

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：30-33

課題名：3D血管モデルから紐解く卵や成育疾患の病態メカニズムの解明

宮本 義孝 (所属施設) 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所  
(所属・職名) 再生医療センター細胞医療研究部 上級研究員

(研究成果の要約)

本研究の目的は、「卵から成育疾患について、その原因と発症メカニズムを探る」ことである。近年、卵子の老化因子の影響や酸化ストレスの増加に伴い、卵子の質が低下するとともに、採卵数や受精率、妊娠率が低くなることがわかってきた。現在、卵子の質は、その形態のみで評価しているのがほとんどであり、より高い受精率を達成すると共に、その後の良好な発育を促進するためには新たな評価法を確立する必要がある。そこで、本研究では、卵子の周囲を取り巻く「顆粒膜細胞」に注目し、顆粒膜細胞の質の低下の原因として考えられる、「細胞死の制御メカニズムの解明」と「細胞死の前段階を判定するバイオマーカーの同定」を試みた。まず、我々は、オートファジーの仕組みに注目した。ART患者様からご提供頂いた顆粒膜細胞を用いて、微小管結合タンパク質およびオートファゴソーム形成初期に働くLC3の発現量および細胞内局在を調べた。結果、LC3は卵壁顆粒膜細胞(MGC)とdysmature(DCC,卵丘細胞)で高い発現を示し、染色体DNAの断片化が確認できた。一方、オートファゴソーム膜に局在するLC3-IIはMGCでのみ検出された。さらに、オートファゴソーム形成においてLC3前段階に関与するATG7の発現を調べたところ、他の細胞に比べてMGCで有意に高い発現がみられた。また、DCCはimmature(ICC,卵丘細胞)およびmature(MCC,卵丘細胞)よりATG7の発現が低いことがわかった。これらの結果から、(1)通常のオートファジーはMGCでのみ起こり、細胞死に至る、(2)DCCではLC3の発現が高く、LC3-IからLC3-IIへの変換は起こらない。すなわち、ATG7の発現が低いことから、オートファジーは機能不全をおこし、MGCとは異なるメカニズムで細胞死に至る可能性が推測される。以上より、LC3とATG7が、MGCが細胞死に至ることを予測するバイオマーカーとして期待される。さらに、得られた結果をもとに、卵子の周囲を取り巻く「顆粒膜細胞」と「血管」による3Dモデルを作製し、その挙動とそのメカニズムの関係性から成育疾患の病態メカニズムの解明に取り組んでいる。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、「卵から成育疾患について、その原因と発症メカニズムを探る」ことである。近年、卵子の老化因子の影響や酸化ストレスの増加に伴い、卵子の質が低下するとともに、採卵数や受精率、妊娠率が低くなることがわかってきた。すなわち、卵とともに、母体側の血管老化が進んでしまうと、血管が機能不全に陥り、正常に栄養分などを目的部位に運搬されないことから、多くの疾患を発症する可能性がある。

現在、卵子の質は、その形態のみで評価しているのがほとんどであり、より高い受精率を達成すると共に、その後の良好な発育を促進するためには新たな評価法を確立する必要がある。そこで、本研究では、卵子の

周囲を取り巻く「顆粒膜細胞」に注目し、顆粒膜細胞の質の低下の原因として考えられる、「細胞死の制御メカニズムの解明」と「細胞死の前段階を判定するバイオマーカーの同定」を試みた。

近年、複雑な微小環境を生体外で再現するデバイスとして、Organ on a Chipが注目されている。本技術は、異なる細胞を適切な配置で共培養し、適切な微小環境を設計して、これまでに多くの生体モデルが報告されている。そこで、得られた成果をもとに、卵子の周囲を取り巻く「顆粒膜細胞」と「血管」による3Dモデルを作製し、その挙動とメカニズムの関係性から成育疾患の病態メカニズムの解明に取り組んでいる。

## 2. 研究組織

研究者	所属施設
宮本 義孝	国立成育医療研究センター
宮戸 健二	国立成育医療研究センター
康 宇鎮	国立成育医療研究センター
研究協力者	
齊藤 英和	国立成育医療研究センター
梅澤 明弘	国立成育医療研究センター

## 3. 研究成果

本年度の研究では、2D および 3D 培養技術による成育疾患の病態メカニズムの解明を行った。特に、高い受精率および良好な発育を促進するために、卵子の質に注目した。

