

(別紙 1)

## 総括研究報告書

課題番号：2019B-9

課題名：細菌叢由来 D-アミノ酸による母体環境の改善をめざした新たな生殖補助医療の開発

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター  
(所属・職名 氏名) 細胞医療研究部・室長 宮戸 健二

(研究成果の要約) 近年晩婚化が進み、7 組に 1 組のカップルが不妊となっている本邦では、年間 50,000 人以上が体外受精関連技術で出産しているものの、生殖補助医療技術にはいくつかのステップで問題がある。妊娠成立に必要な生物学的事象を多面的に解析・明らかにすることで、患者にとってよりフレンドリーな診断と治療法の開発が求められている。本研究では、妊娠成立に必要な生殖器官の共生細菌を明らかにする。さらに細菌の代謝物 D-アミノ酸に着目し、D-アミノ酸を介した妊娠成立 (卵胞形成から受精・初期胚発生・着床まで) のメカニズムを明らかにすることを目的とする。これにより、科学的エビデンスを有する metagenome 解析に基づく新規診断法を開発するのみならず、実現可能性が高い治療法開発 (細菌性代謝物 D-アミノ酸を用いた培養液の改善やサプリメントなど) が期待される。細菌性代謝物には D-アミノ酸、短鎖脂肪酸など様々なものが含まれる。本研究により妊娠成立に必要と考えられる細菌と D-アミノ酸をはじめとした細菌性代謝物が特定された際には、マウスなど動物実験モデルを用いた機能解析が必要となる。*Lactobacillus* 属のなかには 100 種以上の菌が含まれるが、どの菌種が妊娠に関与しているかわかっていない。そこで本年度は、妊娠の成立に重要な細菌叢と D-アミノ酸を同定することを目指した。本研究は、細菌性 D-アミノ酸が卵子発生から初期胚発生、着床成立に関わるまでに果たす役割に着目した極めて独創性の高い研究である。これまで膣内細菌叢に占める *Lactobacillus* 属の比率に基づいた着床障害の診断および治療が国内外の臨床領域で急速に進んでいるものの、生殖器官の細菌叢に関する十分なエビデンスを持った報告はなく、さらに、生殖領域において細菌叢が産生する D-アミノ酸をはじめとした細菌性代謝物の発現解析と機能に関する報告はほとんどない。

### 1. 研究目的

晩婚化による不妊症の増加が社会的な問題になっている。しかし、ART には診断・治療技術ともに課題があり、妊娠成立に必要な基盤となる基礎的知見は十分に得られていない。膣内には *Lactobacillus* 属などの

乳酸菌が共生細菌として存在することは知られている。近年、共生細菌が産生する D-アミノ酸が生理機能におよぼす役割が注目されるようになってきている。

タンパク質を構成するアミノ酸には、分子構造が鏡像関係にある 2 つの光学異性体が存在する。L-アミノ酸と D-アミノ酸である (図 1)。あらゆる生物界で広く利用されている L-アミノ酸に比べ、D-アミノ酸はマイナーな存在だが、L-アミノ酸とは異なる重要な役割を担っていることが解明され始めている。

そこで本研究では『正常な”細菌叢と産生される D-アミノ酸を介した胞発育・胚発生と着床のメカニズムを明らかにし、妊娠成立に必要な細菌叢と D-アミノ酸の同定する』ことを目的とする。さらに既存の診断基準が曖昧な子宮内膜炎を metagenome 解析により評価し、“異常な”細菌叢によって引き

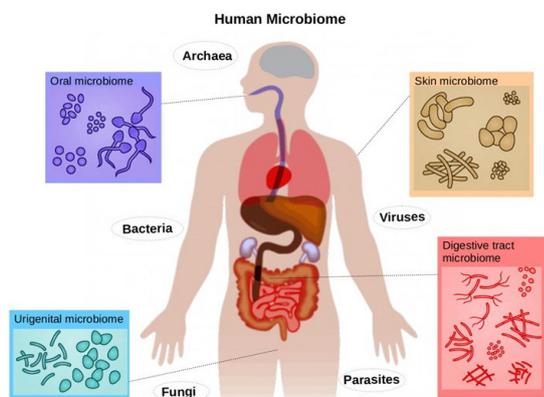


図 1 細菌叢による生体機能の制御

(<https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/science/summary/microbiome>を一部改変)

