

【トピックス】

卵巣の老化と不妊治療：卵胞活性化療法（IVA: in vitro activation）の開発

河村 和弘

聖マリアンナ医科大学 産婦人科

キーワード：卵巣、卵胞、IVA、PTEN、Hippo

1. はじめに

卵巣の機能は、卵子の産生と生殖に必要なホルモン産生に集約される。老化により、これらの機能は失われるが、卵巣機能の低下は35歳頃より始まり、多くの女性では50歳頃には卵巣機能は廃絶し、閉経を迎える。精巣を含め他臓器と比較して、卵巣は最も早期に老化する臓器の1つと考えられる。

卵巣内には卵子とそれをとり巻く体細胞から構成される卵胞が存在する（図1）。卵巣の老化により、①卵子の質の低下、②残存卵胞数の減少がおこることが知られている。これらの変化は女性の妊孕性を低下させ、加齢による不妊の原因となる。我々は、残存卵胞数減少による不妊に対して、新たな治療法を開発して（卵胞活性化療法、IVA: in vitro activation）臨床応用を開始している。本稿では、卵巣老化による不妊について概説し、病的な卵巣老化である早発卵巣不全とそのIVAによる不妊治療について紹介する [1, 2]。

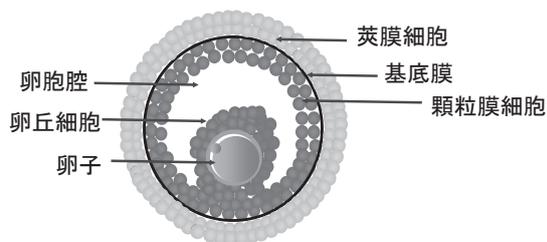


図1 卵胞（胞状卵胞）の構造

2. 卵子の質の低下

加齢による卵子の質の低下が不妊の原因となることは、提供卵子の体外受精胚移植の臨床成績から明らかとなっている [3]。すなわち、若年ドナーからの提供卵子

を受精させて高齢不妊患者に移植すると、若年不妊患者と同等の高い妊娠率が期待できるが、高齢ドナーからの提供卵子を受精させて高齢不妊患者に移植すると、高齢不妊患者と同等の低い妊娠率になってしまう。この結果から、妊娠を規定しているのは卵子であり、受精卵（胚）の着床部位である子宮ではないことが判明した。加齢による卵子の質の低下には卵子内のミトコンドリア機能とそれに伴い発生する活性酸素の細胞毒性が関与していることが示されている [4]。また、加齢卵子では染色体不分離による胚の異数性が増加して妊娠率を低下させ、初期の流産率を増加させることが明らかにされている [5]。

現在のところ、これらの異常を改善する効果的な方法はなく、加齢による卵子の質の低下に対する治療は確立されていない。そのため、若年女性から提供された卵子を用いて夫の精子と体外受精を行い、受精卵（胚）を移植する方法が行われている。また、若年女性から提供された卵子からミトコンドリアを抽出し、高齢患者の卵子に注入してミトコンドリア機能を回復させる試みもなされている [6]。

3. 残存卵胞数の減少

卵胞を構成する体細胞としては顆粒膜細胞、莢膜細胞があり、それぞれエストロゲン、アンドロゲンを産生する。卵胞は卵巣の局所因子および下垂体由来のゴナドトロピンにより発育し、原始卵胞、一次卵胞、前胞状卵胞、胞状卵胞、成熟卵胞（グラフ卵胞）と段階的に発育する（図2） [7, 8]。原始卵胞から排卵前卵胞に至る卵胞発育はゴナドトロピンの依存性により3段階に分類される [9]。

第1段階は、原始卵胞から前胞状卵胞に至るまでであり、この時期はゴナドトロピン（卵胞刺激ホルモン、FSH: follicular stimulating hormone、黄体形成ホルモン、LH: luteinizing hormone）非依存性に卵胞が発育する。出生時までに第一減数分裂前期の複糸期まで進んだ卵母細胞は、原始卵胞の状態で停止し休眠原始卵胞となる。出生後、性周期が確立すると、原始卵胞は性周期に伴い発育を開始し、約1000個/周期の原始卵胞が活性化され発育を開始して1次卵胞となる。多数ある原始卵胞の中から、一部の卵胞が選択され活性化する機構はこれまで解明されていない [10]。

