D. Kapogiannis, and M. Gorospe. RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017. 8.
124. Wunder, D.M., M.D. Mueller, M.H. Birkhäuser, and N.A. Bersinger. Increased ENA-78 in the follicular fluid of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2006. 85: p. 336-342.
125. Abdalla, H.I., M.E. Wren, A. Thomas, and L. Korea. Age of the uterus does not affect pregnancy or implantation rates; a study of egg donation in women of different ages sharing oocytes from the same donor. *Hum Reprod*, 1997. 12: p. 827-829.

126. Gleicher, N., V.A. Kushnir, D.F. Albertini, and D.H. Barad. Improvements in IVF in women of advanced age. *J Endocrinol*, 2016. 230: p. F1-6.
127. Soares, S.r.R., C. Troncoso, E. Bosch, V. Serra, C. Simón, J. Remohí, and A. Pellicer. Age and Uterine Receptiveness: Predicting the Outcome of Oocyte Donation Cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005. 90: p. 4399-4404.
128. Guo, H., Z. Liu, B. Xu, H. Hu, Z. Wei, Q. Liu, X. Zhang, X. Ding, Y. Wang, M. Zhao, Y. Gong, and C. Shao. Chemokine receptor CXCR2 is transactivated by p53 and induces p38-mediated cellular senescence in response to DNA damage. *Aging Cell*, 2013. 12: p. 1110-1121.
129. Rodier, F., J.P. Coppe, C.K. Patil, W.A. Hoeijmakers, D.P. Munoz, S.R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A.R. Davalos, and J. Campisi. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, 2009. 11: p. 973-979.
130. Gu, Z., J. Jiang, W. Tan, Y. Xia, H. Cao, Y. Meng, Z. Da, H. Liu, and C. Cheng. p53/p21 Pathway Involved in Mediating Cellular Senescence of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. 2013: p. 134243.
131. Menicacci, B., A. Laurenzana, A. Chillà, F. Margheri, S. Peppicelli, E. Tanganelli, G. Fibbi, L. Giovannelli, M. Del Rosso, and A. Mocali. Chronic Resveratrol Treatment Inhibits MRC5 Fibroblast SASP-Related Protumoral Effects on Melanoma Cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2017. 72: p. 1187-1195.
132. Wang, R., Z. Yu, B. Sunchu, J. Shoaf, I. Dang, S. Zhao, K. Caples, L. Bradley, L.M. Beaver, E. Ho, C.V. Löhr, and V.I. Perez. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell*, 2017. 16: p. 564-574.
133. Gianaroli, L., M.C. Magli, A.P. Ferraretti, C. Tabanelli, C. Trombetta, and E. Boudjema. The role

- of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online*, 2002. 4 Suppl 3: p. 31-36.
134. Mikwar, M., A.J. MacFarlane, and F. Marchetti. Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutat Res*, 2020. 785: p. 108320.
135. Li, M., D. Wang, J. He, L. Chen, and H. Li. Bcl-X(L): A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacol Res*, 2020. 151: p. 104547.
136. Smith-Vikos, T. and F.J. Slack. MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci*, 2012. 125: p. 7-17.
137. Kumar, S., M. Vijayan, J.S. Bhatti, and P.H. Reddy. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017. 146: p. 47-94.
138. Kinser, H.E. and Z. Pincus. MicroRNAs as modulators of longevity and the aging process. *Hum Genet*, 2020. 139: p. 291-308.
139. da Silveira, J.C., D.N. Veeramachaneni, Q.A. Winger, E.M. Carnevale, and G.J. Bouma. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, 2012. 86: p. 71.