

# 早発閉経の卵胞活性化に着目した新規不妊治療法の開発

聖マリアンナ医科大学 産婦人科  
河村 和弘

## 1. はじめに

緒言: 早発閉経は40歳未満の女性で卵巣性の無月経を呈する場合に診断され、卵巣内に発育した卵胞が認められない疾患である。卵巣機能は廃絶し排卵がおこらず不妊となるが、自らの卵子を用いた妊娠は不可能に近く、妊娠を切望する患者はドナー卵子を求めて海外に渡っている。卵巣には卵子の源となる原始卵胞が多数存在する。この原始卵胞のほとんどは休眠状態にあり、そのうちのごく僅かが月経毎に活性化されて発育卵胞となり卵子が排卵される。早発閉経患者の卵巣内の原始卵胞は著しく減少しており、自発的な活性化が認められないか、活性化しても発育が停止しており、発育卵胞が存在しない。最近我々は、マウスおよびヒトの原始卵胞においてPTEN(phosphatase and TENsin homolog)阻害剤とPI3K (phosphatidylinositol-3 kinase)活性化剤を用いた休眠原始卵胞の人為的活性化に初めて成功した(参考論文1)。その後の研究で、本法は発育が停止している卵胞の発育再開にも効果があることが明らかとなった。

目的: 本研究では、この卵胞活性化技術をヒトにおいて確立・臨床応用し、早発閉経の不妊患者の卵巣に僅かに残存している卵胞を活性化し発育卵胞へと成長させることで、卵巣の性ホルモン産生機能および卵子形成能を再生させ、自らの卵子で妊娠可能とする新たな不妊治療法の開発を目的とした。

背景: 早発閉経の原因は不明のものも含め多岐にわたるが、共通の病態として卵巣内の残存卵胞の急激な減少がおこる。その結果、残存原始卵胞が閉経期レベルまで減少し、ある限界値まで到達すると原始卵胞の活性化(initiation)がおこらなくなり、卵胞のリクルートが停止して発育卵胞が消失する。そのため排卵がおこらず、非常に難治性の不妊となる。最も有効な治療法は提供卵子(ドナー卵子)であるが、本邦では無償提供の原則と比較的リスクの発生する卵巣刺激～採卵を受ける必要があるため、卵子提供者は非常に少ない。一方、POIは全女性の100人に1人に自然発生することから、全てのPOI患者が挙児を希望しないまでも、我が国では明らかに提供卵子は不足している。現状として、多くの患者は東南アジアやアメリカなどに渡り、提供卵子による治療を受けている。今後は我が国の晩婚化の傾向により、これまでではPOIを発症する前に妊娠出産を済ませてきたため不妊とならなかった女性達が、POIが顕在化して不妊治療を望む件数が増加すると推測される。

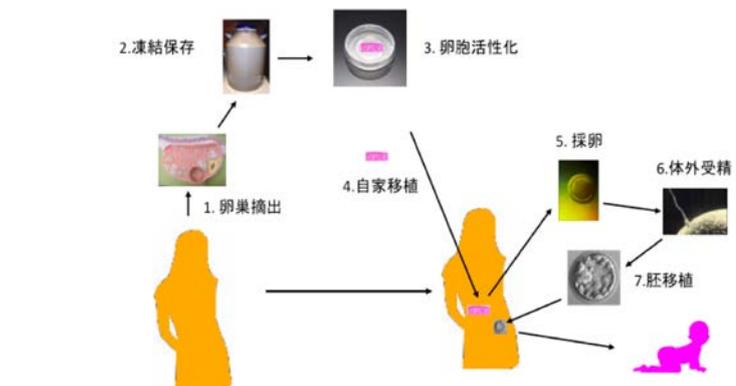
序論: 我々の卵胞活性化のトランスレーショナルリサーチは既に臨床応用段階に到達しているが、本研究ではその成績をより向上させ、新規治療法として確立することを目標とする。本法の確立はこれまで不可能であった早発閉経患者が自らの卵子で妊娠が可能となる技術的break throughとなることが期待される。この治療法は加齢により卵巣機能が低下し、卵胞が減少している閉経期前後の患者にも適応できると考えられる。

## 2. 方法

本法の臨床応用の概要を右図に示す。臨床応用に関しては、動物実験により安全性を確認し、学内および日本産婦人科学会の倫理委員会より承認されている。

本研究計画では、以下の項目について研究を行った。

1. ヒト卵胞活性化法の改善 我々は断片化したヒト卵巣に対してPTEN阻害剤とPI3K活性化剤によ



る体外培養を行なって卵胞を活性化した後、重症免疫不全マウスの腎被膜下に異種移植し、卵胞発育を促す卵胞刺激ホルモン(follicular stimulating hormone; FSH)を投与して移植した卵巣から多数のヒト成熟卵子を得ることに成功している。より効率の良い卵胞活性化法を開発するため、原法で用いたPTEN阻害剤およびPI3K活性化剤とそれらの使用濃度・期間について検討を行い、至適培養条件をこの異種移植モデルを用いて決定した。