連絡先：〒216-8511

神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

TEL：044-977-8111

FAX：044-977-2944

E-mail：kazuhironanami@gmail.com

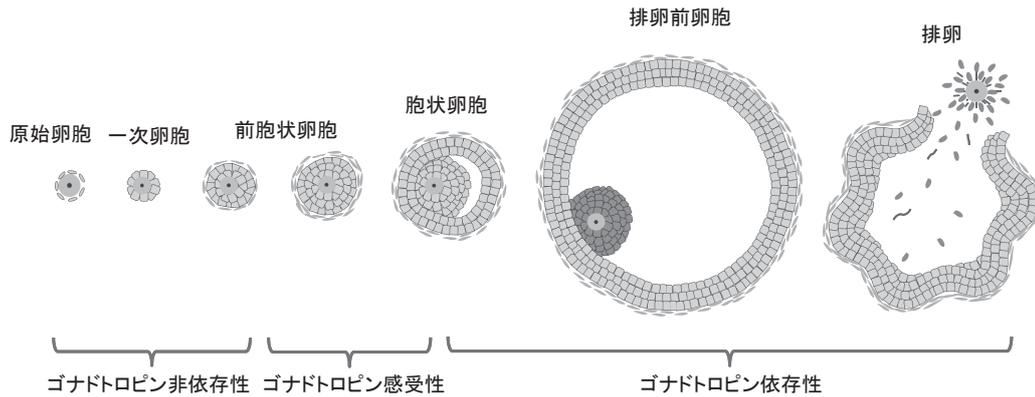


図2 卵胞発育とゴナドトロピン依存性

前胞状卵胞から直径2mmを越える胞状卵胞までは第2段階のゴナドトロピン感受性と呼ばれる時期で、ゴナドトロピンの月経周期変化により影響を受けず、基礎値のゴナドトロピンに依存し発育する。直径2mmを越えた胞状卵胞は、ゴナドトロピン依存性の第3段階に入り、月経周期に伴うゴナドトロピンの上昇により急速に増大し、排卵前卵胞となる。

原始卵胞の数は胎生期にピークとなるが、出生以降に原始卵胞は増加せず、加齢と共に減少していく。思春期の頃には数十万個の原始卵胞が卵巣内に存在しているが、通常は休眠した状態にある。卵巣内の残存原始卵胞の数が約1,000個以下となると、定期的な卵胞の活性化がおこらなくなり、卵胞のリクルートが停止する。その結果、発育した卵胞の顆粒膜細胞より分泌されるエストロゲンが欠乏して更年期症状呈する。また、卵胞が発育しないため、無排卵となり、エストロゲン欠乏による子宮内膜増殖不全をきたし無月経となり閉経する。

4. 卵胞活性化の基礎研究

原始卵胞活性化の分子基盤は不明であったが、最近我々と他のグループは、卵胞活性化にPhosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-Forkhead box O3 (Foxo3) シグナル経路が重要であることを明らかにした [11-13]。卵巣内に保存されている原始卵胞は、phosphatase with TENsin homology deleted in chromosome 10 (PTEN) によりPI3K-Akt経路が抑制され活性化が停止し休眠状態にある。休眠卵胞の一部が未だ不明のメカニズムで選択され、何らかの活性化シグナルが選択された原始卵胞に作用すると、PTENによるPI3K-Akt経路の抑制が解除されるか、またはPTENの抑制作用を上回るPI3K-Aktシグナルの活性化が生じる。Foxo3は細胞核内で細胞周期を停止して原始卵胞が活性化するのを抑制しており、そこにPI3K-Aktのシグナルが伝わるとFoxo3は核外移行し、その機能を失う。その結果、休眠状態にあった原始卵胞が活性化する。