1)～5)では、卵子の周囲を取り巻く「顆粒膜細胞」に注目し、細胞死の制御メカニズムの解明と、細胞死への誘導を予測するバイオマーカーとして、タンパク質 LC3 と ATG7 を同定した。6)～8)では、複雑な微小環境を生体外で再現するために、3D 血管モデルと「顆粒膜細胞」との関係性について、そのメカニズムの解明に取り組んでいる。

### 1) 体外受精-胚移植 (IVF-ET) の特徴

本研究では、IVF-ET グループの情報を収集するために、単一胚移植サイクルで、9回の IVF-ET サイクルを実施した。女性の平均年齢は  $38.8 \pm 1.3$  歳であり、3日目の血清 FSH レベルは正常であった ( $4.6 \pm 0.4$  mIU/ml)。卵胞が刺激されると hCG 投与前の血清エストラジオールレベルは  $3266.7 \pm 549.2$  pg/ml であった。患者様からご提供頂いた卵子の平均数は  $12.6 \pm 1.5$  個であり、その受精率は  $6.6 \pm 1.5\%$  であった。また、卵丘細胞の成熟度によって分類した場合、MCC、ICC、DCC の平均数はそれぞれ  $6.2 \pm 1.2$ 、 $4.1 \pm 0.6$ 、 $2.2 \pm 0.4$  個であった。

MGC および COC を患者様の卵胞液から単離した後、卵子を COC から分離した。残りの卵丘細胞は、3つのタイプ、すなわち ICC、MCC および DCC に分類した (図 1A)。ICC、MCC、および DCC から分離された卵子の受精率は、それぞれ 53.8、60.7、および 34.0% であった (図 1B)。DCC に囲まれた卵子は、ICC および MCC に囲まれた卵子と比べ、有意に低い受精率を示した。この結果は、卵丘細胞の生理的状態が卵子の質に関

係することを示唆する。卵子周囲の体細胞が卵子の質にどのように関わっているのかを分子レベルで理解するため、我々はこれら COC から収集した 3 種類の MGC、ICC、MCC、および DCC の特徴を調べた。

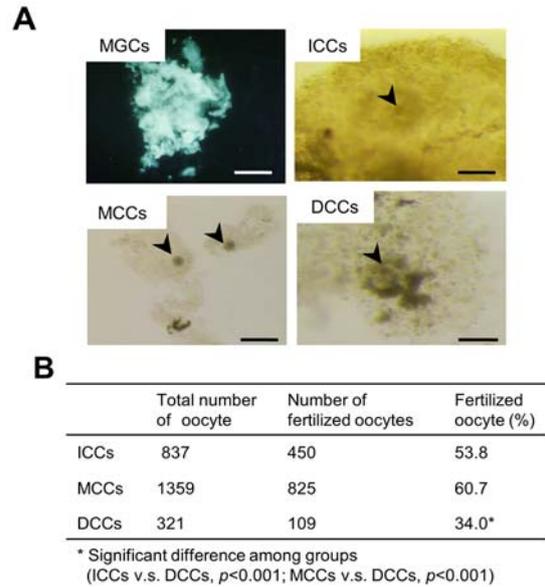


図 1. 成熟度による卵丘細胞の分類と受精率への影響

### 2) LC3 タンパク質の細胞内局在

オートファジーが細胞の生存に重要であり、卵子周囲の体細胞の質に関与すると考えられてきた。そこで、卵子周囲の体細胞と卵子の質の関係を調べるために、卵子卵丘細胞複合体 (COC) から収集した 3 種類の immature (ICC)、mature (MCC)、dysmature (DCC) と顆粒膜細胞 (MGC) を用いて、LC3 発現を調べた (図 2)。

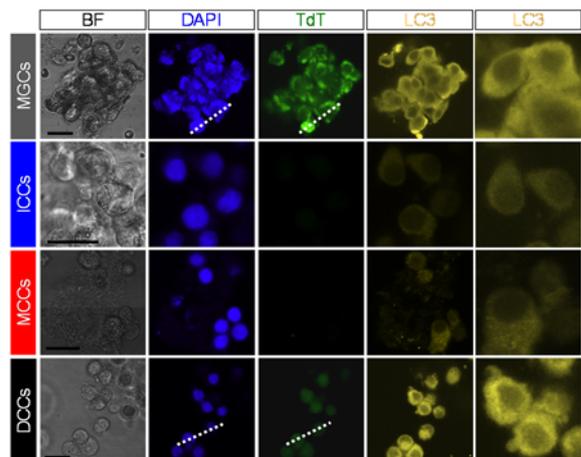


図 2. 顆粒膜細胞と卵丘細胞での LC3 発現

結果、MGC では、細胞質での局在が確認

できた (図 2)。一方、DCC では、細胞質と核の両方に局在していた。MGC および DCC において、過剰な LC3 発現は類似しているが、細胞内 LC3 局在化はこれらの細胞間で異なることが示唆された。