2. 卵巣自己移植法の改善 卵巣自己移植に適した部位は、血管新生に最適でかつ卵胞発育をモニターするための超音波検査が施行しやすく、採卵を行いやすい必要がある。我々は移植部位として卵管漿膜下を選択し良好な結果を得たが、卵管切除後、炎症による癒着、卵管留水腫などにより他部位に移植する必要がある症例も存在する。そこで、卵管漿膜下以外の候補部位について検討した。また、移植卵巣の生存性を向上し、移植部位の血管新生を促進する種々の因子を同定して、移植部位に隣接した部位に適量注入して卵巣断片の生着率を高める方法を検討した。

3. 初期卵胞発育促進法の開発 卵胞発育を促進するためにFSH製剤が広く使用されているが、FSHの感受性は比較的発育した胞状卵胞より認められ、初期の卵胞発育に関してはいくつかの成長因子の関与が報告されているものの、不明な点が多い。そこで、各発育段階のヒト初期卵胞をレーザーマイクロダイセクションにて採取し、DNAマイクロアレイに供して卵胞に発現しているホルモン、成長因子とそれらの受容体の発現量および発現変化を手がかりに各発育段階の卵胞に必要な候補因子の選定を試みた。候補因子の作用についてマウスおよびヒト卵巣組織培養と初期卵胞のみで卵巣が構成されている新生児マウスへのin vivo投与により検討した。

4. 胚移植法の改善 対象患者は低エストロゲンのため子宮の胚着床能が損なわれている。従って、ホルモン投与により胚着床に適した子宮内膜環境を構築する必要があり、患者の性ホルモンの基礎値と反応性に応じた胚移植前の性ホルモン投与法の確立を試みた。さらに、我々が新規に同定した胚発育および着床促進因子と既報の因子を胚移植用培養液に添加してその効果を動物実験で検証し、ヒトへの応用を検討した。

### 3. 結果

#### ヒト卵胞活性化法の改善

より効率の良いヒト卵胞活性化法を開発するため、原法で用いたPTEN阻害剤およびPI3K活性化剤とそれらの使用濃度・期間を調べた。摘出ヒト卵巣皮質を1-2 mm大に小断片化し、種々の濃度のPTEN阻害剤およびPI3K活性化剤を用いて組織培養を行い、重症免疫不全マウスの腎被膜下に異種移植して、その後の発育卵胞数ならびに成熟卵子獲得数を比較することで、至適培養条件を決定した。最終的に、6-9の小断片をcell culture insert上にのせ、5% CO<sub>2</sub>, 37 ° C のインキュベータ内で、基礎培地としてDMEM/F12 medium+10% HAS+0.05 mg/mL ascorbic acid+1% antibiotic/antimycotic solution+0.3 IU/mL FSHを用い、そこにPTEN阻害剤であるbpV (hopic) (30 μM)およびPI3K活性化剤である740YP (150 μg/mL)を添加した培養液で24時間培養した。その後bpV (hopic) (30 μM)のみを除いた培養液下でさらに24時間培養する培養条件が最適であることを見出した(発表論文1)。

#### 卵巣自己移植法の改善

卵管漿膜下以外の候補部位について、卵巣採取後の残存卵巣、後腹膜下、皮下を検討した。早発閉経患者の卵巣は血流が悪く、移植後の卵巣組織断片の正着と引き続く血管新生に適していないと考えられた。後腹膜は、血流は卵巣よりは良いが、場所によっては採卵が困難である。皮下は、移植操作が容易であるが、血流、温度、圧力などニッチとして腹腔内に比べ条件がかなり異なる。動物実験により、移植部位として後腹膜、皮下を検討したが、卵管に比べ良好な結果は得られなかった。

もう一つのアプローチとして、移植卵巣の生存性を向上し、移植部位の血管新生を促進する種々の因子を用いて卵巣断片の生着率を高める方法を検討した。現在、候補因子を同定し、それらの因子を用いて最適な条件を決定すべく実験を進めている。

#### 初期卵胞発育促進法の開発

各発育段階の初期卵胞発育に必要な因子の同定を、DNAマイクロアレイを用いた網羅的検索により行った。複数の候補因子が同定され、そのうち1次卵胞の発育を促進するものとして、R-spondin2、2次卵胞の発育を促進するものとしてC-type natriuretic peptide (CNP)を見出した。R-spondin2は1次卵胞以降の卵子で産生され、卵胞体細胞である顆粒膜細胞由来のWnt3aと共役して顆粒膜細胞に発現しているFrizzled受容体に作用して卵胞発育を促進した。マウスではin vitroおよびin vivoの実験において、