これらの原始卵胞の活性化を制御する分子基盤は、PTENおよびFoxo3遺伝子欠損マウス卵巣の表現型解析 [11, 12]、PTEN抑制剤およびPI3K活性化剤を用いたマウスおよびヒト卵巣の組織培養・卵巣移植を用い

た研究 [13] により明らかにされた。PTEN欠損マウスは胎生致死であるため、卵子特異的なPTEN欠損マウスが作製され、その卵巣内の原始卵胞は自発的に活性化して一斉に卵胞発育が開始する。その結果、卵巣は腫大し多数の発育卵胞が認められる。しかし、卵巣内の原始卵胞プールは早期に枯渇してしまい、通常まだ性周期が認められる16週齢で既に卵胞を認めない卵巣となる [11]。また、Foxo3欠損マウスもPTEN欠損マウスと全く同様の表現型を呈する [12]。

我々はマウス卵巣をPTEN抑制剤およびPI3K活性化剤で一過性に処理することで、PTEN、Foxo3遺伝子欠損マウスと同様に、原始卵胞が活性化することを示した [13]。さらに、良性卵巣腫瘍患者の手術時に得た摘出卵巣の正常部分を用いて卵巣断片を作製し、PTEN抑制剤による一過性処理を行うことで、原始卵胞が活性化されることを示した [13]。PTEN抑制剤およびPI3K活性化剤による卵胞活性化を行ったマウス卵巣を、ドナーマウスの腎皮膜下に移植し、FSH刺激を行って卵胞発育を促進させたところ、排卵前卵胞まで発育し、hCG投与にて成熟した卵子を得ることができた。この成熟卵子を用いて体外受精を行い、胚を偽妊娠マウスに移植したところ、正常な児を得ることに成功した [13]。この卵胞活性化法により得られた成熟卵子は、エピジェネティックな解析により正常な遺伝子刷り込みを有していることが明らかとなり、また紡錘糸を含めた構造上の異常も認められなかった [13]。我々はさらに、上述のヒト卵巣断片に対してPTEN抑制剤による原始卵胞の活性化処理を行い、重症免疫不全マウスの腎皮膜下に移植した。マウスと同様にFSH刺激により卵胞発育を促進させ、原始卵胞が排卵前卵胞まで発育すると考えられる6か月後に移植卵巣を摘出した。組織学的検査の結果、PTEN抑制剤処理を行った卵巣に多数の大きな胞状卵胞を認め、成熟したヒト卵子を得ることに成功した [13]。

5. 早発卵巣不全

早発卵巣不全 (POI; primary ovarian insufficiency) は40歳未満の女性で高ゴナドトロピン性の無月経を呈する場合に診断され、卵巣内に発育卵胞が認められず、卵巣機能は廃絶し排卵がおこらないため不妊となる。

POIの原因は、染色体・遺伝子異常、自己免疫異常、医原性（卵巣手術、化学療法、放射線療法）など原因不明のものも含め多岐にわたるが [14, 15]、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、残存原始卵胞が限界値である約1,000個以下まで減少し、原始卵胞の活性化がほとんどおこらなくなり、卵胞のリクルートが停止して発育卵胞が消失していく。その結果、排卵がおこらず、難治性の不妊となる [10, 16]。

POIの最も有効な治療法は提供卵子を用いた体外受精胚移植であり、自らの卵子で妊娠することは非常に困難である。本邦における卵子提供は無償提供の原則とドナーは度重なる医療機関の受診と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、卵子を提供する若年者は限られている。POIは全女性の100人に1人に自然発生することから [16]、全てのPOI患者が挙児を希望しないまでも、現状では、明らかに国内での提供卵子は不足している。さらに、これまでPOIを発症する以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、昨今の晩婚化によりPOIが発症してから不妊治療を望むケースが増加してきている。このような状況の中、提供卵子を希望する患者の多くは東南アジアやアメリカなどに渡り治療を受けている。

