

マウス加齢卵におけるテロメア長の解析

山田(福永) 朝子, 浜谷 敏生, 山田 満稔, 久慈 直昭, 吉村 泰典

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

はじめに

ヒト女性の妊孕性は30歳代半ばで急激に低下することが知られている。この原因は、残存卵子数の減少や、子宮内膜着床能の低下なども考えられるが、卵の質の低下が主要な要因と考えられる [1]。たとえ生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology: ART) を行ったとしても加齢による妊孕性の低下を避けることはできないが、若年健康女性から提供されたドナー卵を用いて体外受精—胚移植を行った場合は、年齢に関係なく高い出産率が得られることが分かっている [2]。この事実は、母体の加齢に伴い卵細胞そのものが加齢することを示しているが、加齢による卵の質的な低下の背景にある分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。そこで母体加齢と排卵後加齢というふたつのモデルを用いて、卵子の加齢変化に関してテロメラーゼ活性とテロメア長、ミトコンドリアと酸化ストレスに焦点を置き解析することとした。

背景

1. 卵子における2つの加齢—母体加齢と排卵後加齢—

卵の加齢には「母体加齢 (maternal aging)」と「排卵後の加齢 (post ovulatory aging)」がある。いずれの卵の加齢においても、胚発育が悪化し母体の妊孕能は低下する。母体加齢は母体年齢の加齢に伴うものと定義され、「reproductive aging」や「排卵前の加齢」と言われることもある。一方、排卵後加齢は排卵後の卵が受精せずに卵管内 (*in vivo*)、または体外 (*in vitro*) で一定時間経過した状態と定義され [3]、排卵後一定期間経過すると受精率および妊娠率が急激に低下することが知られている [4–6]。临床上、前者は人工授精が遅れた場合に、後者は体外受精で精子侵入が認められず遅れて顕微受精をする場合などに考えねばならない問題である。

しかし、いずれの卵においても加齢の背景にある分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。

2. *Tert* とテロメア

テロメアは染色体末端にある TTAGGG 配列の繰り返し構造で、染色体の末端を DNA 分解や染色体同士の融合から守っている。テロメラーゼは、テロメアの伸長、維持に関わる逆転写酵素であり、*Terc* と呼ばれる鋳型 RNA と逆転写酵素活性を有する *Tert* タンパクを内在する。体細胞においてはテロメラーゼ活性は非常に低いため、テロメアは細胞分裂を繰り返すことにより短縮し、やがて Hayflick limit に達するとアポトーシスを起こす [7, 8]。一方で、卵は第1減数分裂の前期 (ディプロトン期) で長期間休止しているため、テロメアは短縮しないと考えられてきた。しかし、若齢マウス由来および加齢マウス由来の卵を比較した網羅的発現解析の結果では母体加齢卵において *Tert* の発現低下が示唆され [9]、また、ヒト卵でもテロメアには長短があり着床前期胚におけるフラグメンテーションの出現に関連があることが報告されている [10]。そこで、卵における TERT タンパクの発現、テロメラーゼ活性、テロメア長が、母体加齢および排卵後加齢によりどのように変化するかについて解析した。

3. 酸化ストレスとミトコンドリア機能低下

体細胞において加齢は酸化ストレスを増大させる重要なリスク因子であり、卵巣の加齢においても酸化ストレスの関与が想定されている。活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の多くがミトコンドリアで産生され、細胞損傷やアポトーシスに関与する [11] だけでなく、ミトコンドリア・ゲノムを損傷しミトコンドリア機能を低下させ、さらに酸化ストレスを増大させ、細胞老化を引き起こすと考えられている [12]。また、マウスの卵を過酸化水素に暴露して人為的に酸化ストレスを加えると、その後の胚発生が障害されたとする報告 [13] や、アポトーシスの指標となる胚のフラグメンテーションが増加する [14] という報告もあり、卵の加齢にミトコンドリア機能低下や酸化ストレスが重要な働きをして

連絡先: 浜谷敏生, 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
〒160-0016 東京都新宿区信濃町35
TEL: 03-5363-3819
FAX: 03-3226-1667
E-mail: toshiohamatani@z3.keio.jp

いることが示唆される。われわれが以前に行った若齢卵と母体加齢卵を比較したマイクロアレイの解析の結果においても、母体加齢卵ではミトコンドリア機能および酸化ストレス、DNAメチル化、染色体の安定性に関わる遺伝子群の発現が低下していた [9]。