起こされる不妊症の原因を明らかにし、あらたな不妊症の診断法・治療法の開発を目指す。

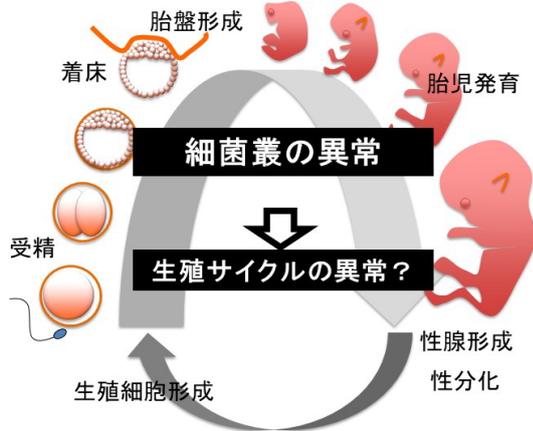


図2 細菌叢による生殖サイクルの制御

## 2. 研究組織

研究者	所属施設
宮戸 健二	国立成育医療研究センター
山田 満稔	慶應義塾大学
笹部 潤平	慶應義塾大学
河野菜摘子	明治大学

## 3. 研究成果

本年度の研究は、マウスの生殖器内に生育するバクテリアを、雌雄それぞれから単離後、種を同定した。さらに、細菌の生殖能への影響を検討するために抗生物質を投与した個体と未投与個体の産仔数と着床痕数を比較した。マウスの子宮内成分による

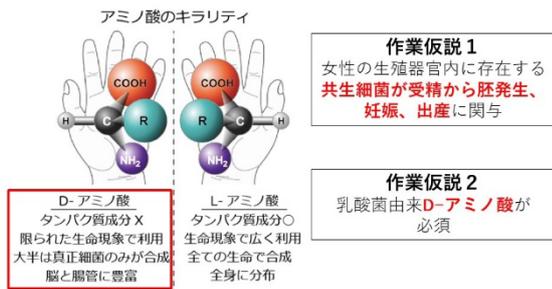


図3 共生細菌由来の物質による生殖サイクルの制御

殺精子・抗菌作用についても解析した。続いて、D-アミノ酸の生物学的役割について解析を行った。さらに、ヒト生殖器内の細菌叢とD-アミノ酸と primary outcome の相関を解析した。具体的には、以下のとおりである。

1) 生殖器内に共生する細菌の役割 (実験動物を用いた検討) (担当：宮戸、河野)

これまで我々は、同一系統のマウスを、クリーン度の異なる複数の動物実験施設で飼育を行ってきた。その結果、遺伝的背景が同一であるにも関わらず、飼育する動物実験施設によって雌マウスから産まれる仔の数に明らかな差がでることを見出した。

クリーン度の高い SPF 施設で飼育されたマウスで雌雄それぞれの生殖器から異なる種の細菌を単離、同定した。

さらに、抗生物質を投与した場合、左右の子宮角の着床痕数が変動することがわかった。

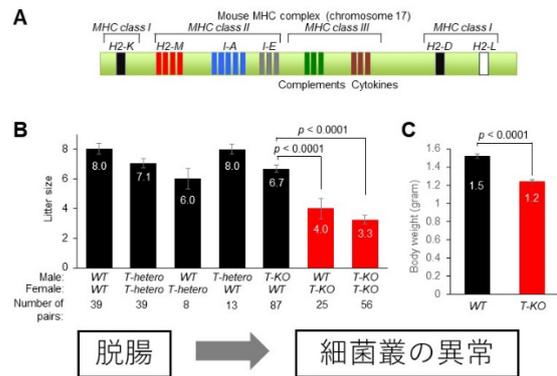


図4 MHC class I-KOマウスの出生異常 (産仔数の減少、低成長)

2) 子宮内成分による殺精子・抗菌作用 (担当：河野、宮戸)

動物界を見渡すと、母体内で精子が死滅する現象が複数報告されている。例えば、ブタやミツバチなどでは母体内での精子生存率は低く、運動能や受精効率が良い精子だけが受精できる精子競争 (Sperm competition) のしくみが存在する。すなわち、雌は交尾する雄を選ぶだけでなく、交尾した後も雄の精子を選んでいることになる。我々の最新の研究から、子宮内の殺精子作