POIの患者が自らの卵子で妊娠するためには、卵子産生の再生が必要である。最も究極な方法としては、体細胞よりiPS (induced pluripotent stem cell) 細胞などの万能細胞を作製し、始原生殖細胞に分化させて卵子を作り出す方法が考えられる。実際、マウスではiPS細胞から卵子を作成して体外受精により児を産出することに成功している [17, 18]。またヒトでは、卵巣皮質より卵子幹細胞を回収し、重症免疫不全マウスに移植して卵子を作成したという報告もある [19]。しかし、これらの方により作成された卵子を臨床で用いるには、安全性の確立のため多くの生物学的な検証が必要である。また、倫理的にも十分な議論が必要である。

6. 卵胞活性化療法 (IVA: in vitro activation) の開発

POI患者が自らの卵子で妊娠を望む場合、これまで種々のホルモン療法や排卵誘発などが行われてきたが、その効果は限定的であり、新たな治療法の開発が待たれていた。我々はPTEN抑制剤およびPI3K活性化剤を用いた原始卵胞活性化法の安全性を動物実験にて十分確認した後、この技術を臨床応用してPOI患者が自らの卵子で妊娠できる不妊治療を、倫理委員会の承認と患者の同意の下に行った（卵胞活性化療法、IVA: in vitro activation、図3）[1]。本法の安全性に関してはスウェーデンのグループも追試により確認している [20]。

IVAでは、はじめに腹腔鏡下に卵巣摘出を行う。患者への侵襲を下げ、次の卵巣移植手術に備えて術後の腹腔内癒着を最小限にするため、腹腔鏡下での手術を施行している。その後、卵胞が局在している皮質部分のみとするため、摘出した卵巣から髓質を除去する。卵巣皮質を1cm大の断片として各断片の約10%の体積の卵巣組織を固定して薄切標本とし、組織学的検索を行って残存卵胞の有無を確認する。必要に応じて卵巣を凍結保存を行う。次に、1cm大の卵巣断片を1-2mm大の小断片に細切し、PTEN抑制剤およびPI3K活性化剤を用いて組織培養を48時間行う。培養終了後、これらの薬剤が体内に入らないよう卵巣組織を十分に洗浄し、腹腔鏡下に卵巣移植を行う。卵巣小断片を移植する部位として、血流が豊富で移植組織の正着に適しており、経膈超音波により観察しやすく、通常の体外受精における採卵手技で対応可能な卵管漿膜下を選択している。卵巣移植後は、ホルモン検査（LH, FSH, エストロゲン）および経膈超音波検査を行い、卵胞発育を定期的に調べる。発育卵胞を認めた際には、通常の体外受精と同様の方法で採卵、受精させる。POI患者では長期間の低エストロゲン状態により、胚の着床に重要な子宮の環境が良くないことが多いため、胚を一旦凍結保存する。消退出血を発生させた後、ホルモン補充周期下に凍結融解胚移植を行う。