一方、排卵後の卵の加齢では、酸化ストレスの増加によるミトコンドリア機能障害と細胞内 Ca^{2+} 制御機構の変化が胚発育悪化の重要な要因となっている可能性が示唆されている。Takahashiらは、新鮮卵と比較して、*in vivo*・*in vitro* 排卵後加齢卵はいずれにおいても、酸化ストレスの増加、ミトコンドリアの機能低下およびATP産生の低下が認められ、これらの卵を受精させるとCaオシレーション波形が変化しており、胚発育が悪化すると述べている [3, 15, 16]。そこで母体加齢卵および排卵後加齢卵における酸化ストレス (ROS濃度) について検討を行った。

材料・方法

1. 若齢マウス未受精卵および母体加齢卵の採取と排卵後加齢卵の作成

6～8週齢のC57BL/6J系統のマウス(若齢マウス)および42～48週齢のマウス(生殖年齢末期、母体加齢マウス)に妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG; pregnant mare serum gonadotropin)を5IU腹腔内投与し、その48時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG; human chorionic gonadotropin)を5IU腹腔内投与して過排卵刺激を行った。未受精卵の採取は標準プロトコールに従った [17]。hCG投与14時間後(排卵直後)に採卵し、得られた卵をそれぞれ若齢卵および母体加齢卵とした。また、排卵後加齢卵については、6～8週齢の若齢マウスに過排卵刺激を行い、hCG投与して14時間後に採卵したのちに、37℃、5% CO_2 で9時間培養した卵を*in vitro* 排卵後加齢卵とし、hCG投与後23時間後(排卵後9時間)に採卵した卵を*in vivo* 排卵後加齢卵とした。

2. 定量的リアルタイムPCRによる *Tert* 遺伝子の mRNA レベルの発現解析

Tert に対して定量的リアルタイムPCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; qPCR) により mRNA レベルでの発現解析を行った。別々のマウスより採卵したうち形態良好な卵10個を選んで1つのサンプルとし、各群について5つ以上のプールを作成した。PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus) を用いてサンプルより mRNA を抽出し、cDNA を合成した。合

成した cDNA は SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo) および ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) に供し、qPCR による *Tert* 遺伝子の発現解析を行った。*Gapdh* を内部コントロールとして対照に用いた。

3. 免疫組織染色による *Tert* 遺伝子のタンパクレベルの発現解析

検体を4%パラホルムアルデヒドにて固定した後、0.5% Tritonに調整したリン酸緩衝整理食塩水(PBS)にて透過処置を行い、5%ウシ胎児血清を含むPBSにてブロッキングを行った後、抗TERT抗体にて抗原標識した。さらに蛍光色素標識した2次抗体を用い、抗原を可視化した。核は4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4. テロメラーゼ活性の解析

Telomerase PCR ELISA kit (Roche Diagnostics) を用いて、PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay により *in vitro* でテロメア伸長反応を行い、ELISA法にてテロメラーゼ酵素活性を測定した。

5. 酸化ストレスの解析

若齢卵、母体加齢卵および排卵後加齢卵における酸化ストレスを測定するために、細胞透過性があり、活性酸素によって酸化されることで蛍光色素を発する dihydroethidium (HET) を 50 μM 添加した M2 培地 (EmbryoMax M2 Medium Powdered with phenol red; Millipore) 中で 37℃、5% CO_2 で 15 分間培養し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

6. テロメア長の解析

20～40個のマウス卵を1つのサンプルとして QIAmp DNA micro Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出し、qPCR を用いてテロメア長を計測した。内部コントロールとしてシングルコピー遺伝子である 36B4 を対照に用いた。

さらに個々の卵子におけるテロメア長を計測するため、QFISH (Quantitative Fluorescent in situ hybridization) 法を行った。卵の染色体をスライドガラス上に展開し、Peptide Nucleic Acid (PNA) probe (Telomere PNA FISH kit/Cy3, DAKO, Glostrup, Denmark) をテロメア領域にハイブリダイズし、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

表1 テロメラーゼの発現・活性およびテロメア長の解析結果

	Tert RNA (qRT-PCR)	TERT タンパク (免疫染色)	テロメラーゼ活性 (TRAP)	テロメア長 (qPCR)	テロメア長 (qFISH)
母体加齢卵	↓	↓	↓	↓	↓
<i>in vivo</i> 排卵後加齢卵	↓	→	→	→	→
<i>in vitro</i> 排卵後加齢卵	↓	→	→	→	→

↓ 有意に低下
→ 有意な変化なし

結 果 (表1)