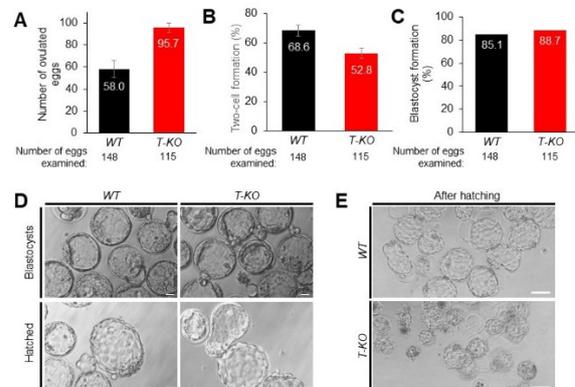


図5 MHC class I-KO胚盤胞の発生異常

用の中心因子は、自然免疫に関わる液性因子であると推測している。

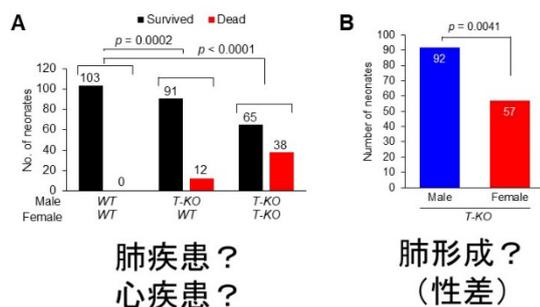


図6 *MHC class I-KO*マウスの出生異常 (未熟仔の増加、性差)

### 3) 精子を守る精液タンパク質 (担当: 河野、宮戸)

母体によって精子が異物扱いされるのであれば、なぜ体内受精は成立するのか？その答えの鍵は、男性の精液タンパク質である。母体の殺精子作用の発見のきっかけにもなった精液タンパク質 *seminal vesicle secretion 2 (SVS2)* は、精子細胞膜表面を覆い、母性の自然免疫から精子を保護する作用がある。SVS2は精嚢と呼ばれる副生殖腺器官から分泌される強塩基性タンパク質であり、細胞膜に存在するガングリオシド GM1 を介して精子表面を覆う。SVS2 に覆われた精子は、レーダーに捕捉されにくいステルス戦闘機のように、母体免疫の標的から除外されると考えられる。母体の免疫力を低下させることなく特定の細胞のみを生存可能にしている点で、このしくみ(精子のステルス化)は画期的なシステムである。

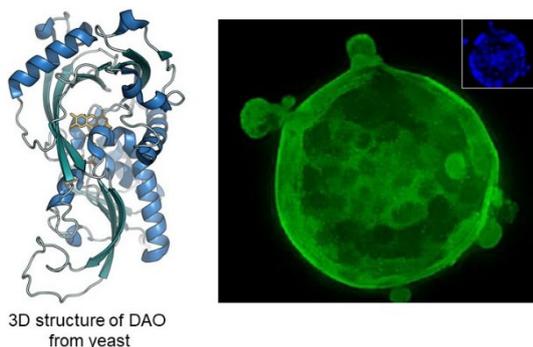


図7 D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)のマウス胚盤胞での発現

### 4) 主要組織適合遺伝子複合体クラス I (*MHC class I*) 分子欠損 (*MHC class I-KO*) マウスの生殖機能低下と細菌叢の異常

本年度は、免疫不全マウスとして知られる *MHC class I-KO* における生殖異常を解析した。これまでの解析から、*MHC class I-KO* 雌マウスと欠損雄マウスの交配からの産仔数は通常の50%程度であり、さらに生まれてきた新生仔は低体重であった(図1)。このマウスは脱腸を起こすことから、腸内に共生している細菌叢が異常であることが推測された。そのため、生殖器官内の細菌叢も異常になっている可能性がある。

そこでまず、*MHC class I-KO* 雌マウスの配偶子を欠損雄マウスの精子と受精させたところ、受精率、胚盤胞への発生率には、野生型マウスと比べて顕著な差は認められなかった。一方、KSOM 培地で胚盤胞を培養したところ、野生型胚と比較して、きわめて脆弱であり、ほとんど細胞死にいたった(図2)。また、新生仔の生存率が野生型に比べて低く、何らかの先天性異常を発症していることが推測された(図3)。加えて、出生する雄の割合が雌の2倍近くと性差が認められたが、原因は不明である。