IVAによる世界初の児の出生を報告した時点での成

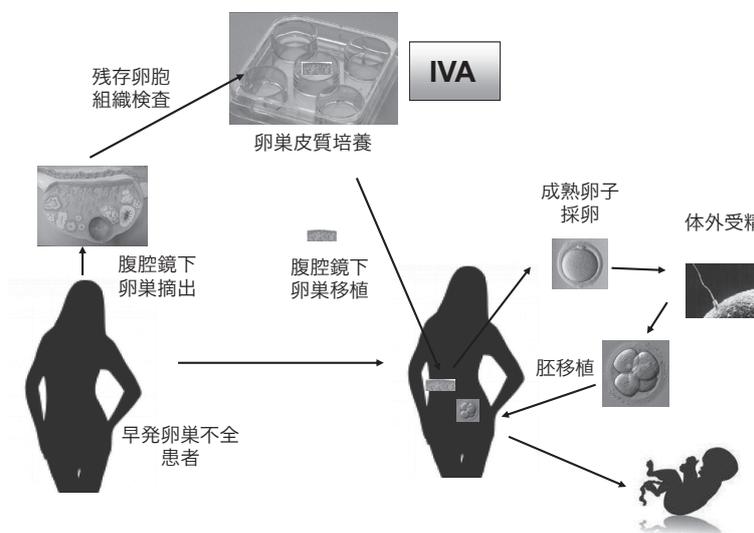


図3 卵胞活性化療法 (IVA) の概略

績を以下に示す。POI患者27名(平均年齢 37.3 ± 5.8 歳、平均無月経期間 6.8 ± 2.1 年)に卵巣摘出を行い、組織学的検査により13名で残存卵胞を認めた。卵巣移植後8名に卵胞が発育し、5名で成熟卵子を採卵することができた。組織学的検査にて残存卵胞が確認できなかった14名に対してもIVAを施行したが、全ての症例において1年間の観察期間中に卵胞発育を認めなかった。成熟卵子を採卵できた5名のうち3名に対して凍結融解胚移植を行い、2名が妊娠した。1名は妊娠初期に流産となったが、1名は順調に妊娠が経過し、骨盤位のため妊娠37週2日に帝王切開を施行して3,254gの正常な男児を出産した [1]。

7. 卵巣断片化と Hippo シグナル抑制による 2次卵胞発育誘導

ヒトでは原始卵胞が排卵前卵胞まで発育するには6ヶ月の期間を必要とするため [1, 9]、IVAの臨床研究において卵巣移植後の排卵前卵胞の出現は6ヶ月を経過してから認められると予測していた。しかし、移植後1ヶ月以内に排卵前卵胞まで卵胞が発育した症例が複数認められた。この現象は、原始卵胞のみならず残存していた2次卵胞がIVAにより発育したためと考えられ、その分子機構の解明を行った。

我々は、IVAによる2次卵胞発育の分子基盤として Hippo シグナルに着目した。Hippo シグナルは細胞の増殖や生存を制御することで臓器を適切な大きさに規定する重要な細胞内シグナルである。細胞同士の接着の障害や細胞骨格の変化により不活性化することが示されている [21-23]。Hippo 関連分子である Yes-associated protein (YAP) は、通常は Hippo シグナルによりリン酸化され細胞質内に存在しているが、Hippo シグナル

が抑制されると、YAPは非リン酸化状態となり核内移行し、転写因子である TEAD と共役して CCN 成長因子などを産生し、細胞増殖がおこる [21, 24]。我々は、IVAでは卵巣を1-2mm大に小断片化するため、この Hippo シグナルの抑制がおこり顆粒膜細胞が増殖して卵胞が発育すると考えた。実際、マウスおよびヒトの卵巣において、全ての Hippo 関連因子は顆粒膜細胞に発現していた。さらに、卵巣の小断片化により Hippo シグナルが抑制され、顆粒膜細胞における YAP の核内移行と、引き続く CCN 成長因子の産生が認められた [1]。

卵巣小断片化による Hippo シグナルの抑制に関して、マウス卵巣の断片化により、一時的なアクチンの重合(G-アクチン→F-アクチン)が生じ、Hippo シグナルが抑制されることを明らかにした。また、アクチン重合化剤である jasplakinolide が卵巣を小断片化しなくても YAP の核移行と CCN 成長因子の産生を誘起することを示した。従って、卵巣小断片化による2次卵胞発育の分子機構として、卵巣の小断片化によりアクチン重合がおこり、その結果 Hippo シグナルが抑制され、YAP の核移行がおこり、CCN 成長因子が産生され卵胞が発育する機構が考えられた(図4)。

8. おわりに

現在、卵巣の老化による不妊症は生殖医療において最も大きな課題となっている。我々が開発したIVAは卵子の質を改善することはできない。しかし、高齢不妊患者では卵巣内の全ての卵子の質が低下している訳ではなく、若年者に比べ質の低下した卵子が増加している。従って、IVAはPOI患者のみならず加齢により残存卵胞が減少した患者においても得られる卵子の数を増加させることが可能であるため、妊娠率の向上には有用と考えら