1. *Tert* の発現およびテロメラーゼ活性の比較

若齢マウス卵と母体加齢卵および排卵後加齢卵における *Tert* の mRNA 発現量を qPCR にて観察した。母体加齢卵における *Tert* の mRNA 発現 (0.52 ± 0.12) は若齢マウス卵 (1.00 ± 0.13) に比較して有意に減少し ($P < 0.05$)、マイクロアレイの結果とほぼ一致した。また、排卵後加齢卵における *Tert* の mRNA 発現は、*in vivo* (0.28 ± 0.23) および *in vitro* (0.22 ± 0.05) で新鮮卵と比較して有意に減少した ($P < 0.05$)。

次に抗 TERT 抗体を用いた免疫染色を行い、TERT タンパクの発現レベルおよび局在を観察した。TERT タンパクは、若齢卵では細胞膜近傍に強い局在を認めたが、母体加齢卵では TERT タンパクの発現自体が著明に低下し、斑状に欠損するなどの不規則なパターンを示した。一方で排卵後加齢卵では、若齢卵と比較して明らかな蛍光強度の減少は観察されなかったが、母体加齢卵と同様に斑状欠損が認められた (図1)。

TRAP 法により、テロメラーゼ酵素活性を測定した。テロメラーゼ酵素活性は若齢卵 (1.00 ± 0.24) と比較して母体加齢卵 (0.45 ± 0.09) では有意に低下した ($P < 0.05$)。一方で、排卵後加齢卵 (*in vivo* = 0.57 ± 0.04 , *in vitro* = 0.77 ± 0.23) では有意なテロメラーゼ酵素活性低下はみられなかった (N.S.)。

2. 酸化ストレスの比較

若齢卵、母体加齢卵、排卵後加齢卵の酸化ストレスを測定した。結果、若齢卵では、蛍光色素を示さなかった (0/48) が、母体加齢卵では $30.4 \pm 2.4\%$ (21/67)、排卵後加齢卵では *in vivo* 加齢卵で $83.1 \pm 19.0\%$ (49/59)、*in vitro* 加齢卵では $95.7 \pm 7.5\%$ (57/59) と有意に増加した ($P < 0.05$)。

3. テロメア長の比較

20~40個のマウス卵を1サンプルとしてゲノム DNA を抽出し、それぞれ3サンプルについて qPCR を用いて

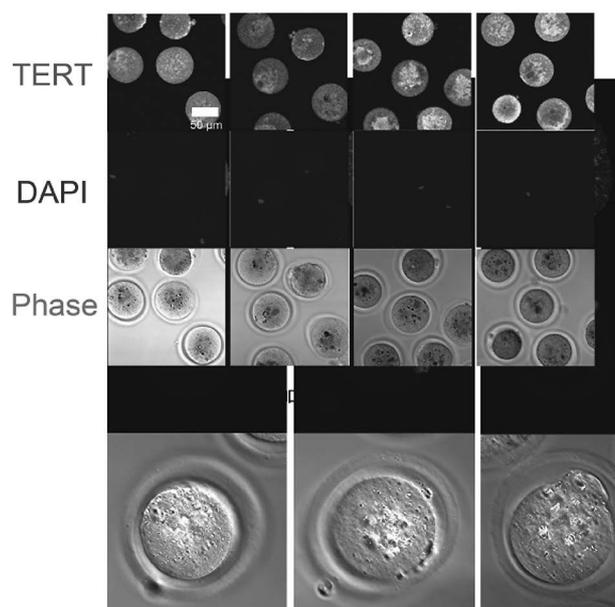


図1

平均テロメア長を計測した。結果、加齢マウス卵のテロメア長 (0.52 ± 0.17) は若齢卵 (1.00 ± 0.28) に比べて有意に短縮していた ($P < 0.05$)。一方排卵後加齢卵のテロメア長は *in vivo* (1.13 ± 0.46) および *in vitro* (1.06 ± 0.37) であり、若齢卵と比較して有意な変化を認めなかった。

さらに、個々のレベルで卵子のテロメア長の計測するため、QFISH 法を行った。結果、平均の蛍光強度は若齢卵 (14,433) と比較して母体加齢卵 (7,579) で減少傾向を示しており、一方で排卵後加齢卵 (*in vivo* = 12,407, *in vitro* = 11,791) では若齢卵と比較してほぼ同様の蛍光強度を示した。