R-spondin2処理により発育卵胞数が増加し、最終的に排卵数が増加した。R-spondin2処理により排卵された卵子の成熟度、胚発育率は非処理区と同等であり、正常な機能を有した卵子が得られ、体外受精胚移植により正常な産仔をえた。この効果はヒト卵巣においても確認された。一方、CNPは顆粒膜細胞で産生され、その受容体であるNPRBを発現する顆粒膜細胞にオートクライン経路で作用し、cGMPの産生を誘導することで2次卵胞の発育を促進した。R-spondin2同様、CNPの作用はin vivoでも認められ、マウスでは正常な成熟卵子の排卵数が増加し、体外受精胚移植にて正常な産仔が得られた。他の因子については現在解析を進めている。

**胚移植法の改善** 我々は、早発閉経患者に適した胚移植前の性ホルモン投与法を、エストロゲン貼付剤、プロゲステロン坐薬および内服薬・注射剤を組み合わせる最適な方法を確立した(発表論文1)。また、着床促進因子を含む培養液によるヒト胚の着床促進効果を確認した。

研究成果: 我々は、本研究結果をもとに、実際に卵胞活性化技術をヒトに臨床応用した。27名(平均年齢 $37.3 \pm 5.8$ 歳、平均無月経期間 $6.8 \pm 2.1$ 年)に対して卵巣摘出を行い、13名で残存卵胞を確認した。移植後1年間の観察期間に8/13名で卵胞が発育し、5/8名で成熟卵子を採卵できた。残存卵胞を認めなかった14名は全て卵胞発育を認めなかった。3名に胚移植を行い、2名が妊娠した。1名は流産となったが、1名は順調に妊娠が経過し、骨盤位のため妊娠37w2dに帝王切開にて3,254gの正常な男児を出産した。児は生後12か月までの経過で特に異常を認めていない(発表論文1)。

#### 4. 考察

我々は、この研究を行っている時にもう一つ重要な知見を得た。卵巣を断片化すると初期卵胞の発育が促進されるという現象である。我々はさらに、この卵巣断片化の分子基盤を解明した。Hippoシグナルは細胞増殖や生存を制御する重要なシグナルであり、細胞同士の接着が障害されると不活性化する。通常はエフェクタータンパクであるYAPはHippoシグナルにより核移行が抑制されているが、組織・細胞が破壊され細胞接着がなくなるとHippoシグナルが抑制され、YAPは核内へ移行し核内転写因子であるTEADと共役してCCN成長因子などの産生を促進し、細胞増殖がおこり組織が修復される。マウスおよびヒトの卵巣におけるHippo関連遺伝子の発現解析では、卵巣顆粒膜細胞には全てのHippo関連遺伝子が発現していた。マウスおよびヒト卵巣を断片化するとHippoシグナルが抑制され、顆粒膜細胞の核内へのYAPの移行と、引き続きCCN成長因子の急増とBIRCアポトーシス抑制因子の発現増加が認められた。CCN成長因子を用いた卵巣組織培養ではCCN成長因子は卵巣断片化と同様の2次卵胞発育促進効果を示した。従って、卵巣断片化によりHippoシグナル経路が抑制され、YAPによる核内転写活性が高まり、成長因子であるCCNファミリーの発現が急増して卵巣顆粒膜細胞が増殖し卵胞発育が促進されると考えられる。卵巣の断片化によるこれらの一連の効果は、YAPとTEADの結合を阻害するverteporfinおよびCCN成長因子の中和抗体により抑制された。我々はさらに、なぜ卵巣の断片化がHippoシグナルを抑制するのかを検討した。我々は、マウス卵巣において、卵巣の断片化は一時的なアクチン重合を引き起こし、Hippoシグナルを抑制することを明らかにした。この卵巣断片化によるHippoシグナルの抑制とPI3K-Aktシグナルの活性化を組み合わせることで、原始卵胞を活性化させ、2次卵胞の発育を誘導することができた(発表論文1)。

まとめ: 我々は卵胞活性化技術を基盤とする新規不妊治療法の開発に成功した。本研究成果は、早発閉経患者が自らの卵子で妊娠できる画期的な方法として注目され、The times, BBC, ABC, CNN, AP通信など国内外の300以上のメディアで報道され、Nature誌などの多くの関連学術雑誌にもNewsとして大きく取り上げられた。さらにTime誌において、2013年の10大medical break throughの1つに選ばれた。現在、本法による治療を希望して国内外の多数の患者が集まっており、今後症例を重ねつつ、更なる安全性を確立していきたい。

#### 5. 発表論文、参考論文

発表論文

1. Kawamura K, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. Proc Natl Acad Sci USA; 2013 110: 17474-9

参考論文

1. Li J and Kawamura K et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 10280-10284