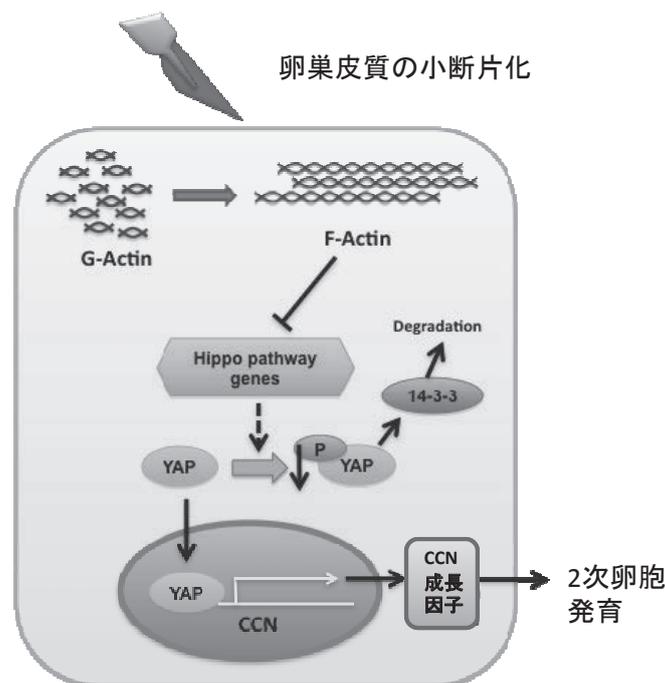


図4 卵巣小断片化による卵胞発育の分子機構

れる。IVAは残存卵胞を認める不妊患者のみに有効であるが、術前に残存卵胞の有無を確定できる方法はない。さらなる臨床成績の向上のため、卵巣内の残存卵胞数を正確に反映するバイオマーカーの開発を現在行っている。

参考文献

1. Kawamura, K. *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110. 17474-17479. 2013.
2. Hsueh, A.J., Kawamura, K., Cheng, Y., & Fauser, B.C. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev* 35. 20141020. 2014.
3. Sauer, M.V. The impact of age on reproductive potential: lessons learned from oocyte donation. *Maturitas* 30. 221-225. 1998.
4. Bentov, Y., & Casper, R.F. The aging oocyte--can mitochondrial function be improved? *Fertil Steril* 99. 18-22. 2013.
5. Howe, K., & FitzHarris, G. Recent insights into spindle function in mammalian oocytes and early embryos. *Biol Reprod* 89. 71. 2013.
6. Harvey, A.J., Gibson, T.C., Quebedeaux, T.M., & Brenner, C.A. Impact of assisted reproductive technologies: a mitochondrial perspective of cytoplasmic transplantation. *Curr Top Dev Biol* 77. 229-249. 2007.
7. Gougeon, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17. 121-155. 1996.
8. Hillier, S.G., Whitelaw, P.F., & Smyth, C.D. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100. 51-54. 1994.
9. McGee, E.A., & Hsueh, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21. 200-214. 2000.
10. Macklon, N.S., & Fauser, B.C. Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Horm Res* 52. 161-170. 1999.
11. Reddy, P. *et al.* Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319. 611-613. 2008.
12. Castrillon, D.H. *et al.* Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301. 215-218. 2003.
13. Li, J. *et al.* Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107. 10280-10284. 2011.
14. Nelson, L.M. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360. 606-614. 2009.
15. De Vos, M., Devroey, P., & Fauser, B.C. Primary ovarian insufficiency. *Lancet* 376. 911-921. 2010.
16. Coulam, C.B., Stringfellow, S., & Hoefnagel, D. Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril* 40. 693-695. 1983.
17. Hayashi, K. *et al.* Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338. 971-975. 2012.
18. Hayashi, K., & Saitou, M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 1513-1524. 2013.
19. White, Y.A. *et al.* Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 18. 413-421. 2012.
20. Adhikari, D. *et al.* The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS One* 7. e39034. 2012.
21. Pan, D. Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev* 21: 886-897. 2007.
22. Halder, G., & Johnson, R.L. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138. 9-22. 2011.
23. Hergovich, A. Mammalian Hippo signalling: a kinase network regulated by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* 40. 124-128. 2012.
24. Holbourn, K.P., Acharya, K.R., & Perbal, B. The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem Sci* 33. 461-473. 2008.