考 察

1. テロメア長短縮と卵の質的な低下

加齢によるテロメア長の短縮が卵子の質の低下に寄与するかどうかは、未だ議論があるところである。これまで極体生検および分割期胚の割球生検の結果、異数性の

あるヒト卵ではテロメア長が短縮しているという報告 [18] や、フラグメンテーションを示す初期胚でテロメア長が短縮していた [10] という報告があるものの、テロメア長が短い卵子は発生能に劣るという直接的なエビデンスは未だ提示されていない。今回のわれわれの結果から、母体加齢卵では若齢卵に比較してテロメア長が短縮することが明らかとなった。この結果は母体加齢により卵でのテロメア長短縮が引き起こされ、結果的に減数分裂過程における染色体の不分離につながり、ひいては妊孕性の低下につながる可能性が示唆される。一方で、排卵後加齢卵においてはテロメア長の短縮は認められなかった。このことから、排卵後加齢卵ではテロメア長によらない別のメカニズムで質的な低下が起こっていることが示唆された。

2. テロメラーゼ酵素活性の低下

加齢による卵子異数性染色体異常率の上昇を説明する仮説として、two hit theory が知られている。哺乳類の胎児期のすべての卵母細胞は第1減数分裂の前期後半(ディプロテン期)で休止するが、そのディプロテン期以前に相同染色体間にキアズマが形成され染色体の組み替えが起こる。胎児期にキアズマの形成不全による染色体の組み替え効率の低下が起こってより不分離が起きやすい状況が存在する (first hit)。若齢卵子では染色体分離機構が十分に機能するが、second hit として加齢卵子では第1減数分裂中期の段階で染色体分離機構が十分に働かず、微小管のキネトコアの結合不全や張力の不均衡などを引き起こし染色体不分離を招くとされている [19]。テロメラーゼは、生殖細胞においてテロメア長の伸張に関わるのみならず減数分裂時の染色体の組み替えや染色体接合維持、分離機構に重要な役割を果たしていることが知られており [20]、第1減数分裂前期で長く停止していることに加えて排卵シグナルを受けて減数分裂を再開した際にテロメラーゼによる防御機構が十分働かず、母体加齢卵における染色体の異数性をはじめとしたさらなる質的な低下を招いているのかもしれない。一方排卵後加齢卵子は第1減数分裂をすでに終了して第2減数分裂中期の状態に加齢が進んでおり、この間テロメラーゼ酵素活性に有意な変化を認めなかったことから、テロメア長や染色体不分離などは異なるメカニズムで卵の発生能低下が起こっている可能性がある。

3. テロメア短縮のメカニズム

母体加齢卵におけるテロメア長短縮のメカニズムは次の3種類が考えられる。

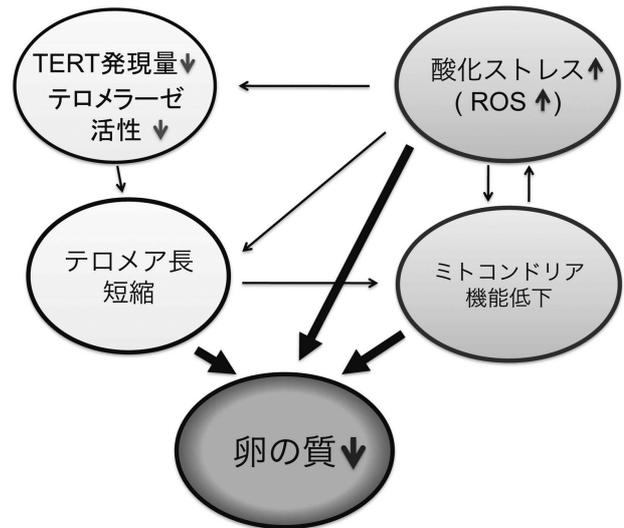


図2

1) 細胞分裂によるテロメア長の短縮 [21].

これまで卵の形成過程において、卵母細胞はほとんど分裂しないで第1減数分裂前期で停止していると考えられてきた。しかし近年 Oogonial Stem Cell (OSCs) の存在が報告され [22]、出生後あらたに卵原細胞から体細胞分裂により生じる卵の存在の可能性が示唆されている。この場合は体細胞分裂に依存して母体加齢卵におけるテロメア長の短縮が引き起こされると予想される。今後のさらなる報告が待たれるところである。

2) テロメラーゼ活性の低下

テロメラーゼ欠損マウスでは世代を経るごとに、卵のテロメア長が wild type に比較して短縮する [23] ことが報告されており、テロメラーゼ活性の低下がテロメア長の短縮に寄与していることが考えられた。さらに、テロメラーゼ欠損マウスでは、wild type に比較して、卵のテロメア長短縮を認めるのみならず [24]、紡錘体の形態異常が多く観察される [23] ことも報告されており、加齢に伴う染色体異常の増加と関与していることが示唆された。