### 3) 細胞死と DNA 断片化

DNA 断片化は、アポトーシスおよび非アポトーシス性細胞死に付随して起こる特徴であり、細胞死の評価に用いられる。そこで、DNA 断片化より、細胞死と LC3 高発現の関係を検討した。結果、DCC と MGC において、DNA 断片化が観察された。さらに、TdT 標識より、DCC より MGC の方が高い蛍光強度を示すことから、両方は異なる細胞状態である可能性が示唆された。

### 4) MGC と卵丘細胞の ATG7 発現

オートファジー関連タンパク質 ATG は、主としてオートファゴソーム形成を制御する。特に、ATG7 は LC3-II に変換される LC3-I の脂質化に関係する。オートファジーを介して DCC の細胞死が誘導される場合は、ATG7 が発現する可能性が高いことから、卵丘細胞 (MCC, ICC, DCC) の ATG7 発現を調べた。特に、ATG7 は LC3-II に変換される LC3-I の脂質化に必要である。結果、MGC と卵丘細胞 (ICC, MCC, DCC) で ATG7 の発現を確認できた。中でも、DCC より MGC の方が、ATG7 発現において高い蛍光強度を示した (図 3A)。ICC と MCC は、LC3 発現において低い蛍光強度を示したが、ATG7 においても、ICC と MCC での発現が確認できた。以上より、DCC において、ATG7 タンパク質の発現量が最も低いことが示された。本結果より、我々は、ATG7 タンパク質発現の低下から機能不全の自食作用につながる可能性があると考えた。

### 5) リソソームとオートファジー

損傷したオルガネラを完全に分解するためには、リソソームとオートファゴソームの融合が必要である。リソソームの数と分布を推定するために、

LysoTracker Green DND-26 で染色した。結果、DCC より MGC において、高い蛍光シグナルが検出された (図 3B)。ICC と MCC においても低い蛍光シグナルが検出されたことから、リソソームを介した典型的なオートファジーが MGC では起こっているが、DCC では起こらないことを示唆している。

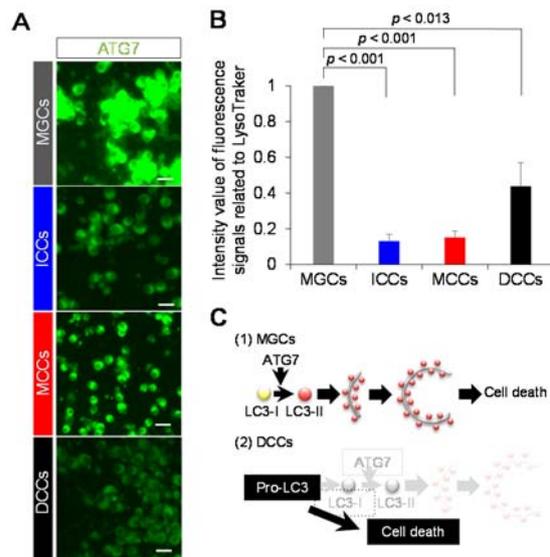


図 3. ATG7 発現とリソソームの分布

卵丘細胞は卵管内のオートファジー誘導物質から卵子を保護すると考えられている。卵子の質を維持するためには、卵丘細胞は卵子の自食作用を抑制するのに重要な役割を果たし、それは卵子に最も適した環境を提供している。全ての卵丘細胞 (ICC, MCC, DCC) において、ATG7 の発現およびリソソームの分布が低いことから、MGC とは異なるメカニズムであることが明らかになった (図 3C)。

排卵や妊娠を含む女性の生殖プロセスは、環境要因や栄養要因によって調節される一連のホルモン、サイトカイン、成長因子の変化によって制御されているため、一人の患者様に対する検討では不十分であり、引き続き、継続して検討する必要がある。