### 5) D-アミノ酸の生物学的役割 (担当: 笹部)

我々は、これまでの研究から、D-アラニン、D-グルタミン酸、D-プロリンなど、哺乳類が生合成できないD-アミノ酸を共生細菌叢のみが大量に作っていることを発見した。女性の生殖器官内にも細菌が存在することから、腸内に類似したD-アミノ酸による生殖機能の調節機構が存在する可能性がある。

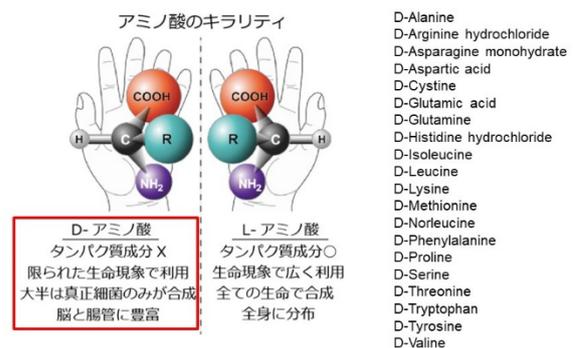


図8 D-アミノ酸による生殖機能の制御

### 6) 生殖器官の細菌叢と D-アミノ酸と primary outcome の相関解析 (担当: 山田、笹部)

ヒトにおいても共生細菌 *Lactobacillus* 属

あるいはその代謝物 D-アミノ酸が妊娠成立に関与しているとの仮説を立て、当該年度においては、ヒト生殖器官の細菌叢と D-アミノ酸と primary outcome の相関を解析した。これまでに 7 名の患者からインフォームドコンセントを得ており、十分な統計学的出力を得るため、研究参加者は今後 30 から 100 名を予定している。

これまでの予備実験で子宮腔内サンプルからのメタゲノム解析に成功しており、細菌叢解析の体制は整っている。並行して膈内・子宮腔内、血液サンプル中の D-アミノ酸解析を行う予定である。

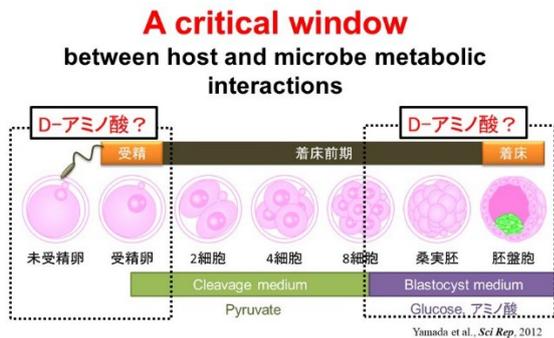


図9 本研究の目標(windowと物質の同定)

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

1) 臨床研究・動物実験に際しては国立成育医療研究センターの倫理委員会に申請し、臨床研究に関わる倫理指針に準拠して研究を実施する。

2) 実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段に

より苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

3) サンプル採取について慶應義塾大学倫理委員会にて審査が完了した(承認番号 20180066)。研究対象者からはインフォームドコンセントの取得を行う。研究対象者からの同意取得について「ヘルシンキ宣言」「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および日本産科婦人科学会「体外受精・胚移植に関する見解」、「顕微授精に関する見解」、

「ヒト胚および卵子の凍結保存と移植に関する見解」および「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する見解」の定める倫理指針規定に基づいて行われる。対応表を用いて個人が特定できる状態の匿名化を行う。これにより研究対象者のプライバシー保護につとめる。研究対象者の不利益・危険性として、排卵誘発、採卵、顕微授精および凍結にかかる経済的負担が指摘される。

採卵施行時の合併症(感染症、出血による再手術、卵巢過剰刺激症候群、麻酔による合併症など)が引き起こされる可能性がある。このうち感染症に対しては採卵時および採卵後の抗生剤投与により予防する。出血のほとんどは少量で軽快することが多い。慶應義塾大学病院では年間 700 サイクル前後の採卵を行っているが、実際に止血目的で手術を行った症例はこの 5 年間なく、極めて安全な採卵操作の施行が可能である。