3) 活性酸素

体細胞においては、活性酸素による直接的な DNA 損傷によって、テロメア長が短縮することがこれまでに報告されている [25]。卵巣では、抗酸化物質を摂取し続けたマウスでは、摂取しなかったマウスに比較して卵巣のテロメラーゼ活性が高く、また卵巣のテロメア長も長かった [26] という報告がある。また、ミトコンドリアの機能を低下させることで酸化ストレスを与えられたマウスの胚は、フラグメンテーションが多く、テロメア長も短縮した [27] と報告されている。しかしながら、今

回われわれの研究結果では、酸化ストレスが多かった排卵後加齢卵のテロメア長は短縮していなかったことから、短期間の酸化ストレスのみではテロメア長の短縮メカニズムを説明できない。一方、母体加齢マウスでは排卵にいたるまでの期間が長くなり、加齢によって卵におけるテロメラーゼ活性が低下し、加えて酸化ストレスの長期間の蓄積も加わることで、テロメアを維持できずに短縮する可能性が考えられた(図2)。

おわりに

卵形成過程では卵母細胞はほとんど分裂をしないにもかかわらず、卵は母体加齢によってテロメア長が短くなることが明らかとなった。母体加齢による *Tert* の発現およびテロメラーゼ活性の低下がテロメア長の短縮に寄与することで、卵の質的低下に関与している可能性が示唆された。一方で排卵後加齢卵ではテロメア長は変わらず、別の機序による質的低下が起こっていることが考えられた。

引用文献

1. 浜谷 敏生 (2008) 卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用 遺伝子発現プロファイリングによる卵の加齢機構の探索. 日産婦会誌 60, 1798-1812.
2. Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, et al (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 337, 1375-1377.
3. 高橋俊文, 石田博美, 倉智博久 (2012) 酸化ストレス 酸化ストレスと卵の加齢. *HORM FRONT GYNECOL* 19, 149-155.
4. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H (2009) Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 15, 573-585.
5. Tarín JJ (1996) Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 2, 717-724.
6. Ono T, Mizutani E, Li C, Yamagata K, Wakayama T (2011) Offspring from intracytoplasmic sperm injection of aged mouse oocytes treated with caffeine or MG132. *Genesis* 49, 460-471.
7. Hayflick L (1965) THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
8. Blackburn EH (2000) Telomere states and cell fates. *Nature* 408, 53-56.
9. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, et al (2004) Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 13, 2263-2278.
10. Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, et al (2005) Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women—toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol* 192, 1256-1260; discussion 1260-1251.
11. Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS (1998) Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci* 854, 155-170.
12. Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
13. Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL (2000) Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 62, 1745-1753.
14. Martino NA, Lacalandra GM, Filioli Uranio M, Ambruosi B, Caira M, Silvestre F, et al (2012) Oocyte mitochondrial bioenergy potential and oxidative stress: within-/between-subject, in vivo versus in vitro maturation, and age-related variations in a sheep model. *Fertil Steril* 97, 720-728 e721.
15. Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H (2003) Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev* 66, 143-152.
16. Takahashi T, Igarashi H, Kawagoe J, Amita M, Hara S, Kurachi H (2009) Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium homeostasis. *Biol Reprod* 80, 493-502.
17. Nagy A GM, Vintersten K, Behringer R (2003) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 178-182.
18. Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT Jr. (2011) Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet* 7, e1002161.
19. Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, et al (1996) Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 14, 400-405.
20. Chalmel F, Lardenois A, Primig M (2007) Toward understanding the core meiotic transcriptome in mammals and its implications for somatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1120, 1-15.
21. Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661-673.
22. Bukovsky A, Caudle MR (2012) Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause in vivo, vs. neo-oogenesis in vitro, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol* 10, 97.
23. Liu L, Blasco MA, Keefe DL (2002) Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep* 3, 230-234.
24. Liu L, Bailey SM, Okuka M, Munoz P, Li C, Zhou L, et al (2007) Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 9, 1436-1441. Epub 2007 Nov 1434.
25. von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27, 339-344.
26. Liu J, Liu M, Ye X, Liu K, Huang J, Wang L, et al (2012) Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-

L-cysteine (NAC). Hum Reprod 27, 1411-1420.
27. Liu L, Trimarchi JR, Smith PJ, Keefe DL (2002) Mitochon-

drial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. Aging Cell 1, 40-46.