### 6) 3D 血管モデルの作製

3D 血管モデルを構築するために、細胞を適切な配置で培養することで目的の微小環境を設計することが可能

となる。我々は、まず、細胞外マトリックス（ECM）としてコラーゲン（2.5mg/mL）を介した共培養モデルの作製およびその評価を行った。培養チップ内の構成は、中心チャンネルをコラーゲンゲルで満たし、両端のチャンネルを、ウシ頸動脈正常血管内皮細胞（HH cells）を播種し、各々HH細胞モノレイヤーを構築した。位相差顕微鏡により、細胞培養チップ内の全体像を示す（図.4A）。また、蛍光顕微鏡により、細胞培養チップ内が生細胞であること（図.4B: Calcein-AM）、流路内にHH細胞の3D血管が構築されたことが確認できた（図.4C）。

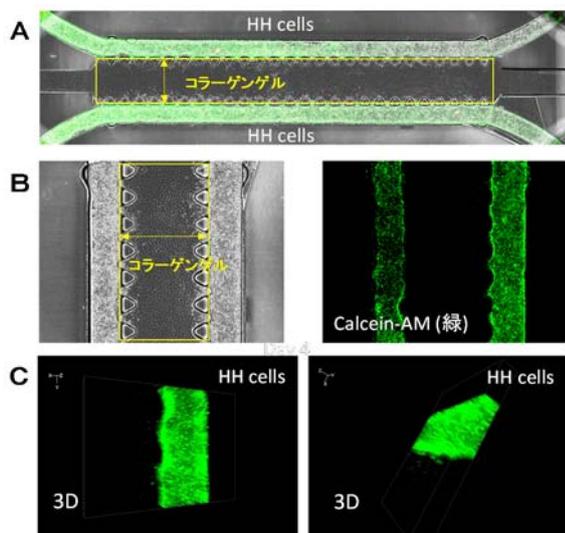


図 4. 3D 血管モデルの作製

#### 7) 3D 血管モデルによる血管新生評価 (HUVEC 増殖、管腔形成、遊走)

先の結果をもとに、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を細胞培養チップ内に播種し、3D 血管モデルの作製およびその評価を行った。ここでは、細胞培養チップ内の異なるチャンネルにそれぞれ CellTracker™色素で標識した HUVEC（緑、および赤）を播種し、細胞の分布と挙動を検討した。結果、異なるチャンネルごとに HUVEC 血管を形成して（緑、赤）、VEGF（血管内皮細胞増殖因子）の添加により、時間が経過するにつれて、マトリックス内への血管新生を誘導していることが確認できた（図 5）

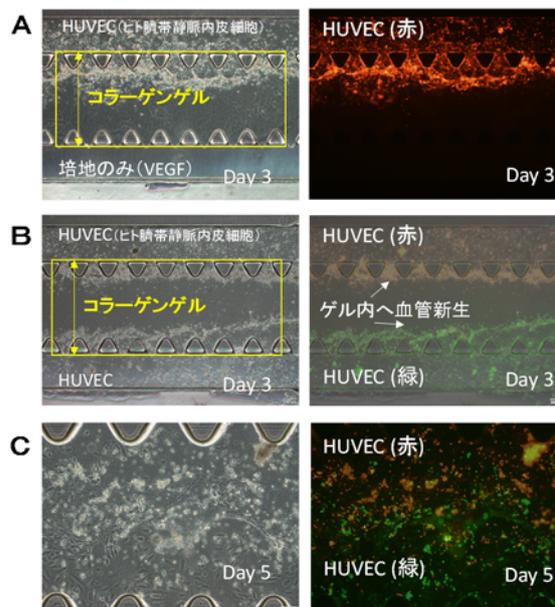


図 5. 3D 血管モデルと血管新生

#### 8) ヒト顆粒膜細胞と 3D 血管モデル

ヒト顆粒膜細胞癌細胞株（KGN）モデルの作製およびその評価を行った。作製した KGN モノレイヤーは、マトリックス中を浸潤し、培養 4 日後には異なるチャンネルまで到達した。続いて、KGN 細胞との 3D 血管モデル（HUVEC）を作製した。本評価系では、HUVEC と KGN 細胞とのパラクライン効果が期待できるため、異なるチャンネル間（HUVEC と KGN）での細胞の分布や挙動と、異なる細胞間の関係性について検証することができた。現在、3D 血管モデルと「顆粒膜細胞」との関係性について、ヒト検体による検証とそのメカニズムの解明に取り組んでいる。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を行なった。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。

女性の生理機能に影響を与える男性由来タンパク質および脂質の探索と作用機序の解明（宮戸健二 受付番号 821）